



**UNIVERSITÉ D'ORLÉANS**



**ÉCOLE DOCTORALE**  
**SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT**

INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE

**THÈSE** présentée par :

**Doina SIRBU**

Soutenue à huis-clos le : **20 décembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline : Chimie Organique

**Conception et caractérisation de nouveaux  
fluorophores organiques de la famille des  
triazapentalènes : Outils pour l'imagerie cellulaire**

**THÈSE dirigée par :**  
**Franck Suzenet**

Professeur, Université d'Orléans

**RAPPORTEURS :**  
**Philippe Belmont**  
**Anthony Romieu**

Professeur, Université Paris Descartes  
Professeur, Université de Bourgogne

**JURY:**

**Philippe Belmont**  
**Dominique Bonnet**  
**Pascal Bonnet**  
**Stephane Petoud**  
**Raphaël Rodriguez**  
**Anthony Romieu**  
**Franck Suzenet**

Professeur, Université Paris Descartes  
C.R. CNRS, Université de Strasbourg  
Professeur, Université d'Orléans  
Professeur, Directeur de Recherche INSERM  
C.R. CNRS, Institut Curie  
Professeur, Université de Bourgogne  
Professeur, Université d'Orléans



## Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) de l'Université d'Orléans sous la Direction du Pr Franck SUZENET.

Mes premiers remerciements vont naturellement au Pr Franck SUZENET envers qui je suis très reconnaissante pour m'avoir confié un sujet de thèse ambitieux et plein de défi dans le quel je suis totalement épanouie. Il m'a permis de l'effectuer dans les meilleures conditions en m'accordant toute sa confiance, ainsi qu'une parfaite autonomie au sein de son laboratoire. Son regard critique, ses conseils avisés m'ont aidé dans la conduite mais également dans la rédaction de cette thèse. Au-delà de ses qualités exceptionnelles d'encadrant, sa gentillesse, sa bonne humeur et sa passion dévorante pour la chimie me manqueront.

Je tiens à remercier le Professeur Philippe Belmont ainsi que le Professeur Anthony Romieu pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie également Dominique Bonnet, Raphaël Rodriguez, Pascal Bonnet et Stéphane Pétoud pour leur intérêt porté à mon travail et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

De même j'adresse ma plus profonde gratitude à Marie-Aude qui, malgré son apparition tardive au cours de ma thèse, a fait preuve d'une aide inestimable pendant les corrections du manuscrit.

Je remercie vivement Pascal Bonnet et son équipe pour les collaborations productives au cours de ces trois années, notamment avec l'aide de Dorian et d'Emeline qui ont fait preuve d'une extrême motivation durant leur stage de Master 2. Je remercie également Abdenour, Jade, José, Julien, Fabrice et Nicolas pour leur bonne humeur.

Je tiens également à remercier Stéphane Petoud pour la collaboration en imagerie mais également pour sa bonne humeur, sa gentillesse et son attention. Sans oublier bien évidemment Svetlana Eliseeva et Ivana Martinic qui ont pris ce projet à cœur. Un merci spécial à Ivana pour ses conseils et pour son aide.

Je tiens également à remercier mes collègues du labo 2, ceux avec qui j'ai commencé ma thèse et qui m'ont aidé à m'intégrer : Guillaume, Magali, Yuan, Joana, mais également ceux que j'ai rencontrés à la fin de ma thèse: Khadija, Zahira, Matthieu et bien évidemment Floris et Mohammed à qui je dois des remerciements tout particuliers pour m'avoir supporté et pour tous les bons moments que j'ai passé avec eux.

Mes remerciements les plus chaleureux à Aga et Magda pour leur travail durant les stages de master, ainsi que pour leur motivation. En dehors de ça, merci pour tous les souvenirs polonais, ainsi que pour les repas et les soirées qu'on faisait ensemble.

Un grand grand merci à tous mes amis de l'ICOA, sans lesquels la thèse aurait été beaucoup plus ennuyante : Fanny, Benjamin, Romain, Célia, Liliana, Cosmin, Manu, Jonathan, Geoffrey, Momo, Florian, Poko, Coralie, Lala, Aleksandra, Giuliano, Maria, Régis, Najwa, Joana, Sylvain, Greg, Romain S., Gilles, Samir, Hélène, Anthony, Joseph, Marion etc... Et pour tout ceux que j'oublie.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma famille, pour tout leur soutien, leurs encouragements et pour croire en moi comme ils le font. Un grand merci à mes parents pour avoir été là quand j'en ai eu besoin et à mes quatre petits frères qui sont ma source de motivation et de courage. Je remercie également ma belle-famille pour m'avoir fait découvrir un autre univers et pour prendre soin de moi.

Enfin, je tiens remercier ma plus grande trouvaille de cette thèse, Maxime, qui m'a soutenu tout au long de ces trois années, pour m'avoir redonné confiance en moi, avec qui j'ai passé d'innombrables moments de bonheurs et de joies. Merci pour tout.



## Sigles et Abreviations

**A**

**Ac** : Acétate  
**ACN** : Acétonitrile  
**acac** : Acétylacétone  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**Anh** : anhydre  
**Ar** : Aromatique

**B**

**B** : Brilliance  
**BINAP** : 2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyle  
**Boc** : *tert*-Butoxycarbonyl  
**BODIPY** : Bore-dipyrométhène  
**Bn** : Benzyle

**C**

**CCM** : Chromatographie sur couche mince  
**Ch.** : Chauffage

**D**

**DABCO** : 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane  
**dba** : Dibenzylidèneacétone  
**DCM** : Dichlorométhane  
**DIPEA** : *N,N*-diisopropyléthylamine  
**4-DMAP** : 4-Diméthylaminopyridine  
**DME** : Diméthoxyéthane  
**DMF** : *N,N*-diméthylformamide  
**DMSO** : Diméthylsulfoxyde  
**Dppf** : 1,1'-Bis(diphénylphosphino)ferrocène

**E**

**$\epsilon$**  : Coefficient d'extinction molaire  
**EDG** : Groupement électrodonneur  
**EE** : Etat excité  
**EGFP** : Protéine fluorescente verte améliorée  
**EF** : Etat fondamental  
**Et** : Ethyle  
**Eq** : Equivalent  
**EWG** : groupement électroattracteur  
**EYFP** : Protéine fluorescente jaune améliorée

**F**

**FAD** : Flavine Adénine Dinucléotide  
 **$\Phi$**  : rendement quantique de fluorescence

**G**

**GFP** : Protéine fluorescente verte  
**GP** : groupement partant

**H**

**HetAr** : Hétéroaryle  
**HOMO** : Orbitale moléculaire la plus haute occupée  
**HRMS** : Spectrométrie de masse haute résolution

**I**

**IC<sub>50</sub>** : Concentration requise pour avoir 50% d'inhibition d'une enzyme  
**IR** : Infra rouge

**L**

**LUMO** : l'orbitale moléculaire la plus basse vacante  
 **$\lambda_{\text{abs}}$**  : Longueur d'onde d'absorption  
 **$\lambda_{\text{em}}$**  : Longueur d'onde d'émission  
 **$\lambda_{\text{ex}}$**  : Longueur d'onde d'excitation  
**LED** : Diode électroluminescente  
**LC/MS** : Chromatographie liquide / spectroscopie de masse  
**LiHMDS** : Hexaméthylidisilazane de lithium

**M**

**m-CPBA** : Acide métachloroperoxybenzoïque  
**Me** : Méthyle  
**Mes** : Mésitylène  
**M-Ondes** : Micro-ondes (MO)  
**MS** : Spectrométrie de masse

**N**

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotidephosphate

**NBS** : *N*-bromosuccinimide  
**NIS** : *N*-iodosuccinimide  
**NOE** : Effet Overhauser nucléaire  
**nm** : nanomètres

## P

**PBS** : Tampon phosphate salin  
**PET** : Transfert d'électron photo-induit  
**Ph** : Phényle  
**Phen** : Phénantroline  
**Py** : Pyridine  
**PyTAP** : Pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène

## Q

**QD** : Quantum Dots  
**Quant** : Quantitatif  
**QY** : rendement quantique

## R

**Rf** : Rapport frontal  
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire  
**ROS** : Dérivés réactifs de l'oxygène

## S

**Salox** : Salicylaldoxime  
**SEM** : (triméthylsilyl)éthoxyméthyl  
**SDS** : Dodécylsulfate de sodium  
**S<sub>E</sub>Ar** : Substitution électrophile aromatique  
**SN** : Substitution nucléophile  
**S<sub>N</sub>Ar** : Substitution nucléophile aromatique

## T

**TAP** : 1,3a,6a-triazapentalène  
**TBAF** : Fluorure de tétra-*n*-butylammonium  
**TBAHS** : Hydrogène sulfate de tétrabutyl-  
ammonium  
**TCI** : Transfert de charge intramoléculaire  
**t-Bu** : *tert*-Butyle  
**TES** : Triéthylsilyle  
**THF** : Tétrahydrofurane  
**Tf** : Trifluorométhylsulfonate  
**TFA** : Acide trifluoroacétique  
**TFAA** : Anhydride trifluoroacétique  
**TMHD** : 1,3-Di-*tert*-butyl-1,3-propanedione  
**TMS** : Triméthylsilyle  
**τ** : Temps de vie de fluorescence

## U

**UV** : Ultra-Violet

## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
SIGLES ET ABREVIATIONS	5
SOMMAIRE	7
INTRODUCTION GENERALE	11
<b>PARTIE A : INTRODUCTION</b>	<b>13</b>
Chapitre 1 : Introduction à la fluorescence	15
1. Fluorescence : Définitions et principes fondamentaux	15
2. Outils de fluorescence et applications dans l'imagerie cellulaire	23
2.1. Grandes classes de fluorophores	23
2.2. Dernières avancées et découvertes	35
2.3. Imagerie cellulaire	38
3. Limitations des fluorophores organiques	39
Chapitre 2 : Les pentalènes et les azapentalènes	41
1. Les pentalènes	41
1.1. L'anti-aromaticité et la stabilité des pentalènes	41
2. Hétéropentalènes aromatiques	43
2.1. 1,3a,6a-triazapentalènes	43
2.2. La fluorescence des 1,3a,6a-triazapentalènes	51
2.3. Les limitations des triazapentalènes fluorescents	52
3. Conclusion	55
<b>PARTIE B : SYNTHÈSE DE NOUVEAUX FLUOROPHORES TRICYCLIQUES ANALOGUES DU 1,3A,6A-TRIAZAPENTALÈNE</b>	<b>57</b>
Chapitre 1: Positionnement du sujet	59
1. Les travaux intérieurs de l'équipe	59
2. Objectifs et structures générales visées	60
3. Méthodes générales de synthèse	62
3.1. Etat de l'art sur la formation de la liaison N-N et C-N	62

<b>Chapitre 2: Etude de l'effet des azotes sur la fluorescence des dérivés tricycliques du 1,3a,6a-triazapentalène</b>	<b>69</b>
<b>1. Modulation de l'azine</b>	<b>69</b>
1.1. Synthèse du noyau benzo-1,3a,6a-triazapentalène	69
1.2. Synthèse du noyau pyrido-1,3a,6a-triazapentalène	70
1.3. Conclusion	78
<b>2. Modulation de la diazine</b>	<b>79</b>
2.1. Synthèse du noyau pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène	79
2.2. Synthèse du noyau pyrimido-1,3a,6a-triazapentalène	81
2.3. Analyses photophysiques des (hétéro)aryl-1,3a,6a-triazapentalènes	87
<b>3. Modulation de l'azole</b>	<b>90</b>
3.1. Le cas du 1,2,4-triazole	91
3.2. Le cas du 1,2,3-triazole	92
3.3. Le cas du tétrazoles	93
3.4. Analyse photophysiques des tricycles (28), (30) et(31)	97
<b>Chapitre 3: Etude de réactivité et fonctionnalisation du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène</b>	<b>103</b>
<b>1. Effet donneur-accepteur : Synthèse de molécules modèles</b>	<b>103</b>
1.1. Fonctionnalisation avec des groupements accepteurs(EWG)	103
1.2. Fonctionnalisation avec des donneurs	106
1.3. Voie b : Synthèse de méthoxy-PyTAP	109
1.4. Analyse photophysique : Effet donneur-accepteur	112
<b>2. Synthèse de nouveaux dérivés du PyTAP</b>	<b>116</b>
2.1. Synthèse de dérivés halogénés et des dérivés du bore	116
2.2. Fonctionnalisation de triazapentalènes via les réactions de couplage	119
2.3. Couplage de Sonogashira	123
2.4. Analyses photophysiques des produits obtenus via les couplages	126
<b>Chapitre 4: Fonctionnalisation du PyTAP en C<sup>6</sup> et C<sup>7</sup></b>	<b>133</b>
<b>1. Structures visées</b>	<b>133</b>
1.1. Etat de l'art : halogénéation des pyrazines	133
<b>2. Résultats et Discussions</b>	<b>135</b>
2.1. Synthèse du 6-bromo-PyTAP (107)	135
2.2. Réactions de couplages à partir du 6-bromo-PyTAP	138
2.3. Analyses photophysiques : effet des groupements en C6 du PyTAP	141
<b>Chapitre 5 : Etudes théoriques, prédiction et synthèse des modèles théoriques</b>	<b>145</b>
<b>1. Etude théorique</b>	<b>145</b>
1.1. Méthode	145
1.2. Calculs des charges partielles et analyses orbitales	146
1.3. Orbitales frontières	148
1.4. Calculs des énergies d'excitation et d'émission	149
1.5. Application de la méthode : Prédiction et le modèle théorique	150

<b>2. Synthèse du modèle théorique : fonctionnalisation du PyTAP en C<sup>4</sup> et C<sup>7</sup></b>	<b>152</b>
2.1. Objectif 1 : Synthèse du (4-amino)-PyTAP	152
2.2. Objectif 2 : Synthèse du 7-nitro-PyTAP (129)	160
2.3. Analyse photophysique du composé (123)	166

## **PARTIE C :SYNTHESE DE NOUVEAUX FLUOROPHORES POLYCYCLIQUES ANALOGUES DU 1,3A,6A-TRIAZAPENTALENE**

**169**

### **Chapitre 1 : Etude de la conjugaison sur le noyau pyrazino-triazapentalène**

**171**

<b>1. Objectif 1 : Pyrazines conjuguées</b>	<b>171</b>
1.1. Synthèse du quinoxaline-1,3a,6a-triazapentalène	172
1.2. Synthèse du benzo[g]quinoxaline-1,3a,6a-triazapentalène	173
<b>2. Objectif 2 : azoles conjugués</b>	<b>173</b>
2.1. Utilisation des indazoles et aza-indazoles non substitués	174
<b>3. Analyses photophysiques : effet de la conjugaison</b>	<b>177</b>
<b>4. Utilisation des indazoles substitués</b>	<b>178</b>
4.1. Le cas des nitro-indazoles	179
4.2. Le cas de méthyle 1H-indazole carboxylates/bromé/méthoxy	180
4.3. Analyses photophysiques	181

### **Chapitre 2 : Synthèse de nouveaux composés tétracycliques fluorescents**

**187**

<b>1. Synthèse du noyau tétracyclique polyazoté (172)</b>	<b>187</b>
1.1. Synthèse du noyau 4,7-diaza-1H-indazole (173)	187
1.2. Synthèse du triazapentalène d'intérêt (172) : les premiers résultats	188
1.3. Analyse photophysique	189
<b>2. Synthèse du fluorophore rouge (177)</b>	<b>192</b>
2.1. Optimisation de l'étape de S <sub>N</sub> Ar	192
2.2. Les conditions optimales	195
<b>3. Fonctionnalisation de l'isomère tétracyclique rouge(177)</b>	<b>195</b>
3.1. Halogénéation	196
3.2. Réactions de couplage	197
3.3. Sulfonation	203
3.4. Analyses photophysiques des fluorophores rouges	205

## **PARTIE D : PREPARATION DE SONDES FLUORESCENTES ET APPLICATION DANS L'IMAGERIE CELLULAIRE**

**209**

### **Chapitre 1 : Synthèse de sondes fluorescentes pour le marquage**

**211**

<b>1. Couplage de Sonogashira</b>	<b>212</b>
1.1. Fonctionnalisation avec des amines	212
1.2. Fonctionnalisation avec des amino-acides	214
1.3. Fonctionnalisation avec des esters	215

1.4. Réaction click	215
<b>2. Analyses photophysiques</b>	<b>217</b>
 Chapitre 2: Application des triazapentalènes dans l'imagerie cellulaire	 219
1. Quelques résultats en imagerie cellulaire	219
1.1. La microscopie à épifluorescence	219
 CONCLUSION GENERALE	 227
 PARTIE EXPERIMENTALE	 233

## Introduction Générale

Au cours des vingt dernières années, l'utilisation de la fluorescence pour l'étude des mécanismes du vivant a connu une expansion considérable. Cette approche connaît de nombreuses applications dans les domaines des biotechnologies, de la cytométrie en flux, du diagnostic médical, du séquençage d'ADN, en imagerie cellulaire etc... Cette technique présente l'avantage d'être très sensible, sans danger pour les milieux biologiques (si les longueurs d'onde d'excitation et de fluorescence sont suffisamment élevées) et très accessible (en termes de coût, de temps, de mobilité, d'utilisation et de dangerosité) comparée à d'autres techniques comme la radioimagerie.<sup>1</sup>

La consécration de cette technique a eu lieu en 2008 avec la reconnaissance de l'utilité de la **GFP** (Green Fluorescent Protein) par le décernement du prix Nobel de chimie à O. Shimomura, M. Chalfie et R. Tsien, pour leur contribution au développement du domaine du biomarqueur. Les travaux d'Eric Betzig (USA), Stefan W. Hell (Allemagne) et William E. Moerner (USA), ont également été couronnés par le prix Nobel de chimie en 2014 pour leurs avancées dans le domaine de la microscopie à fluorescence à très haute résolution. Ces découvertes font de la fluorescence un domaine d'importance capitale dans les sciences du vivant, faisant de l'imagerie par microscopie optique une méthode incontournable.

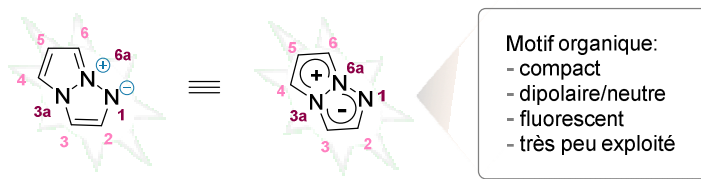
Parmi les diverses classes de marqueurs fluorescents, les fluorophores organiques occupent une place importante dans l'imagerie cellulaire. Ces derniers sont représentés principalement par les familles des Xanthènes, des Cyanines, des AlexaFluor ainsi que des BODIPYs. Leurs emplois sont variés, et peuvent être utiles au sein de différents domaines : imagerie, capteurs, lasers... Bien que largement utilisés, ces composés souffrent encore de quelques limitations qui diminuent leur étendue d'action dans le domaine de la biologie. Les problématiques les plus contraignantes sont : un manque de diversité structurale des squelettes fluorescents, une faible résistance au photoblanchiment, une faible solubilité aqueuse, une durée de vie de fluorescence relativement courte, un faible déplacement de Stokes, mais aussi des coûts très élevés.

Dans ce contexte, l'idée directrice de ces travaux de thèse porte sur l'élaboration de nouveaux motifs organiques inédits, compacts et possédant des propriétés de fluorescence alternatives et/ou complémentaires aux fluorophores usuels. Notre réflexion repose sur les travaux récents de Kosuke Namba et *coll.* qui, récemment ont démontré pour la première fois le potentiel fluorescent du squelette 1,3a,6a-triazapentalène (*Figure 1*).<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Lavis, L. D. & Raines, R. T. Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* **3**, 142–155 (2008).

<sup>2</sup> Namba, K., Osawa, A., Ishizaka, S., Kitamura, N. & Tanino, K. Direct Synthesis of Fluorescent 1,3a,6a-Triazapentalene Derivatives via Click–Cyclization–Aromatization Cascade Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 11466–11469 (2011).



**Figure 1 :** Synthone 1,3a,6a-triazapentalène fluorescent.

Cette structure hétéroaromatique nous a intrigué de par son caractère dipolaire très peu exploité, mais aussi pour ses propriétés de fluorescence très prometteuses. Notre ambition est donc de développer des analogues originaux portant le motif 1,3a,6a-triazapentalène. Nous envisageons également d'explorer la réactivité et la stabilité de ces composés et d'identifier différents modes de fonctionnalisation afin d'accéder à une large diversité de composés avec des propriétés photophysiques uniques. L'objectif final est d'identifier les candidats les plus intéressants et d'envisager leur utilisation en imagerie cellulaire pour l'étude de différents systèmes biologiques.

Le travail exposé dans ce manuscrit s'articule en plusieurs parties :

- ✓ La première partie est consacrée aux divers aspects de la fluorescence. Nous allons tout d'abord nous intéresser aux notions fondamentales de la fluorescence, et poursuivre par un état de l'art des dernières avancées dans ce domaine. Enfin, nous allons présenter les informations importantes concernant la classe des pentalènes en s'intéressant tout particulièrement au noyau 1,3a,6a-triazapentalène.
- ✓ La deuxième partie reflète les diverses stratégies envisagées dans le but d'améliorer la stabilité et le caractère fluorescent du motif 1,3a,6a-triazapentalène. Ces recherches sont orientées vers la synthèse de structures tricycliques ayant des propriétés de fluorescence avec des émissions dans le vert et jaune.
- ✓ Dans une troisième partie, nous faisons appels à des calculs de chimie quantique dans le but de prédire de nouvelles structures susceptibles de présenter de meilleures propriétés de fluorescence.
- ✓ La quatrième partie est dédiée à la synthèse de nouveaux analogues du triazapentalènes émettant dans le rouge plus adapté pour une utilisation dans le domaine de l'imagerie cellulaire.
- ✓ La dernière partie rapporte les premiers résultats d'imagerie cellulaire.



## Partie A : Introduction



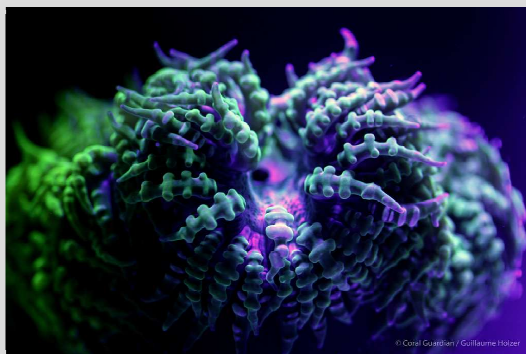
## Chapitre 1 : Introduction à la fluorescence

Ce chapitre a pour but premier d'apporter les notions fondamentales nécessaires à la compréhension des divers processus électroniques qui sont à l'origine de la fluorescence. Dans un second temps, nous allons nous intéresser de plus près aux grandes classes de marqueurs fluorescents et aussi aux divers domaines d'applications en privilégiant celui de l'imagerie cellulaire.

### 1. Fluorescence : Définitions et principes fondamentaux

#### ➤ La luminescence

La luminescence est le terme général pour décrire l'émission de lumière résultant du retour de l'état excité d'une molécule à son état fondamental. Selon le mode d'excitation des molécules, diverses dénominations de la luminescence sont employées. Les termes mis en œuvre sont : *radioluminescence* (emploi des irradiations ionisantes de type  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou rayons X),



**Figure 2 :** *Epicystiscrucifer*, anémone bioluminescente accompagnée d'une émission de photons.

En fonction de la nature de l'état excité, deux voies de désactivation sont possibles. La fluorescence se caractérise par un retour rapide de l'état singulet vers l'état fondamental qui ne dure que quelques nanosecondes, alors que la phosphorescence, associée à une désactivation de l'état triplet, est un processus plus lent allant de quelques secondes à plusieurs heures.

#### ➤ Diagramme de Jablonski

L'ensemble des processus spectroscopiques sont illustrés de façon simpliste et concise dans le diagramme de Jablonski (issu des travaux du professeur Alexander Jablonski publiés en 1935).<sup>4</sup> Ce diagramme est aujourd'hui devenu un outil incontournable, utilisé pour expliquer les principes de base d'un processus photophysique. Une de ses représentations typiques est illustrée dans la *Figure 3*.

<sup>3</sup> Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence : principles and applications*. (Wiley-VCH, 2013).

<sup>4</sup> Jabłoński, A. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Phys.* **94**, 38–46 (1935).

Cette figure schématise non seulement l'ensemble des configurations électroniques d'une molécule, mais aussi les diverses transitions (radiatives, non-radiatives ou intersystème) qui sont susceptibles de se produire suite à l'excitation d'une molécule. Le diagramme comporte donc le niveau électronique fondamental ( $S_0$ ) suivie des états de plus haute énergie ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $T_1$ ), nommés des états excités. Chaque état électronique est subdivisé en plusieurs niveaux vibrationnels.

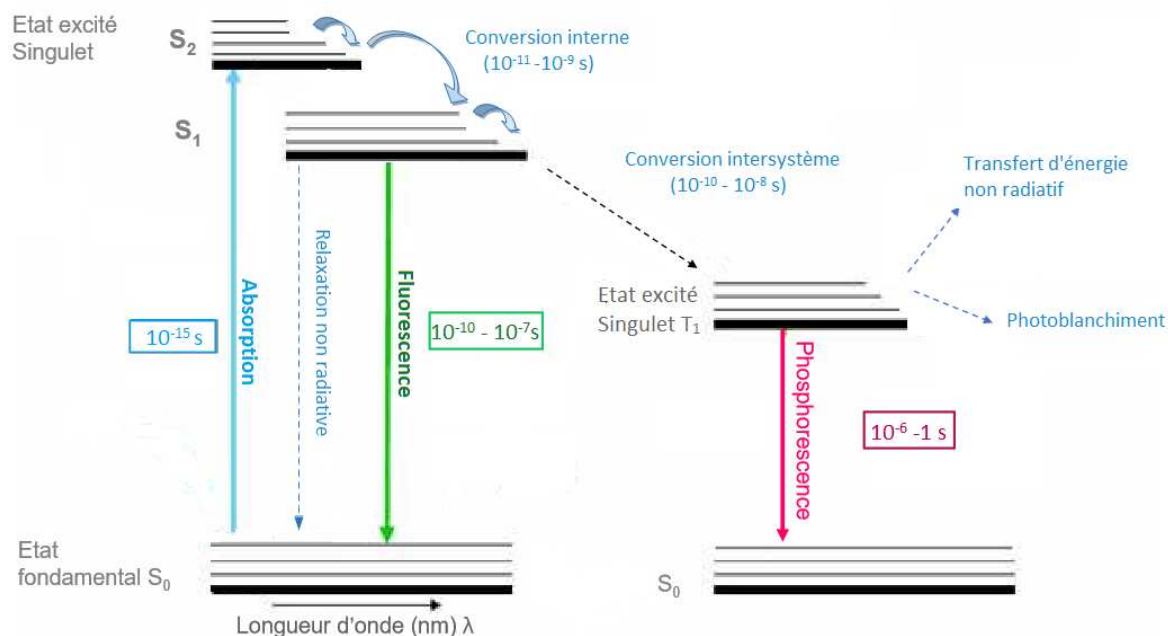


Figure 3 : Diagramme de Jablonski.<sup>5</sup>

Les diverses transitions ayant lieu entre ces états électroniques qui ne conduisent pas à une libération de photons sont dites non-radiatives. Un exemple de processus non-radiatif est le retour d'une espèce excitée à l'état fondamental par un mécanisme de relaxation, conduisant à la dissipation énergétique. Un deuxième type de transition non-radiative est la conversion interne, qui se produit quand un état vibrationnel peut se coupler avec un autre état vibrationnel de plus basse énergie. Le troisième type de transition, la conversion intersystème, est une transition ayant lieu entre les états électroniques de nombre de spin différent, comme entre l'état singulet ( $S_1$ ) et l'état triplet ( $T_1$ ). Quant aux transitions radiatives, elles impliquent l'émission d'un photon lors du retour à l'état fondamental. C'est le cas de la fluorescence et de la phosphorescence.

Les divers processus électroniques (radiatifs ou non-radiatifs) sont entièrement dépendants de la configuration électronique et sont donc spécifiques de chaque espèce moléculaire, tout comme les énergies d'excitation et d'émission (par fluorescence ou par phosphorescence). Une représentation classique des spectres d'excitation et d'émission est illustrée dans la Figure 4. A cause des dissipations énergétiques non radiatives, l'énergie du photon émis est inférieure à l'énergie absorbée. Les longueurs d'ondes d'émission sont par conséquent plus grandes que celles d'absorption (excitation).

<sup>5</sup> <http://docslide.fr/documents/cours-mec-fluorescence.html>

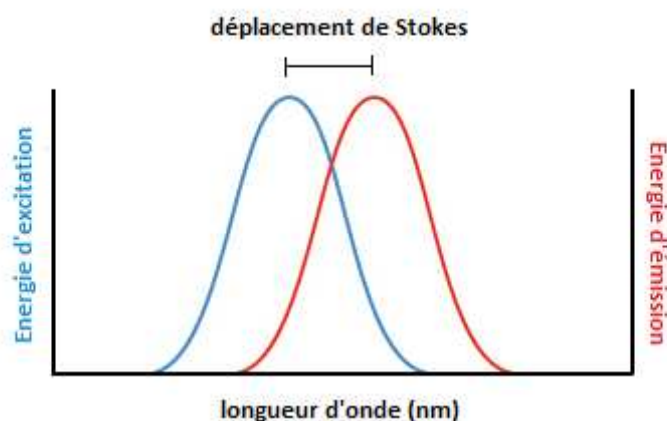


Figure 4 : Spectres d'excitation/émission et le déplacement de Stokes.

La différence entre le maximum d'excitation et d'émission est appelé le *déplacement de Stokes*. Ce paramètre est propre à chaque fluorophore et est un des éléments à prendre en considération pour le choix des marqueurs dans les diverses applications biologiques. Par exemple, certains composés usuels de la classe des fluorophores organiques, sont caractérisés par des valeurs de déplacement de Stokes très faibles, parfois à la limite de détection des appareils. Il s'agit par exemple de la classe des Cyanines avec une valeur de l'ordre de 20 nm, des BODIPY avec seulement 10-20 nm, des Rhodamines avec 20 nm et des Fluorescéines avec 30 nm. Les composés organiques avec de grands déplacements de Stokes sont plus rares. Une famille de ce type de molécules, caractérisés par des déplacements de Stokes supérieurs à 100 nm est commercialisée par Sigma Aldrich sous le nom « UV-Megastokes », avec quelques exemples représentés dans la Figure 5.

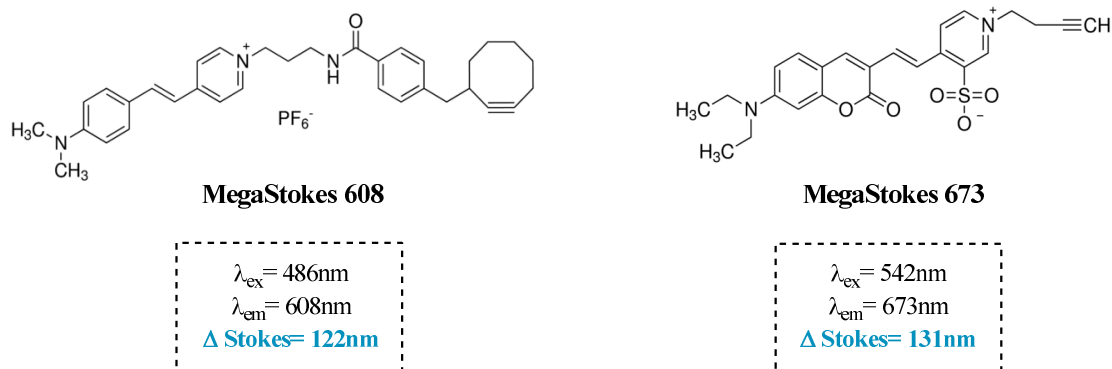


Figure 5 : Exemples de fluorophores avec des grands déplacements de Stokes.

#### ➤ Absorption d'énergie

Comme nous avons vu précédemment, toute transition électronique débute par l'absorption d'un photon. Cet apport d'énergie entraîne l'électron de son état fondamental ( $S_0$ ) vers un niveau supérieur ( $S_{1-2}$ ). L'énergie portée par ce photon est reliée aux équations ci-dessous :

$$E = h\nu \text{ et } \lambda = \frac{c}{\nu} \text{ soit } \lambda = \frac{hc}{E}$$

Avec :  $h$  = la constante de Planck ;  $c$  = la vitesse de la lumière.

Expérimentalement, l'efficacité d'absorption d'une molécule à une longueur d'onde  $\lambda$  est déterminée par son absorbance  $A(\lambda)$  défini comme un rapport des intensités présentée sous la forme :

$$A(\lambda) = \log(I^0/I)$$

Avec :  $I^0$  = intensité lumineuse incidente ;  $I$  = l'intensité lumineuse transmise.

Il est possible de rapporter cette même variable en fonction de la concentration de l'échantillon grâce à la loi de Beer-Lambert:

$$A(\lambda) = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

Avec :  $\varepsilon$  = coefficient d'extinction molaire ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ou  $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ );  $C$  = concentration ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ );  $l$  = trajet optique (cm).

Le coefficient d'extinction molaire ( $\varepsilon$ ) ainsi que la longueur d'onde maximale d'absorption ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ ) sont des caractéristiques importantes d'un composé et ce dans un solvant donné.

➤ *L'émission d'énergie : La fluorescence et la phosphorescence*

Suite à l'absorption d'un photon, la molécule se trouve donc dans un état instable. En fonction de la nature du composé irradié et de sa configuration électronique, l'électron peut atteindre l'état singlet ( $S_1$ ) ou peut évoluer vers l'état triplet ( $T_1$ ). En fonction de la multiplicité du spin à l'état excité la molécule excitée peut être fluorescente ou phosphorescente (Figure 6).

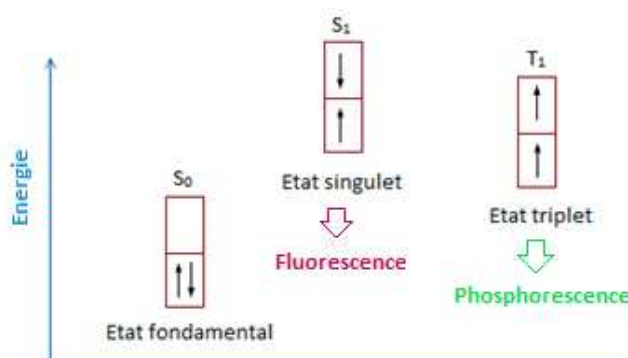


Figure 6 : Etat singlet/triplet.

Il est important de noter que l'excitation d'une molécule à diverses longueurs d'ondes ( $Ex_1 < Ex_2 < Ex_3$ ) conduira aux mêmes signaux d'émission ( $Em_1 = Em_2 = Em_3$ ) (Figure 7). Le seul paramètre qui varie est l'intensité d'émission car elle est proportionnelle à la fréquence de l'énergie appliquée pour exciter le composé.

Ainsi, un des intérêts actuels en fluorescence est de développer des sondes luminescentes qui émettent dans le proche infrarouge, dans l'optique d'éviter une contamination des signaux recueillis par une autofluorescence causée par les organites cellulaires et de pouvoir aller vers le modèle *in vivo*.

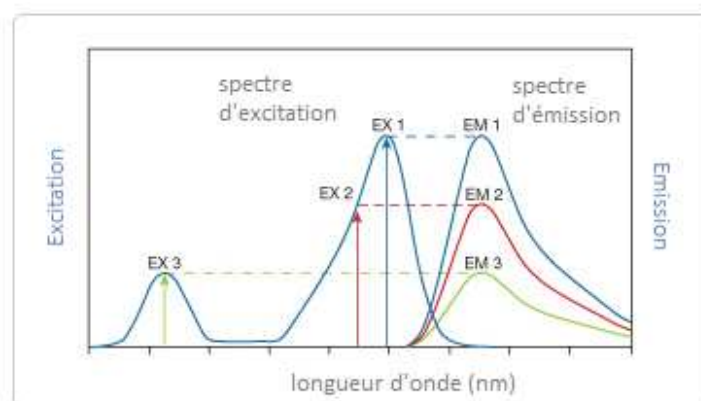


Figure 7 : Dépendance entre la longueur d'onde d'excitation et l'intensité d'émission.<sup>6</sup>

Dans le cas des composés fluorescents, les longueurs d'onde d'émission peuvent aller du domaine ultraviolet (longueurs d'ondes fortement énergétiques / nocifs pour les organismes vivants) vers le domaine de l'Infrarouge (longueurs d'ondes de faible énergie et sans danger) (Figure 8). En raison de limites de détections, les travaux précédents dans le domaine de la fluorescence étaient limités au domaine du visible (390nm - 700nm).

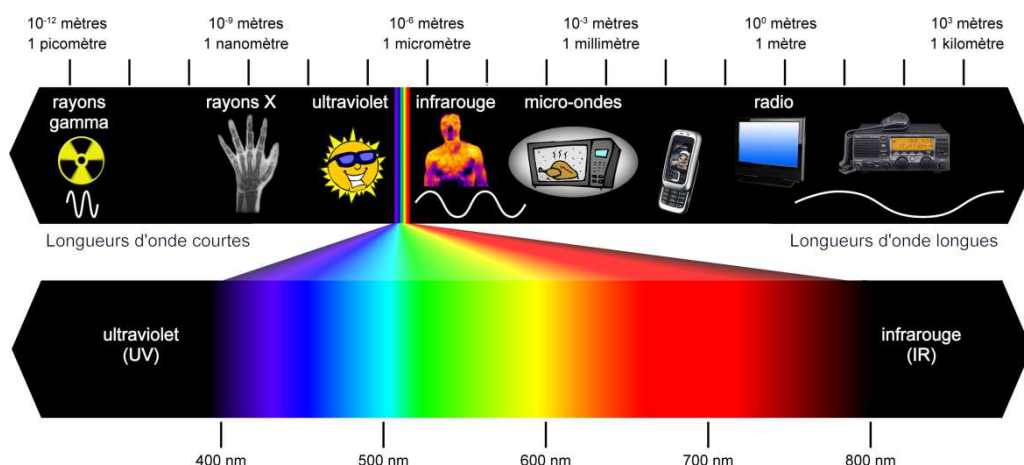


Figure 8 : Spectre de la lumière.

<sup>6</sup> [www.molecularprobes.com](http://www.molecularprobes.com)

Les derniers progrès technologiques permettent aujourd'hui la détection au-delà des limites du visible, offrant ainsi de nouvelles perspectives, notamment pour la recherche de nouveaux fluorophores émettant dans le domaine du rouge et du proche infrarouge compatible avec les applications biologiques. Ainsi, un des intérêts actuels en fluorescence est de développer des sondes luminescentes qui émettent dans le proche infrarouge, dans l'optique d'éviter une contamination des signaux recueillis par une autofluorescence causée par les organites cellulaires et ainsi de pouvoir aller vers le modèle *in vivo*.

### ➤ *Le rendement quantique de fluorescence*

Le rendement quantique est une propriété intrinsèque des fluorophores, indispensable pour leur caractérisation. Ce rendement, désigné le plus souvent par  $\phi$ , est défini comme le rapport entre la quantité de photons émis sur le nombre de photons absorbés par unité de temps. Pour simplifier sa mesure, il est préférable de réaliser l'expérience à une très forte dilution pour minimiser les pertes d'énergie non radiative dues aux collisions intermoléculaires. Le rendement quantique est alors exprimé par la formule simplifiée suivante :

$$\phi = K_r / (K_r + K_{nr})$$

Avec  $K_r$  et  $K_{nr}$  représentant les constantes de vitesse de désintégration radiative et non radiative respectivement.

Le rendement quantique peut avoir des valeurs proches de 1 dans les cas où  $K_{nr} \ll K_r$ . Autrement dit, plus les pertes non-radiatives sont minimisées, meilleure est l'efficacité de fluorescence. La valeur du paramètre  $\phi$  dépend de la nature électronique du fluorophore, mais également de nombreux facteurs externes comme la concentration, la température, la nature et la polarité du solvant, susceptible de favoriser les transitions non radiatives. Il est important de noter que même dans des conditions très favorables, le rendement quantique aura toujours une valeur plus petite que 1 à cause d'un phénomène appelé « *Stokes losses* ». Ce précepte énonce le fait que des pertes d'énergie de fluorescence sont causées par des facteurs internes, indépendamment de l'environnement. Il s'agit principalement de collisions entre les espèces excitées conduisant à des relaxations vibrationnelles, entraînant des dissipations énergétiques.

Expérimentalement, pour déterminer le rendement quantique d'un composé fluorescent deux approches peuvent être utilisées : la détermination de la valeur absolue ou relative. Alors que les mesures du rendement quantique absolu nécessitent une instrumentation sophistiquée et l'utilisation d'une sphère d'intégration, il est parfois plus facile et plus précis d'utiliser la deuxième approche qui suppose l'utilisation d'une référence avec un rendement quantique connu.

Pour la détermination du rendement quantique relatif deux méthodes peuvent être considérées : la méthode à un seul point et la méthode comparative.<sup>7</sup> En utilisant la méthode à un seul point, le rendement quantique est calculé en prenant en compte l'aire de la courbe d'émission de l'échantillon et celle de la référence (ayant un profil de photophysique similaire) à une

<sup>7</sup> Lakowicz. J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Ed., Kluwer Academic, New York, 1999.



concentration identique. Cette première voie est plus rapide, mais, comporte une marge d'erreur importante. La deuxième méthode est celle proposée par Williams et coll., qui suppose la comparaison des pentes obtenues en traçant les aires des courbes de fluorescence et les intensités d'absorption correspondantes, de l'échantillon et du fluorophore de référence.<sup>8</sup> Cette dernière approche est plus chronophage, à cause des nombreuses dilutions nécessaires, cependant, elle permet d'accéder à la valeur du  $\phi$  avec une meilleure précision. Nous avons choisi dans ce travail d'utiliser la méthode comparative (cf. partie expérimentale) dans la majorité des cas.

### ➤ La brillance

La quantité de photons émis (caractérisée par  $\phi$ ) est directement liée à la quantité de photons absorbés (caractérisée par  $\epsilon$ ). Afin de déterminer l'intensité de fluorescence de manière plus concrète, la notion de brillance ( $B$ ) a été définie. Elle est égale au produit du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique :

$$B = \phi \cdot \epsilon$$

La valeur de la brillance peut être variable en fonction de la classe des molécules considérées. Dans le tableau ci-dessous sont représentés quelques exemples de brillances, allant de valeurs très modestes (tryptophane) à des valeurs très élevées (QuantumDots) (Figure 9).

Fluorophores	Brillance
<b>Tryptophane</b>	600
<b>EYFP</b>	51000
<b>Fluorescéine</b>	72000
<b>Cyanine5</b>	90000
<b>QuantumDot 605</b>	550000
<b>QuantumDot 655</b>	1800000



Figure 9 : « QuantumDots ».

### ➤ Le temps de vie de fluorescence

Comme nous l'avons vu ci-dessus, une fois qu'un photon d'énergie appropriée est absorbé, une chaîne de processus photo-physiques radiatifs ou non radiatifs se déclenche. Chacun de ces processus se produit avec une certaine probabilité, caractérisé par des constantes de vitesse ( $k_i$ ). Cette dernière est à son tour liée à la variable  $\tau_i$  par la relation suivante :

$$k_i = 1/\tau_i$$

Le paramètre  $\tau_i$ , également appelé le temps de vie de fluorescence, définit la durée moyenne pendant laquelle une espèce ou une population d'espèces excitées ( $N$ ) reste dans l'état

<sup>8</sup> Williams, A. T. R., Winfield, S. A. & Miller, J. N. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst*. **108**, 1067 (1983).

excité avant de retourner à l'état fondamental. Etant donné que le retour à l'état fondamental se réalise de façon asynchrone, la relaxation devient une fonction exponentielle. Par conséquent le temps de vie devient dépendant, et inversement proportionnel au facteur exponentiel, résumé dans la relation suivante :

$$\tau_i = f\left(\frac{N}{e}\right)$$

En pratique, ce phénomène se traduit par une diminution de fluorescence dans le temps (Figure 10).<sup>6</sup>

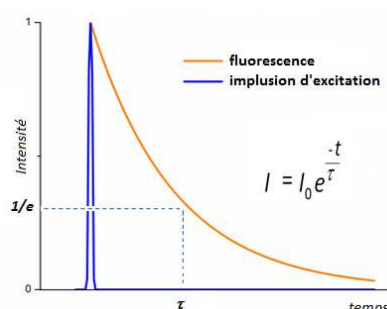


Figure 10 : Calcul du temps de vie de fluorescence.

Il est à noter que le temps de vie ne dépend pas de l'intensité de fluorescence ou de la concentration du fluorophore. En revanche, d'autres facteurs internes liés à la structure chimique et des facteurs externes liés à la température, à la polarité ou encore à la présence de « quenchers » ont un impact direct sur sa valeur. Les valeurs de temps de vie peuvent aller de quelques picosecondes à des secondes. Ci-dessous (Figure 11) sont représentées quelques grandes classes des composés fluorescents et les valeurs de temps de vie correspondants, avec les meilleurs résultats attribués aux complexes de lanthanides.<sup>9</sup>

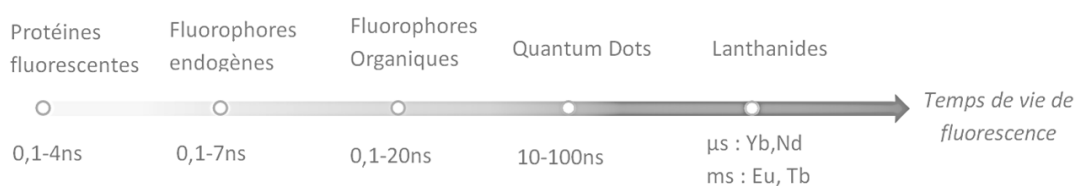


Figure 11. Temps de vie de fluorescence de quelques classes de fluorophores.

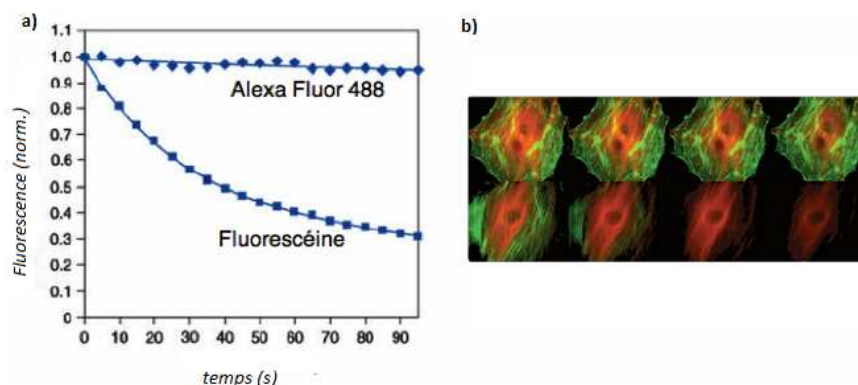
### ➤ Photostabilité

Très souvent, durant les expériences en imagerie cellulaire, sous l'effet d'une irradiation continue ou pulsée, le signal de fluorescence émi s'estompe progressivement. Ce phénomène s'appelle le photoblanchiment ou photolyse. En effet, la plupart des composés fluorescents dans l'état excité peut subir des réactions chimiques ou biochimiques qui conduisent à une dégradation

<sup>9</sup> Damalakiene, L., Karabanovas, V., Bagdonas, S. & Rotomskis, R. Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy for Visualization of Quantum Dots' Endocytic Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 473 (2016).

irréversible.<sup>10</sup> Les causes et les mécanismes de photo-destruction sont diverses et encore très peu élucidés. Les principales causes semblent impliquer des réactions avec l'oxygène présent dans le milieu sous forme de radicaux libres (ou à l'état triplet), ou des réactions non spécifiques entre le fluorophore et des molécules voisines. Ces divers processus conduisent à une perte irréversible de leur capacité de fluorescence.

Ci-dessous sont représentés deux exemples typiques de photoblanchiment. Il s'agit dans un premier temps d'un suivi dans le temps des intensités de fluorescence de deux fluorophores organiques : AlexaFluor 488 (qui montre une forte photostabilité) et la Fluorescéine (qui perd rapidement sa fluorescence (*Figure 12.a*). Un deuxième exemple illustre cette différence de photostabilité avec une série d'images numériques de cellules marquées avec les AlexaFluors® 488 (en vert/en haut), et avec la Fluoresceine (en vert/en bas), capturées à différents intervalles de temps (*Figure 12.b*).



**Figure 12 :** a) Comparaison de la photostabilité de l'AlexaFluor et la fluorescéine ; b) Tests de photoblanchiment réalisés dans des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire bovine : (en Haut) l'Alexa Fluor® 488 lié au phalloïdine et Alexa Fluor® 546 lié à l'anticorps IgG ; (en Bas) Fluorescéine liée au phalloïdine et Cy3 lié à l'anticorps IgG; Les images ont été prises à des intervalles de 30 secondes (0, 30, 90 et 210 secondes d'exposition).<sup>6</sup>

En microscopie à fluorescence, le photoblanchiment peut s'avérer particulièrement problématique, notamment lors d'expériences plus longues comme le suivi d'un processus biologique.

## 2. Outils de fluorescence et applications dans l'imagerie cellulaire

### 2.1. Grandes classes de fluorophores

Comme expliqué précédemment, les fluorophores ou fluorochromes sont des composés capables d'émettre de la lumière à une longueur d'onde donnée, après son excitation. En règle générale, cette gamme de longueur d'onde couvre la zone du proche infrarouge et de l'UV-visible. Ces composés peuvent être utilisés tels quels, soit comme traceurs ou comme indicateurs environnementaux, lorsque la fluorescence de la molécule peut être influée par un paramètre

<sup>10</sup> Diaspro, A., Chirico, G., Usai, C., Ramoino, P., Dobrucki, J.; Chapter 39 : Photobleaching ; Handbook of Biological Confocal Microscopy , Third Edition, edited by James B. Pawley, Springer Science and Business Media, LLC, New York, 2006.

extérieur comme : un métal, un ion, une différence de polarité... Néanmoins, ils sont plus généralement utilisés liés à une macromolécule (biomolécule) servant de marqueur/vecteur à une cible bioactive.

Il existe actuellement quatre grands types de fluorophores largement utilisés : les protéines fluorescentes, les Quantum Dots, les fluorophores organiques et les complexes organométalliques. Leurs synthèses et caractéristiques sont fondamentalement différentes, et seront détaillées par la suite. Un des points communs unissant ces composés est leur utilité finale dans les domaines de la spectroscopie, de la détection d'éléments chimiques, et surtout dans le domaine du vivant.

#### a) Les protéines fluorescentes

L'intérêt des protéines fluorescentes est apparu avec la découverte de la Green Fluorescent Protein (GFP) (Figure 13). Produite par un organisme marin, *Aequorea Victoria*, la GFP a vu son patrimoine génétique cloné en 1992 par l'équipe de Prasher.<sup>11</sup> Chalfie *et coll.* démontrent 2 ans plus tard son intérêt en tant que marqueur fluorescent.<sup>12</sup> Il devint par la suite un outil unique, qui a permis la visualisation de divers mécanismes au niveau cellulaire, et même chez le petit animal.<sup>13</sup> Cette découverte et ses applications ont finalement valu le Prix Nobel à ses découvreurs en 2008.<sup>14</sup>

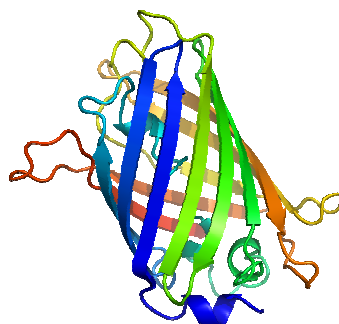


Figure 13 : Structure de la GFP.

Le gène de la GFP a un potentiel d'application remarquable comme gène rapporteur pour évaluer l'expression d'un gène auquel il est fusionné ou comme marqueur moléculaire pour étudier la localisation subcellulaire d'une protéine d'intérêt.<sup>15</sup> Beaucoup d'équipes de recherches se sont tournées vers les synthèses de protéines mutantes dérivées de la GFP. Tsien *et coll.* ont en 1995, décrit qu'une mutation de la sérine sur le groupement chromophore de la GFP pouvait conduire à l'Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), ce qui a permis son utilisation dans des cellules

<sup>11</sup> Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J. Primary structure of the *Aequoreavictoria* green-fluorescent protein. *Gene*. **111**, (1992).

<sup>12</sup> Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. & Prasher, D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**, 802-805, (1994).

<sup>13</sup> Hoffman, R. M. Visualization of GFP-expressing tumors and metastasis in vivo. *Biotechniques*. **30**, 1016–22, 1024–6 (2001).

<sup>14</sup> [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/)

<sup>15</sup> (a) Arun, K. H. S., Kaul, C. L. & Ramarao, P. Green fluorescent proteins in receptor research: An emerging tool for drug discovery. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. **51**, 1–23 (2005). (b) Tsien, R. Y. The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509–544 (1998).

vivantes. D'autres protéines, produites par mutations de la GFP ou issues d'autres organismes marins, ont par la suite été développées donnant naissance à une large gamme de protéines présentant des propriétés spectrales différentes (Figure 14).<sup>16</sup>

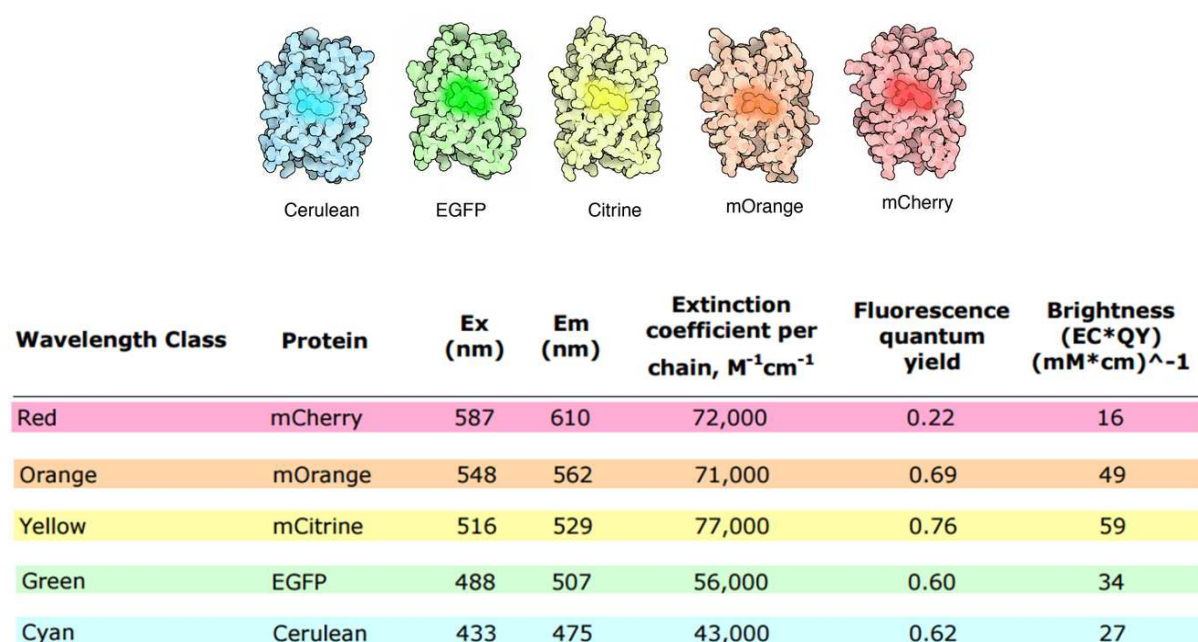


Figure 14 : Protéines basées sur le modèle GFP.

Néanmoins, l'utilisation de ces protéines n'est pas dénuée d'inconvénients. En effet, un de leurs problèmes majeurs est la perte de fluorescence lors de leur fixation aux différents tissus.<sup>17</sup> L'utilisation de la GFP peut aussi avoir un effet cytotoxique de par son agrégation, allant parfois jusqu'à provoquer l'apoptose des cellules visées.<sup>18</sup> Par ailleurs, certains paramètres nécessitent encore des optimisations, comme le déplacement de Stokes qui dans la plupart des protéines mutées, reste trop faible par rapport aux autres fluorophores commerciaux.

#### b) Quantum dots

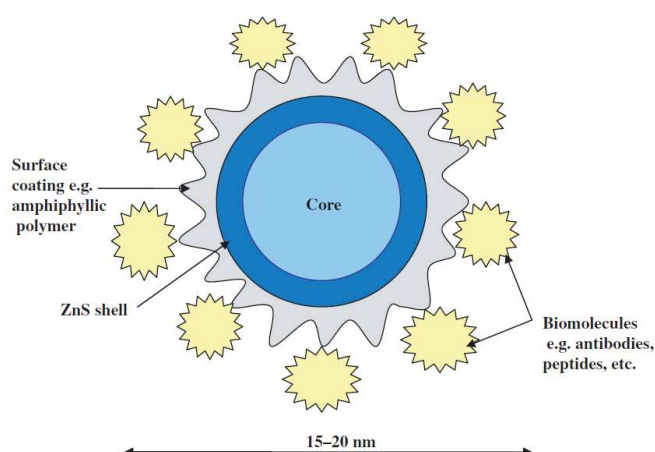
Les quantum dots (QD) sont des nanomatériaux semi-conducteurs, sous la forme de particules fluorescentes. Découvert par Brus en 1982, ces composés ont été explorés en détail durant les 25 dernières années.<sup>19</sup>

<sup>16</sup> Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiol. Rev.* **90**, (2010).

<sup>17</sup> Swenson, E. S., Price, J. G., Brazelton, T. & Krause, D. S. Limitations of Green Fluorescent Protein as a Cell Lineage Marker. *Stem Cells.* **25**, 2593–2600 (2007).

<sup>18</sup> Liu, H.-S., Jan, M.-S., Chou, C.-K., Chen, P.-H. & Ke, N.-J. Is Green Fluorescent Protein Toxic to the Living Cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 712–717 (1999).

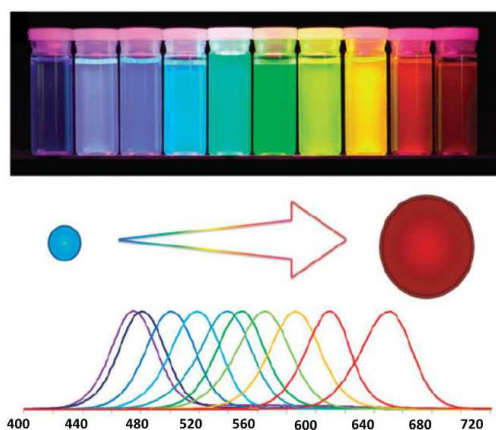
<sup>19</sup> Rossetti, R. & Brus, L. Electron-hole recombination emission as a probe of surface chemistry in aqueous cadmium sulfide colloids. *J. Phys. Chem.* **86**, 4470–4472 (1982).



**Figure 15 :** Structure d'un QD.

Le noyau est constitué d'un matériau semi-conducteur, généralement du tellure de cadmium (CdTe) ou du sélénure de cadmium (CdSe) (Figure 15). Ce noyau est très réactif et instable, sujet à la dégradation photochimique.<sup>20</sup> Dans le but de le stabiliser, ce dernier est encapsulé dans une couche de sulfure de zinc (ZnS) ce qui a aussi pour effet d'augmenter le rendement quantique. Pour la rendre soluble dans l'eau, cette particule est ensuite couverte d'une couche de divers composés chimiques hydrosolubilisants (micelles, polymères amphiphiles etc.). Pour finir, des biomolécules (anticorps, de peptides, etc.) recouvrent cette surface, afin d'établir par la suite des liaisons spécifiques avec les cibles thérapeutiques voulues.

Leurs propriétés photophysiques sont bien supérieures à celles des fluorophores classiques.<sup>21</sup> Ils possèdent en effet une large gamme de longueur d'onde d'excitation pour une longueur d'onde d'émission contrôlée par la taille de cette nanoparticule (Figure 16).



**Figure 16 :** Longueur d'émission en fonction de la taille des QD.

<sup>20</sup> Jamieson, T. *et al.* Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*. **28**, 4717–4732 (2007).

<sup>21</sup> Rizvi, S. B., Ghaderi, S., Keshtgar, M. & Seifalian, A. M. Semiconductor quantum dots as fluorescent probes for *in vitro* and *in vivo* bio-molecular and cellular imaging. *Nano Rev.* **1**, 1–15 (2010).

Leurs natures inorganiques les rendent plus résistantes aux dégradations métaboliques, et permettent de maintenir leur brillance sur des laps de temps beaucoup plus longs. La durée de demie-vie (les QD ont montré pouvoir rester fluorescent *in vivo* 4 mois), le rendement quantique proche de 1, les coefficients d'extinction molaire (mesuré jusqu'à  $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) sont eux aussi supérieurs aux chromophores organiques classiques.

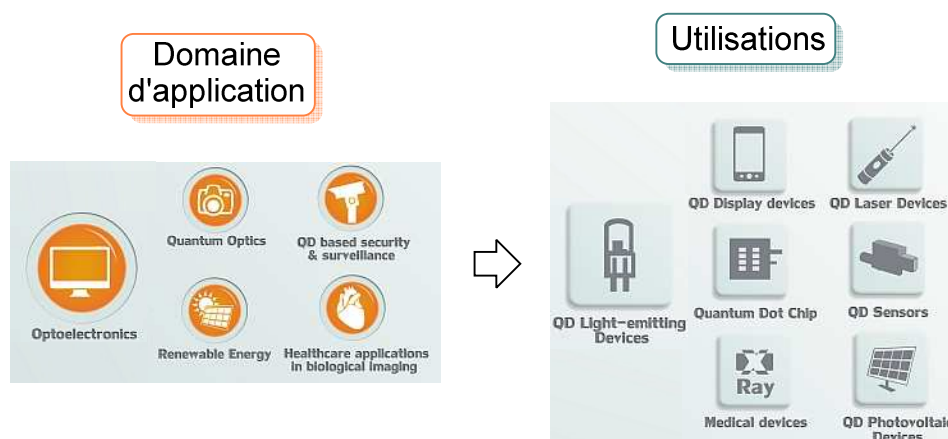


Figure 17 : Applications des QD.

Les Quantum Dots sont exploités dans beaucoup de domaines différents, comme l'électronique, le photovoltaïque ou certains appareils médicaux (Figure 17). Si ces composés sont très utiles dans ces domaines, ils peuvent en revanche présenter quelques inconvénients lorsqu'ils sont appliqués au domaine de la santé publique en tant que composé fluorescent. La limitation principale est leur toxicité liée à la nature métallique du noyau, ces métaux lourds pouvant entraîner une toxicité aiguë et chronique. De plus, ces particules peuvent générer des radicaux libres pendant leur excitation. Une autre limitation est induite par la taille de ces nanocomposés, qui sont plus larges que les autres fluorophores usuels. De ce fait, il est compliqué pour les QD d'entrer dans la cellule, et une ingénierie supplémentaire est nécessaire pour contourner ce problème.<sup>22</sup>

### c) Fluorophores organométalliques

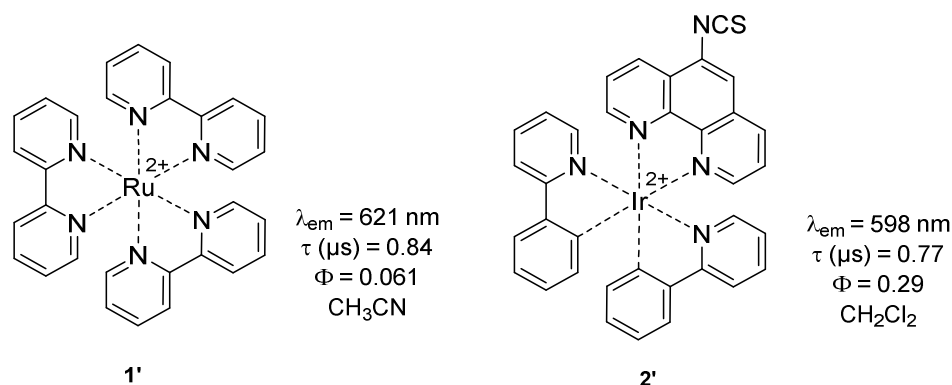
Les fluorophores organométalliques sont constitués d'un noyau métallique qui, complexé à différents ligands, génère de la fluorescence. Globalement, les métaux de transitions les plus représentés dans cette catégorie sont le ruthénium, le rhodium, l'iridium, le platine et le rhénium.<sup>23</sup>

Une de leur première utilisation en biologie fut conduite par Barton, qui décrit l'interaction non covalente entre les composés ruthéniés **1'** et l'ADN (Figure 18). L'introduction de ces motifs sur des protéines ou des nucléosides peut être effectuée par l'intermédiaire de groupement

<sup>22</sup> Jensen, E. C. Use of fluorescent probes: their effect on cell biology and limitations. *Anat. Rec.* **295**, 2031–2036 (2012).

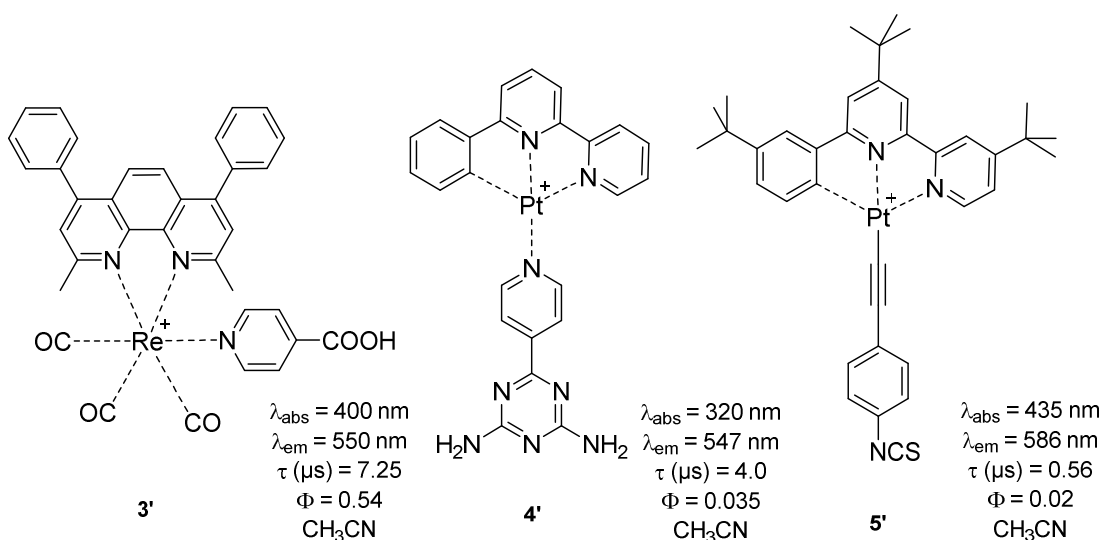
<sup>23</sup> Ruggi, A., Reinhoudt, D. N. & Velders, A. H. in *Bioinorganic Medicinal Chemistry* 383–406 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011).

isothiocyanate présent sur des ligands du ruthénium, permettant ainsi sa bioconjugaison.<sup>24</sup> La même stratégie a été appliquée avec un noyau iridium, où sa conjugaison avec une biotine puis une protéine a été effectuée via un isothiocyanate.<sup>25</sup>



**Figure 18** : Complexes de Ru et de Ir luminescents.

Les fluorophores présentant un noyau rhénium sont plus stables, mais ont cependant été moins décrits dans la littérature. A titre d'exemple, le composé **3'** a été conjugué avec des biomolécules comme des immunoglobulines afin d'en étudier les propriétés physiques.<sup>26</sup> Quant au platine, une fois complexé, il présente l'avantage de pouvoir se lier fortement à l'ADN. Même si ses propriétés photophysiques ne soient pas excellentes, cette affinité avec l'ADN et avec diverses protéines fait de ce métal un outil très intéressant (*Figure 19*).<sup>27</sup>



**Figure 19** : Complexes de Re et de Pt fluorescents.

<sup>24</sup> Lo, K. K.-W. & Lee, T. K.-M. Luminescent Ruthenium(II) Polypyridine Biotin Complexes: Synthesis, Characterization, Photo-physical and Electrochemical Properties, and Avidin-Binding Studies. *Inorg. Chem.* **43**, 5275-5285, (2004)

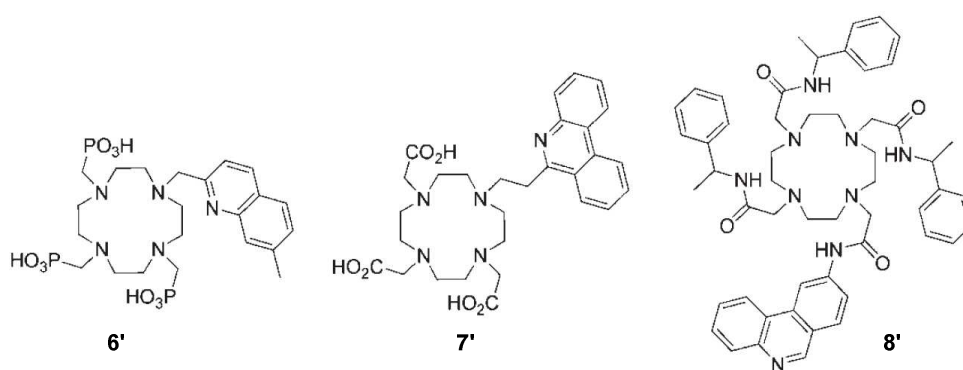
<sup>25</sup> Lo, K. K.-W., Li, C.-K., and Lau, J. S.-Y. Luminescent Cyclometalated Iridium(III) Arylbenzothiazole Biotin Complexes. *Organo-metallics*. **24**, 4594-4601, (2005)

<sup>26</sup> Guo, X.-Q. et al. A Long-Lived, Highly Luminescent Re(I) Metal-Ligand Complex as a Biomolecular Probe. *Anal. Biochem.* **254**, 179-186 (1997).

<sup>27</sup> (a) Ma, D.-L. & Che, C.-M. A Bifunctional Platinum(II) Complex Capable of Intercalation and Hydrogen-Bonding Interactions with DNA: Binding Studies and Cytotoxicity. *Chem. Eur. J.* **9**, 6133-6144 (2003). (b) Wong, K. M.-C., Tang, W.-S., Chu, B. W.-K., Zhu, N. & Yam, V. W.-W. Synthesis, Photophysical Properties, and Biomolecular Labeling Studies of Luminescent Platinum(II)-TerpyridylAlkynyl Complexes. *Organometallics*. **23**, 3459-3465 (2004).



Pour finir, une des plus grandes classes de fluorophores organométalliques est représentée par les lanthanides. Tous les ions lanthanides, à l'exception du La(III) et du Lu(III) sont luminescents et possèdent comme caractéristiques communes d'avoir de fines bandes d'absorption et d'émission à mi-hauteur, avec de longues demi-vies (pouvant aller jusqu'à la milliseconde). Cependant, les coefficients d'extinction molaires de ces derniers sont très faibles, voir nuls. Afin de les exciter, il est cependant possible d'avoir recours à des complexes chromophores qui vont jouer le rôle "d'antenne" et ainsi absorber des photons et transférer l'énergie au lanthanide.<sup>28</sup> De ce transfert d'énergie résulte une émission caractéristique de la luminescence de ce métal. Quelques exemples de ligands des lanthanides sont représentés dans la *Figure 20*.



**Figure 20** : Quelques ligands organométalliques de lanthanides.

Dans les trois cas présentés, le macrocycle azoté est un tétraaza-1,4,7,10-cyclododécane qui assure la complexation du métal, tandis que les hétérocycles aromatiques comme la benzopyridine jouent le rôle d'antenne. Ces sondes lanthanides sont très prometteuses car stables dans le temps, possédant des déplacements de Stokes très larges, peu de sensibilité au photoblanchiment et certains complexes ont des émissions dans le proche infrarouge.<sup>29</sup>

#### d) Fluorophores organiques

Actuellement, un des groupes de chromophores les plus représentés est la famille des fluorophores organiques, qui voient leurs structures basées sur différentes charpentes luminescentes. Historiquement, la première molécule organique à avoir prouvé un potentiel fluorescent a été la quinine, décrite par Herschel en 1845.<sup>30</sup> Par la suite, de nombreux fluorophores organiques ont été développés, mais leur structure repose sur un nombre modeste de noyaux (*Figure 20*). La modulation de ces noyaux permet d'étendre la gamme spectrale de ces composés.

<sup>28</sup> van der Tol, E. B. *et al.* Tetraazatriphenylenes as Extremely Efficient Antenna Chromophores for Luminescent Lanthanide Ions. *Chem. Eur. J.* **4**, 2315–2323 (1998).

<sup>29</sup> Martinić, I., Eliseeva, S. V. & Petoud, S. Near-Infrared Emitting Probes for Biological Imaging: Organic Fluorophores, Quantum Dots, Fluorescent Proteins, Lanthanide(III) Complexes and Nanomaterials. *J. Lumin.* (2016). ASAP article

<sup>30</sup> Herschel, J. F. W. On a Case of Superficial Colour Presented by a Homogeneous Liquid Internally Colourless. *Philos. Trans. R. Soc. London.* **135**, 147–153 (1845).

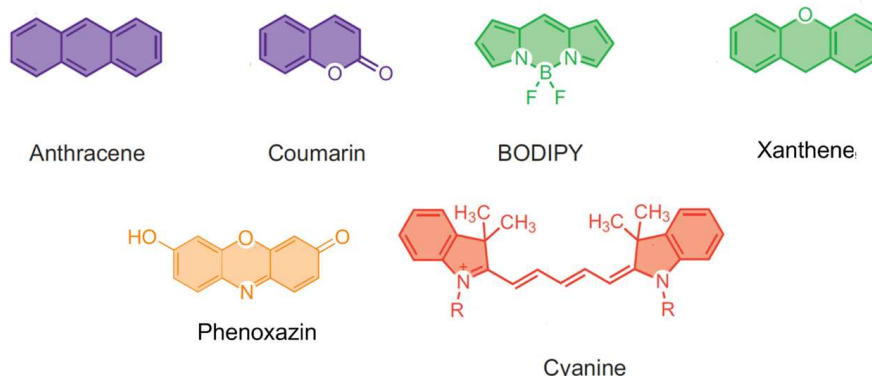


Figure 21 : Chromophores organiques communs.

➤ Coumarines

La coumarine non substituée, comme représentée dans la Figure 5, est un squelette que l'on retrouve dans de nombreuses plantes.<sup>31</sup>

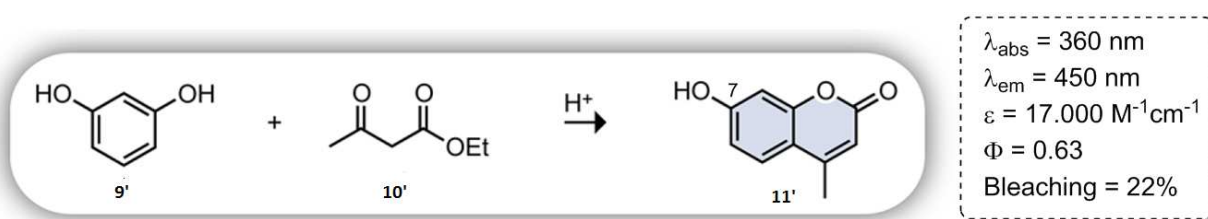


Figure 22 : Synthèse de coumarines.

Une des modulations les plus courantes de ce noyau est l'insertion de groupements électrodonneurs en position 7, qui permet d'améliorer le caractère fluorescent de cette molécule (Figure 22). La 4-méthylumbelliférone **11'** est un parfait exemple de ce phénomène car elle émet de la lumière bleue de par la présence de son groupement hydroxyle.<sup>32</sup> De manière générale, ces composés possèdent un large déplacement de Stokes et un bon rendement quantique. Facilement modulable, l'introduction de divers groupements peut néanmoins rendre ce noyau moins sensible au pH et améliorer son hydrophilie.

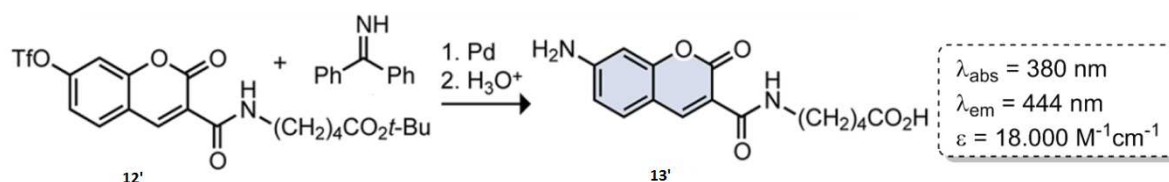


Figure 23 : Exemple de coumarine.

<sup>31</sup> Riveiro, M. *et al.* Coumarins: Old Compounds with Novel Promising Therapeutic Perspectives. *Curr. Med. Chem.* **17**, 1325–1338 (2010).

<sup>32</sup> Sun, W.-C., Gee, K. R. & Haugland, R. P. Synthesis of novel fluorinated coumarins: Excellent UV-light excitable fluorescent dyes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 3107–3110 (1998).

La synthèse de ce type de squelettes substitués en C<sup>7</sup> est effectuée par condensation de Pechmann, soit une réaction acido-catalysée entre un phénol et un ester  $\beta$ -carbonylé. L'introduction d'amines sur cette position spécifique peut aussi être envisageable par couplage métallique (Figure 23).<sup>33</sup> Ces composés sont facilement modulables et présentent des propriétés spectrophysiques intéressantes. Toutefois, il est métabolisé par l'organisme humain, et ses métabolites peuvent présenter une hépato- et néphrotoxicité.<sup>34</sup>

➤ BODIPY

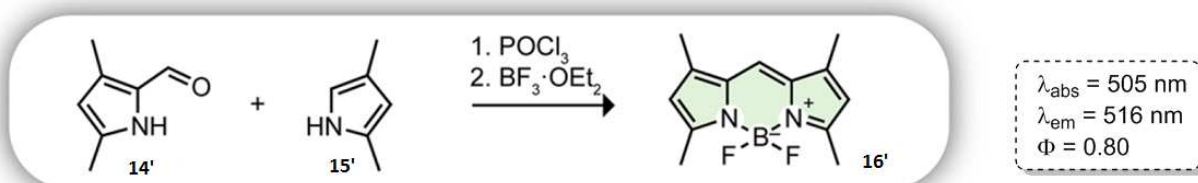


Figure 24 : BODIPY.

Les BODIPY représentent une des plus grandes classes de fluorophores organiques. Ils ont comme caractéristiques principales d'absorber principalement dans le visible, d'avoir un déplacement de Stokes très faible et de présenter un rendement quantique important.<sup>35</sup> La neutralité de ce type de noyau lui confère une grande stabilité physiologique. Le composé (16') est l'un des premiers exemples de BODIPY reportés. Il est plus photostable que la fluoroscéine, et est obtenu par réaction de Vilsmeier-Haack entre les pyrroles (14') et (15'), suivi d'un traitement au BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (Figure 24).<sup>35</sup> Cette réaction permet la génération de toute une gamme de BODIPY, et permet la fonctionnalisation de toutes les positions sur cette charpente hétérocyclique.

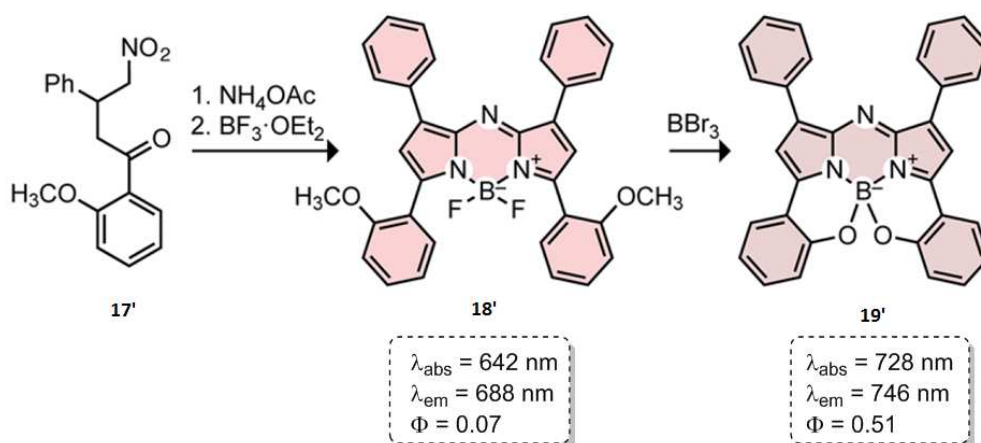


Figure 25 : Variante d'AzaBODIPY.

<sup>33</sup> Jin, X., Uttamapinant, C. & Ting, A. Y. Synthesis of 7-Aminocoumarin by Buchwald-Hartwig Cross Coupling for Specific Protein Labeling in Living Cells. *ChemBioChem*. **12**, 65–70 (2011).

<sup>34</sup> Lavis, L. D. & Raines, R. T. Bright building blocks for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* **9**, 855–866 (2014).

<sup>35</sup> de Wael, E. V., Pardoën, J. A., van Koeveeringe, J. A. & Lugtenburg, J. Pyrromethene-BF<sub>2</sub> complexes (4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenes). Synthesis and luminescence properties. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas*. **96**, 306–309 (2010).

La flexibilité du squelette BODIPY a permis la création de nombreuses classes de composés, tels que les azaBODIPY (Figure 25). Comme précédemment, l'ultime étape de formation du motif BODIPY est réalisée à l'aide de trifluorure de bore.<sup>36</sup> Le rendement quantique très modeste du composé (**18'**) peut être amélioré de 0,07 à 0,51 par la présence d'alcools phénoliques, obtenus par déprotection au tribromure de bore. Ces composés émettent dans le proche infrarouge, ce qui est un avantage majeur du fait de leur meilleure pénétration dans les tissus, évitant aussi une contamination par l'autofluorescence cellulaire. Si ces composés restent très intéressants, la brillance peut toutefois être une source de limitation, tout comme le déplacement de Stokes trop faible.

➤ Famille des xanthènes

Le xanthène est un tricycle comportant deux benzènes fusionnés sur un pyrane. Plusieurs classes de fluorophores possèdent ce noyau comme groupement chromophore, comme les fluorescéines ou les rhodamines.

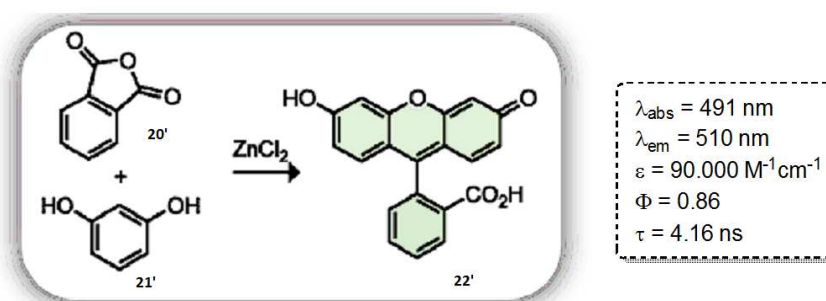


Figure 26 : Fluorescéine.

Synthétisée pour la première fois en 1871 par Adolf Van Baeyer, la fluorescéine originelle (**22'**) est encore très utilisée en tant que marqueurs dans plusieurs applications (Hydrogéologie, biologie moléculaire...). Les fluorophores de la famille de la fluorescéine possèdent la particularité d'être en permanence entre la forme ouverte (quinoïde) fluorescente, et la forme fermée (lactone) non fluorescente en fonction du pH. Cette molécule de référence possède un très bon coefficient d'extinction molaire de  $90.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , qui allié à un rendement quantique de 0,86, lui confère une excellente brillance. Toutefois, son déplacement de Stokes et son temps de vie de fluorescence restent relativement faible et elle est peu photostable. La méthode originale de synthèse consiste en la réaction du résorcinol (**21'**) avec l'anhydride phthalique (**20'**) qui à  $180^\circ\text{C}$  en présence de chlorure de zinc, aboutit à la formation de la fluorescéine (Figure 26).<sup>37</sup> La structure de la fluorescéine peut être modifiée pour moduler le pKa. Ces composés peuvent aussi être utilisés en tant que sondes sensibles au pH, ou encore en tant qu'indicateur de métaux (Na, Zn, Pd...).

La famille des rhodamines est une variante de la famille des fluorescéines, les fonctions oxygénées en  $\text{C}^6$ - $\text{C}^3$  ayant été remplacé par des fonctions azotées (Figure 27). Les méthodes de synthèses restent similaires. Ces composés trouvent leur intérêt grâce à une meilleure photostabilité,

<sup>36</sup> Loudet, A. *et al.* B,O -Chelated Azadipyrrromethenes as Near-IR Probes. *Org. Lett.* **10**, 4771–4774 (2008).

<sup>37</sup> Baeyer, A. Ueber eine neue Klasse von Farbstoffen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **4**, 555-558 (1871)

d'excellents coefficients molaires ainsi qu'une sensibilité aux pH acides plus faible.<sup>38</sup> Si les longueurs d'ondes d'émission de ces composés sont souvent inférieures à 600 nm, des recherches intensives dans ce domaine ont permis la synthèse d'analogues des rhodamines émettant dans le proche infrarouge.<sup>39</sup> De manière générale, ces composés sont solubles dans des milieux aqueux, mais peuvent cependant présenter une toxicité non négligeable.

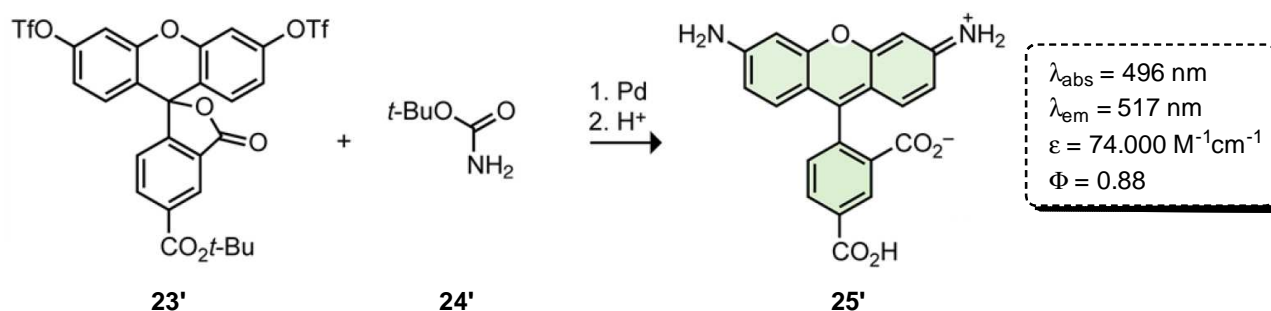


Figure 27 :Exemple de rhodamine.

A titre d'exemple, le composé (25') possède des propriétés de fluorescence similaire à la fluorescéine avec un rendement quantique de 0,88 et un coefficient d'extinction molaire remarquable de  $74.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .<sup>40</sup> Par conséquent, certains analogues de ce composé sont actuellement très utilisés en tant que marqueurs fluorescents.

➤ Phénoxazines / acridinones

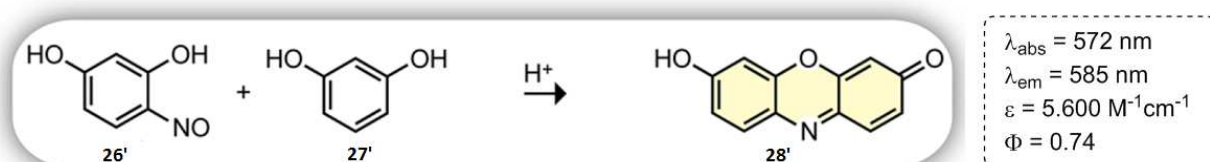


Figure 28 : Exemple de phénoxazine.

Les phénoxazines sont des composés analogues des rhodamines et des fluorescéines, différant de ces derniers par le pont azoté entre les deux phénols (Figure 28). Ils sont présents dans certains produits naturels et présentent principalement des applications en tant que fluorophores en biologie.<sup>41</sup> Ils fluorescent dans le rouge, avec un déplacement de Stokes assez faible, mais avec de bons rendements quantiques. Ils sont néanmoins sensibles au pH et à la polarité du milieu. Leur

<sup>38</sup> Beija, M. *et al.* Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2410 (2009).

<sup>39</sup> Sun, Y.-Q. *et al.* Rhodamine-Inspired Far-Red to Near-Infrared Dyes and Their Application as Fluorescence Probes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **51**, 7634–7636 (2012).

<sup>40</sup> Lavis, L. D., Chao, T.-Y. & Raines, R. T. Fluorogenic label for biomolecular imaging. *ACS Chem. Biol.* **1**, 252–60 (2006).

<sup>41</sup> Warther, D. *et al.* Live-Cell One- and Two-Photon Uncaging of a Far-Red Emitting Acridinone Fluorophore. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 2585–2590 (2010).

synthèse est similaire à celles des fluorescéines, soit par la réaction entre deux résorcinols en conditions acides, on aboutit ainsi au noyau phénoxazine non substitué. A la manière des fluorescéines et des rhodamines, la modulation des propriétés spectrophysiques peut être effectuée par l'introduction de groupements aminoalkyl, ou par remplacement l'oxygène hétérocyclique (Figure 29).<sup>42</sup>

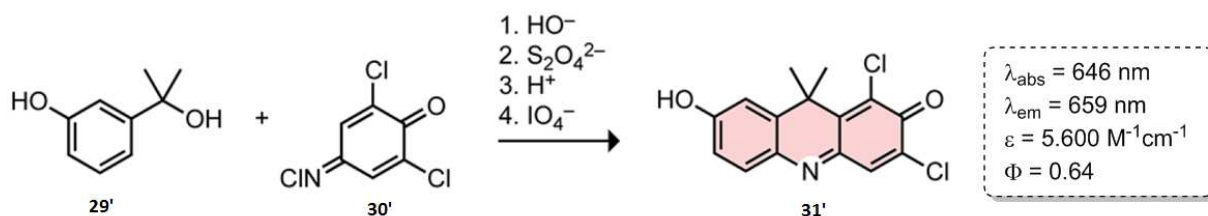


Figure 29 : Exemple de phénoxazine désoxygénée.

### ➤ Cyanines

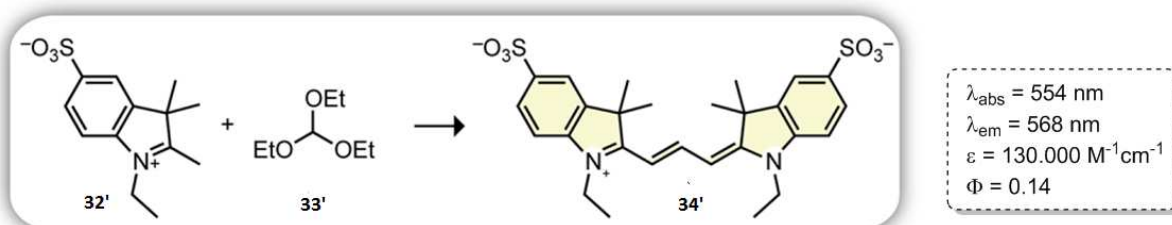


Figure 30 : Cyanine Cy3.

Utilisées principalement en biotechnologie et en bioimagerie, les cyanines couvrent une large gamme de composés possédant la structure  $\text{R}_2\text{N}-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{CH}=\text{NR}_2^+$ . Ces composés sont principalement connus pour leur coefficient d'extinction molaire important, leur photostabilité modérée ainsi que pour leurs structures difficilement modulables. Une cyanine commerciale, la Cy3 (34'), est un marqueur servant à la visualisation et à la quantification d'acides nucléiques ou d'ADN, qui possède un coefficient d'extinction molaire remarquable de  $130.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La longueur d'onde d'émission peut être modulée, à l'aide de l'espaceur entre les deux hétérocycles. Cette chaîne conditionne les longueurs d'ondes d'émission, pour aller du visible (Cy3) au proche infra-rouge (Cy7) (Figure 31).

<sup>42</sup> Corey, P. F., Trimmer, R. W. & Biddlecom, W. G. A New Chromogenic  $\beta$ -Galactosidase Substrate: 7- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-oxy-9,9-dimethyl-9H-acridin-2-one. *Angew. Chemie Int. Ed. English*. **30**, 1646–1648 (1991).

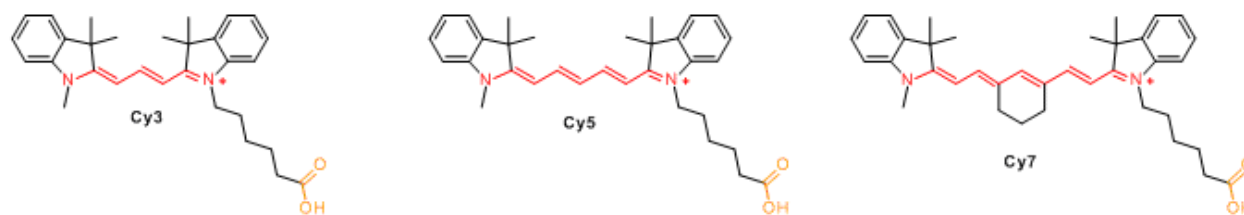


Figure 31 : Quelques cyanines.

Leur synthèse s'effectue par la condensation du sel d'indolinium (**32'**) sur le triéthylformate (**33'**), pour donner le Cy3 (**34'**).<sup>43</sup> De manière générale, l'obtention de composés cyanines s'effectue selon cette approche en utilisant un sel d'indolinium et un aldéhyde. Les cyanines, spécialement les Cy5 et Cy7, font partie des rares composés montrant des rendements quantiques suffisants dans le proche infrarouge en milieu aqueux.<sup>44</sup>

## 2.2. Dernières avancées et découvertes

Au cours de ces dernières années, beaucoup d'équipes se sont penchées sur la synthèse de nouveaux fluorophores par la modification des familles précédemment décrites, mais aussi par le développement de squelettes innovants. La première stratégie a été adoptée par la société Molecular Probes Inc., sous branche de Thermo Fisher Scientific. Ils ont en effet synthétisé une gamme de fluorophores, nommée Alexa Fluor®, très utilisée en microscopie à fluorescence, ainsi qu'en biologie cellulaire. Leur concept repose sur l'introduction d'un ou plusieurs groupements sulfonates sur les principales charpentes fluorescentes, comme les coumarines, rhodamines, fluorescéines ou même cyanines (Figure 32). Cette sulfonation rend ces composés chargés, et donc plus hydrophiles. De manière générale, cette modulation chimique a pour conséquence de rendre les composés plus brillants, plus photostables et moins sensibles à l'acido-basicité du milieu.<sup>45</sup> En revanche, le monopole de ces produits sulfonés obtenus par des procédés synthétiques élaborés rend ces composés très onéreux.

<sup>43</sup> Mujumdar, R. B., Ernst, L. A., Mujumdar, S. R., Lewis, C. J. & Waggoner, A. S. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyaninesuccinimidyl esters. *Bioconjug. Chem.* **4**, 105–11

<sup>44</sup> (a) Peng, X. *et al.* Fluorescence Ratiometry and Fluorescence Lifetime Imaging: Using a Single Molecular Sensor for Dual Mode Imaging of Cellular Viscosity. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 6626–6635 (2011). (b) Yu, F. *et al.* A Near-IR Reversible Fluorescent Probe Modulated by Selenium for Monitoring Peroxynitrite and Imaging in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 11030–11033 (2011).

<sup>45</sup> (a) Panchuk-Voloshina, N. *et al.* Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1179–88 (1999). (b) Berlier, J. E. *et al.* Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 1699–712 (2003).



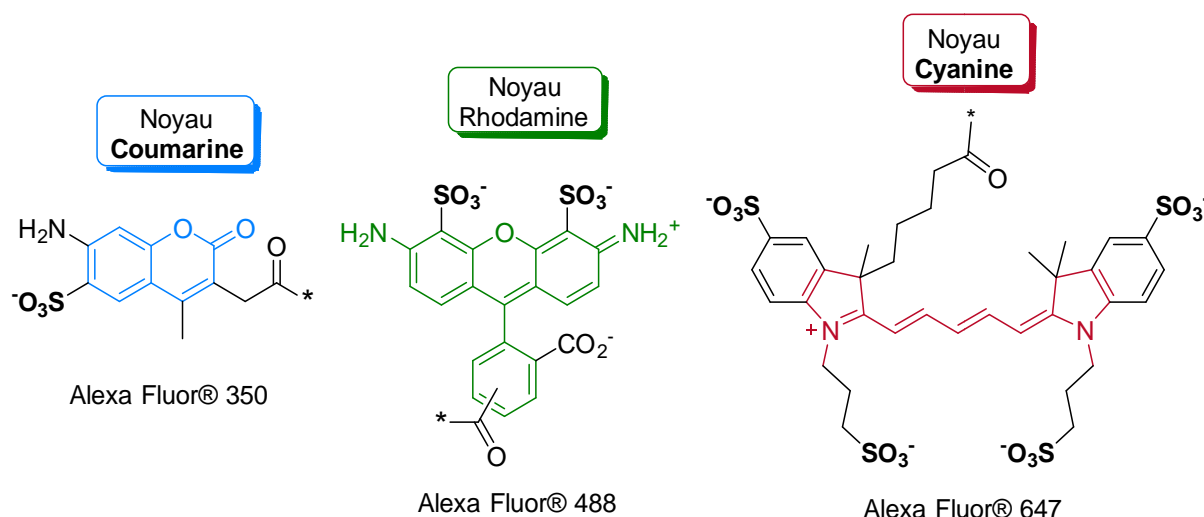


Figure 32 : Quelques exemples d'AlexaFluor®.

En marge des fluorophores organiques "standards", quelques équipes se sont particulièrement concentrées sur la création de nouveaux noyaux chromophores. C'est notamment le cas de l'équipe de Park, qui a récemment rapporté l'impact d'un nouveau fluorophore organique, le Seoul-Fluor, portant une structure indolizine.<sup>46</sup>

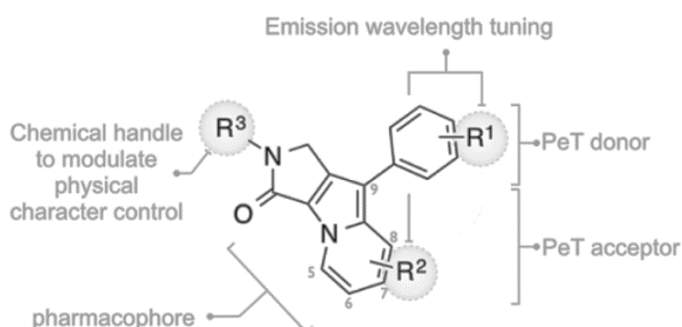


Figure 33 : Structure générale des Seoul fluors.

Ce fluorophore possède trois positions disponibles pour introduire divers substituants ( $R^1$ ,  $R^2$  et  $R^3$ ) (Figure 33). Grâce aux groupements  $R^1$  et  $R^2$ , il est possible de contrôler les longueurs d'ondes d'émissions, ainsi que les rendements quantiques. Le groupement  $R^3$  permet quant à lui la bioconjugaison de cette charpente hétérocyclique. En plus de ses excellentes propriétés spectrophotométriques, cette série de composé s'avèrent aussi être d'excellents senseurs de pH ( $R^1 = \text{NPr}_2$ , CN, OMe et  $R^2 = \text{H}$ , Ph, Ac, COOH). Dans le cas où  $R^1$  est un boronate, ce fluorophore est aussi un senseur de ROS (Reactive Oxygen Species, Figure 34), indicateur de la présence de radicaux libres qui peuvent causer de réels dommages aux cellules ou à l'ADN.

<sup>46</sup> 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.* **48**, 538–547 (2015).



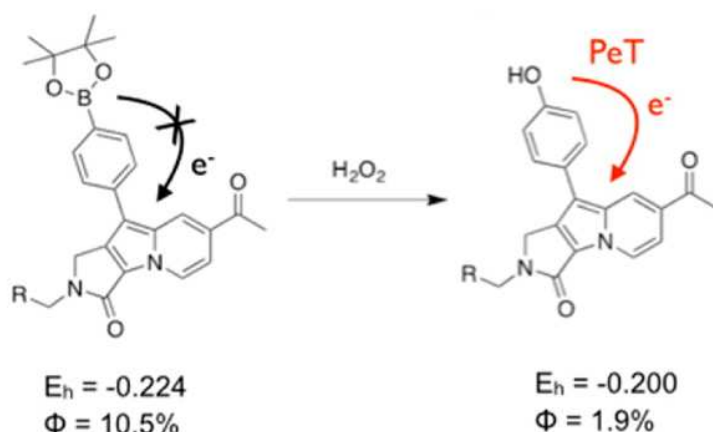


Figure 34 : Seoul-Fluor utilisé en tant que bio-senseur.

D'autres équipes se sont aussi tournées vers la synthèse de chromophores innovants. L'équipe de You a par exemple développé une nouvelle série de fluorophores appelés Indazo-Fluor.<sup>47</sup> Ils comportent un squelette indazolique pauvres en électron, substitués par divers aryles enrichis en électrons en position 3. La stratégie de synthèse repose sur une réaction pallado-catalysée oxydante de type C-H/C-H entre un indazole et différents hétérocycles (Figure 35), et elle aboutit à la formation de composés présentant des caractéristiques photophysiques remarquables. En effet, ces noyaux possèdent un excellent déplacement de Stokes, des rendements quantiques à hauteur de 0,93, une photostabilité très marquée alliée à une cytotoxicité mineure. De plus, ces composés ont montré expérimentalement une vectorisation spécifique pour les mitochondries.

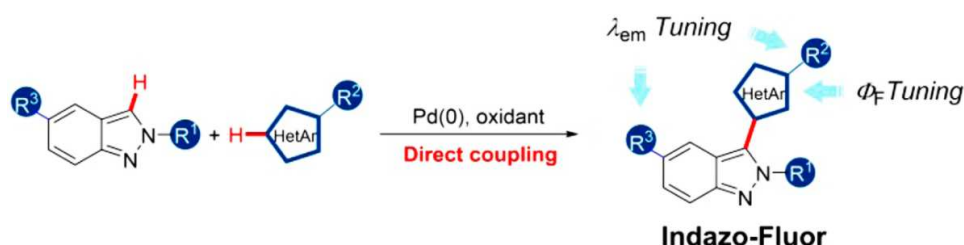
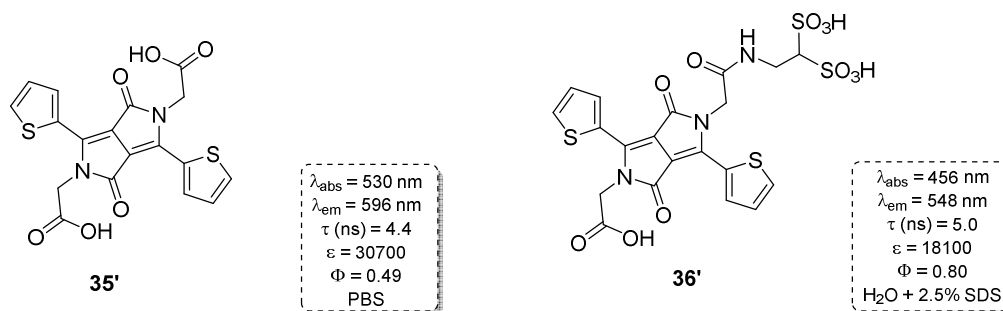


Figure 35 : Accès aux Indazo-Fluor.

En 2016, Heyer *et coll.* ont quant à eux préparé des sondes fluorescentes possédant une charpente dicétopyrrolopyrrole.<sup>48</sup> Par l'introduction des motifs thiényles sur le noyau central (Figure 36), la longueur d'onde d'émission approche les 600 nm. Liés à un modèle protéique (Bovine Albumine Serum), ces composés possèdent d'excellents rendements quantiques, à hauteur de 62% alliés à une très bonne stabilité photochimique. De plus, la limite de détection de ces composés est extrêmement basse, puisque 80 à 300 molécules par  $\mu\text{m}^2$  se sont avérées suffisantes pour détecter la fluorescence des molécules bioconjuguées par microscopie.

<sup>47</sup> Cheng, Y. *et al.* Unparalleled Ease of Access to a Library of Biheteroaryl Fluorophores via Oxidative Cross-Coupling Reactions: Discovery of Photostable NIR Probe for Mitochondria. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 4730–4738 (2016).

<sup>48</sup> Heyer, E. *et al.* Highly fluorescent and water-soluble diketopyrrolopyrrole dyes for bioconjugation. *Angew. Chemie. Int. Ed.* **54**, 2995–2999 (2015).

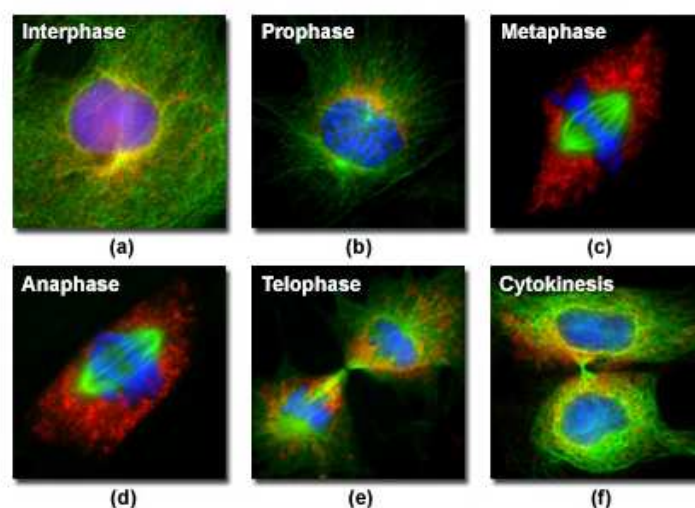


**Figure 36 :** Dicyclopentopyrrolopyrroles fluorescentes.

Comme nous avons pu le voir, la science permettant le développement de sondes fluorescentes est actuellement en plein essor. La modulation des noyaux "conventionnels" ainsi que la création de molécules novatrices sont le cœur de recherche de nombreuses équipes, pour améliorer les propriétés photophysiques et la vectorisation des chromophores actuels.

### 2.3. Imagerie cellulaire

Parallèlement aux efforts importants menés pour le développement de nouvelles sondes fluorescentes, des avancées technologiques importantes dans le domaine de la microscopie (développement de microscopes plus rapides avec de meilleures résolutions) ont été réalisées, ce qui a permis d'améliorer la capacité à étudier les mécanismes du vivant.<sup>49</sup> L'imagerie par microscopie à fluorescence permet d'étudier de manière non invasive les tissus, les embryons vivants, les cellules saines ou cancéreuses, sans perturber leur fonctionnement habituel. Elle permet également de suivre la dynamique d'une cellule individuelle lors des processus complexes telle que la division cellulaire *via* la microscopie à fluorescence (Figure 37).<sup>50</sup>



**Figure 37 :** Mitose de cellules épithéliales du rein dukangourou-rat musqué.

<sup>49</sup> Baker, M. Cellular imaging: Taking a long, hard look. *Nature*. **466**, 1137–1140. (2010)

<sup>50</sup> Griffin, J. S., Claxton, N. S., Davidson, M. W. - National High Magnetic Field Laboratory, [www.micro.magnet.fsu.edu](http://www.micro.magnet.fsu.edu) (<https://micro.magnet.fsu.edu/cells/fluorescencemitosis/>)

Aujourd'hui les sondes utilisées en bioimagerie sont très souvent basées sur des fluorophores organiques à la condition que ceux-ci répondent à certains critères comme : une faible toxicité, une stabilité chimique et photophysique. De plus, ces composés doivent avoir des longueurs d'onde d'excitation peu énergétiques pour ne pas être fatales aux cellules. Un autre critère important est la nécessité d'avoir des fluorophores avec des longueurs d'onde d'émission dans le rouge ou idéalement, dans le proche infra-rouge, zone où l'auto fluorescence est la plus faible.<sup>51</sup>

Le phénomène d'autofluorescence s'explique par l'émission naturelle de lumière par les structures biologiques, et spécialement par les organites cellulaires. Cette émission de fluorescence, principalement localisées dans les mitochondries et les lysosomes, est principalement due à deux molécules considérablement présentes dans les cellules : la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) et la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD).<sup>52</sup> Afin d'éviter toute interférence entre les fluorophores administrés et les composés présents dans l'organisme humain, une fenêtre est définie entre 650 et 1450 nm comme optimale pour un diagnostic biologique.

### 3. Limitations des fluorophores organiques

Bien que largement utilisés, les fluorophores organiques souffrent encore de quelques limitations pour étendre leur utilisation dans le domaine de la biologie, dont principalement :

- ❶ Faible déplacement de Stokes (de l'ordre de 20 nm pour les Cyanines, 10-20 nm pour les BODIPY, 30 nm pour les Fluorescéines, 20 nm pour les Rhodamines). Ce phénomène peut causer une erreur de mesure de la fluorescence dû au recouvrement des bandes d'absorption et d'émission, ainsi que provoquer un "auto-quenching".<sup>53</sup>
- ❷ Sensibilité au phénomène de photoblanchissement (photobleaching), processus irréversible de destruction de la molécule lors d'une exposition prolongée au rayonnement.
- ❸ Sensibilité à "l'autoquenching". Ce phénomène peut limiter le nombre et le type de sondes que l'on peut conjuguer à un vecteur biologique (extinction de la fluorescence lors d'un bio-couplage).
- ❹ La plupart de ces composés présentent une durée de fluorescence très courte, de l'ordre de quelques nano-secondes qui diminue jusqu'à 1 ns pour les composés émettant dans le rouge.
- ❺ La complexité de la plupart des fluorophores organiques imposent une voie de synthèse fastidieuse et par conséquent un coût élevé.
- ❻ Les structures aromatiques apolaires conduisent à une faible solubilité en milieu aqueux, ce qui est un réel problème lors de leur utilisation *in vivo*.

<sup>51</sup> Hemmer, E., Benayas, A., Légaré, F., Vetrone, F.; Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm. *Nanoscale Horiz.* **1**, 168-184 (2016)

<sup>52</sup> (a) Sivabalan, S. *et al.* *In vivo* native fluorescence spectroscopy and nicotinamide adenine dinucleotide/flavin adenine dinucleotide reduction and oxidation states of oral submucous fibrosis for chemopreventive drug monitoring. *J. Biomed. Opt.* **15**, 017010 (2010). (b) De Ruyck, J. *et al.* Towards the understanding of the absorption spectra of NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> as a common indicator of dehydrogenase enzymatic activity. *Chem. Phys. Lett.* **450**, 119-122 (2007).

<sup>53</sup> Peng, X. *et al.* Heptamethine Cyanine Dyes with a Large Stokes Shift and Strong Fluorescence: A Paradigm for Excited-State Intramolecular Charge Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12, 4170-417 (2005)

- Ⓢ Sensibilité aux pH, notamment des sondes comportant des groupements chargés (carboxylates, sulfonates, phosphates...).
- Ⓢ Manque de diversité structurale.

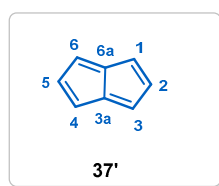
Ces limitations incitent au développement de nouveaux fluorophores. Dans ce contexte, notre ambition est de développer une nouvelle famille de fluorophores organiques différents des motifs couramment utilisés. Pour cette raison nous nous sommes orientés vers l'étude du motif 1,3a,6a-triazapentalène fluorescent, appartenant à la famille des pentalènes qui est un squelette organique jusque-là très peu reporté dans la littérature.

## Chapitre 2 : Les Pentalènes et les azapentalènes

L'ensemble des travaux réalisés durant cette thèse étant dédié à l'étude des pentalènes hétérocycliques, il nous a semblé judicieux de commencer ce chapitre par quelques généralités sur le « pentalène ». Notre but est d'expliquer comment ce pentalène, bicycle instable et anti-aromatique, a pu évoluer vers des structures aromatiques comme les azapentalènes.

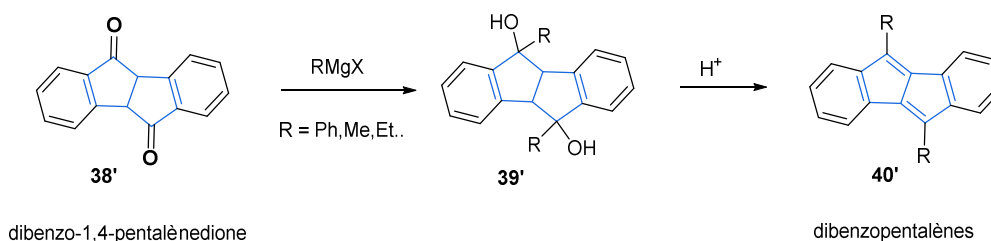
### 1. Les pentalènes

Le pentalène est un carbocycle conjugué planaire qui comporte deux cyclopentadiènes fusionnés (*Figure 38*).



**Figure 38** : Structure du pentalène.

La première structure comportant le pentalène comme motif central, a été synthétisé et isolé par Brand en 1912.<sup>54</sup> La méthode proposée permet d'obtenir des dibenzopentalènes fonctionnalisés (**40'**) à partir de la dibenzo-1,4-pentalènedione (**38'**) (*Figure 39*).



**Figure 39** : Synthèse du dibenzopentalène proposée par Brand.

#### 1.1. L'anti-aromaticité et la stabilité des pentalènes

Durant les 5 décennies qui ont suivi leur découverte, des efforts considérables ont été dédiés à l'étude de la pseudo aromaticité, ou anti-aromaticité des pentalènes.<sup>55</sup>

<sup>54</sup> Brand, K. Über gefärbte Kohlenwasserstoffe der Diphenylsuccinden-Reihe. I. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft.* **45**, 3071–3077 (1912).

<sup>55</sup> (a) Armit, J. W. & Robinson, R. XCIII.—Polynuclear heterocyclic aromatic types. Part I. Some indenoquinoline derivatives. *J. Chem. Soc., Trans.* **121**, 827–839 (1922). (b) Craig, D. P. cycloButadiene and some other pseudoaromatic compounds. *J. Chem. Soc.* 3175 (1951) (c) Dauben, H. J. & Bertelli, D. J. Heptalene. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 4659–4660 (1961).

Contrairement aux structures aromatiques qui respectent la règle de Hückel comportant  $4n+2$  électrons  $\pi$  (exemple du naphthalène), le pentalène a seulement  $4n$  électrons  $\pi$  (avec  $n=2$ ),<sup>56</sup> il est donc anti-aromatique (Figure 40).



Figure 40 : Différence entre une structure aromatique et anti-aromatique.

En parallèle des études théoriques, des efforts considérables ont été consacrés à la synthèse de pentalènes non conjugués mais ceux-ci sont restés infructueux.<sup>57</sup> Les difficultés rencontrées sont dues essentiellement à l'instabilité thermique et chimique du bicyclic. Ainsi, le pentalène (**37'**) par exemple, se dégrade à partir de  $-196^{\circ}\text{C}$ . Il a été montré qu'au-delà de cette température cet hydrocarbure bicyclique évolue rapidement vers son dimère (**41'**).<sup>58</sup>

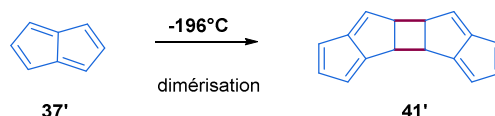


Figure 41 : Dimérisation du pentalène.

Le Goff et Hafner ont été les premiers à montrer que des groupements donneurs d'électrons permettent d'augmenter la stabilité des pentalènes.<sup>59</sup> Hafner, a montré également que la présence de diméthylamino sur les positions C<sup>1</sup> et C<sup>3</sup> permet de former une espèce dichargée (**43'**), qui rend ce bicyclic compact plus stable (Figure 42).

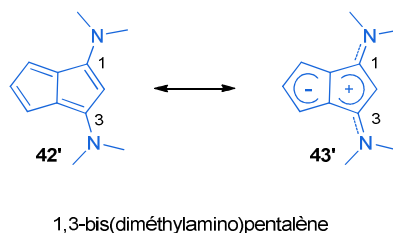


Figure 42 : Pentalènes thermostables.

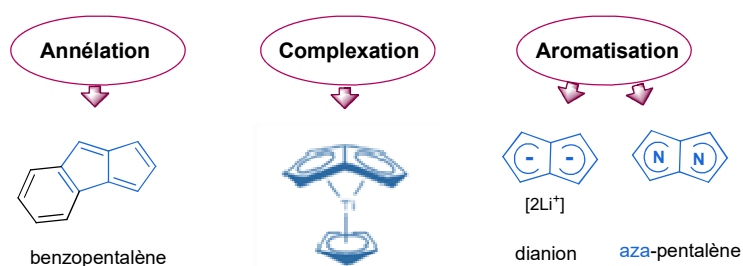
<sup>56</sup> Podlogar, B. L., Glauser, W. A., Rodriguez, W. R. & Raber, D. J. A conformational criterion for aromaticity and antiaromaticity. *J. Org. Chem.* **53**, 2127–2129 (1988).

<sup>57</sup> Vol'pin, M. E., Non-benzenoid aromatic compounds and the concept of aromaticity, *Uspekhi Khim.* **29**, 298 (1960)

<sup>58</sup> (a) Hafner, K., Pentalen - die Lösung eines alten Problems. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **28**, 222 – 226, (1980). (b) Bally, T., Chai, S., Neuenschwander, M. & Zhu, Z. Pentalene: Formation, Electronic, and Vibrational Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1869–1875 (1997).

<sup>59</sup> Le Goff, E. Aprotic Generation of Benzyne from Diphenyliodonium-2-Carboxylate. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 3786–3786 (1962).

Encouragés par ces premiers résultats, d'autres méthodes ont pu être identifiées pour stabiliser ce bicyclic (*Figure 43*). Les travaux de Brand mais aussi d'autres études, ont montré que l'annélation des pentalènes avec des systèmes aromatiques rend ces structures beaucoup plus stables (exemples des benzopentalène et dibenzopentalène).<sup>60</sup> Par ailleurs, Katz et Rosenberg ont montré que les pentalènes ont une très bonne affinité avec les métaux et que la formation des complexes métalliques les rend également très stables.<sup>61</sup> Enfin, une dernière alternative qui s'est avérée non seulement ingénieuse mais aussi efficace, est de convertir les pentalènes en systèmes à 10 électrons  $\pi$ , pour les rendre aromatiques. Ceci peut être réalisé *via* une double déprotonation avec la formation d'un dianion,<sup>59b</sup> ou par insertion d'au moins deux azotes pontés pour former des polyazapentalènes aromatiques.<sup>62</sup>



**Figure 43** : Méthodes de stabilisation des pentalènes.

## 2. Hétéropentalènes aromatiques

Alors que les pentalènes sont de nature anti-aromatique, plusieurs types d'hétéropentalènes peuvent être aromatiques. Les azapentalènes, en particulier, présentent un intérêt particulier car leurs propriétés peuvent être régies de manière saisissante en fonction de la position des azotes. Par exemple, la présence d'un ou plusieurs azotes sur les positions 1 à 6 du bicyclic conserve le caractère anti-aromatique alors que la présence de deux azotes sur les positions 3a et 6a rend ces structures aromatiques.<sup>63</sup> Parmi les diverses structures aromatiques possibles, la configuration qui nous intéresse tout particulièrement est le 1,3a,6a-triazapentalène.

### 2.1. 1,3a,6a-triazapentalènes

La présence de deux azotes sur les jonctions des deux cycles permet d'apporter les deux électrons supplémentaires pour obtenir un système à 10 électrons  $\pi$ . Cette configuration impose la formation d'un système dipolaire, avec une charge globale neutre.

<sup>60</sup> (a) Hopf, H. Pentalenes-From Highly Reactive Antiaromatics to Substrates for Material Science. *Angew. Chemie Int. Ed.* **52**, 12224–12226 (2013). (b) Saito, M. Synthesis and Reactions of Dibenzo[a,e]pentalenes. *Symmetry (Basel)*. **2**, 950–969 (2010). (c) Miao, S., Schleyer, P., Wu, J. I., Hardcastle, K. I., & Bunz, U. H. F. A Thiadiazole-Fused N,N-Dihydroquinoxaline: Antiaromatic but Isolable. *Org. Lett.* **9**, (6), 1073 - 1076, (2007)

<sup>61</sup> Katz, T. J. & Rosenberger, M. The Pentalenyl Dianion. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 865–866 (1962).

<sup>62</sup> Summerscales, O. T. & Cloke, F. G. N. The organometallic chemistry of pentalene. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 1122–1140 (2006)

<sup>63</sup> Elguero, J., Claramunt, R. M. & Summers, The chemistry of aromatic azapentalenes. *Advances in Heterocyclic Chemistry*. **22**, 183–320 (1978).

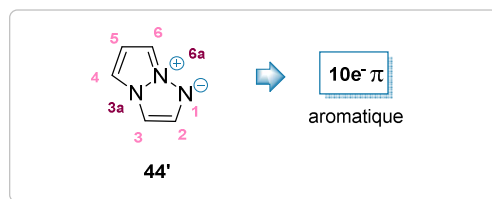


Figure 44 : Structure du 1,3a,6a-triazapentalène.

De part sa structure dichargée, le 1,3a,6a-triazapentalène appartient au groupe des composés mésoioniques (mésomérique + ionique).<sup>64</sup> Une classification plus précise des divers composés dichargés basée principalement sur l'emplacement des hétéroatomes, réalisé par Ramsden identifie le 1,3a,6a-triazapentalène aux composés mésoioniques de la classe B.<sup>65</sup> Comme son nom l'indique, la résonance induite par les deux charges génère plusieurs formes canoniques (a-c, Figure 45).

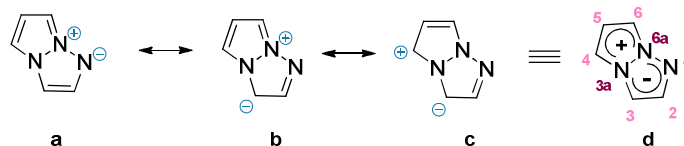


Figure 45 : Formes tautomères du 1,3a,6a-triazapentalène.

La notation (d) est par conséquent la notation la plus correcte, puisqu'elle prend en compte de l'ensemble des formes mésomères.

De manière encore plus marquée que les pentalènes, les azapentalènes, malgré leur caractère intéressant et prometteur, restent encore très peu exploités. Pour pouvoir accéder à ce type de structures électroniques peu habituel, quelques rares voies de synthèse ont été décrites. En raison de la faible stabilité des 1,3a,6a-triazapentalènes bicycliques, les premières synthèses indentifiées dans la littérature concernent essentiellement les analogues tricycliques et tétracycliques.

#### a) Analogues tricycliques du 1,3a,6a-triazapentalène

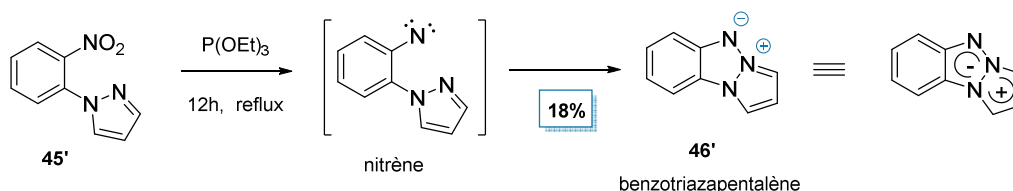
En 1965, Lynch et Hung ont proposé pour la première fois la synthèse d'un triazapentalène fusionné à un benzène (benzotriazapentalène).<sup>66</sup> Cette méthode consiste à obtenir un nitrène intermédiaire à partir du 1-(*o*-nitrophényl)pyrazole (**45'**) par la désoxygénation en présence de triéthylphosphite. La formation de la liaison N-N intramoléculaire par l'attaque de l'azote du pyrazole permet ensuite d'aboutir au composé (**46'**) souhaité (Figure 46).

<sup>64</sup> Baker W., & Ollis, W. D. Meso-Ionic Compounds, *Quart. Rev.* **11**, 15 (1957).

<sup>65</sup> Newton, C. G. & Ramsden, C. A. Meso-ionic heterocycles (1976–1980). *Tetrahedron*. **38**, 2965–3011 (1982).

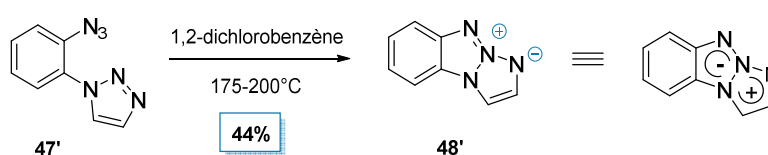
<sup>66</sup> Lynch, B. M. & Hung, Y.-Y. Pyrazolo[1,2-a]benzotriazole and related compounds. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **2**, 218–219 (1965).





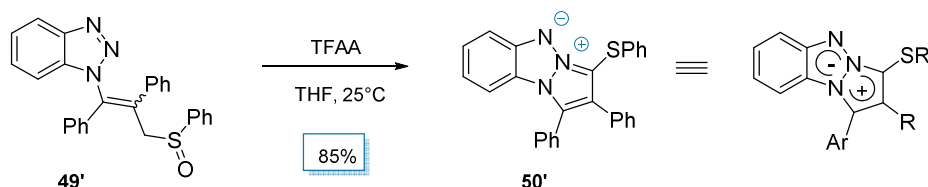
**Figure 46** : Synthèse du benzotriazapentalène (ou benzo-1,3a,6a-triazapentalène).

Une autre méthode proposée par l'équipe de Carboni consiste à former le composé d'intérêt tricyclique (**48'**) à partir de l'intermédiaire bicyclique (**47'**) dont l'azoture est ici le précurseur du nitrène.<sup>67</sup> La formation de l'espèce réactive est dans ce cas obtenue *via* une réaction de thermolyse (appelée aussi pyrolyse) dans le 1,2-dichlorobenzène (*Figure 47*).



**Figure 47** : Synthèse du benzotriazapentalène (**48'**).

Une méthode un peu plus récente utilisant une réaction de type Pummerer a été proposée par Park et *coll.*<sup>68</sup> Ici les azapentalènes tricycliques (**50'**) sont obtenus à partir de sulfoxydes de (benzotriazol-1-yl)allyle (**49'**) par cyclisation en présence d'anhydride trifluoroacétique (*Figure 48*). Cette méthode permet d'obtenir des triazapentalènes tricycliques polysubstitués avec des meilleurs rendements.



**Figure 48** : Synthèse de benzotriazapentalène *via* la réaction de Pummerer.

<sup>67</sup> Kauer, J. C. & Carboni, R. A. Aromatic azapentalenes. III. 1,3a,6,6a-Tetraazapentalenes. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 2633–2637 (1967).

<sup>68</sup> Kim, T., Kim, K. & Park, Y. J. A Novel Method for the Synthesis of 2,3-Benzo-1,3a,6a-triazapentalenes through Pummerer-Type Reactions of  $\gamma$ -(Benzotriazol-1-yl)allylic Sulfoxides. *Eur. J. Org. Chem.* **3**, 493–502 (2002).

## b) Analogues tétracycliques du 1,3a,6a-triazapentalène

Carboni et coll. se sont également intéressés à l'étude de structures tétracycliques du 1,3a,6a-triazapentalène. Les deux exemples étudiés sont : le dibenzo-1,3a,4,6a-tétrazapentalène (**53'**) et son analogue dibenzo-1,3a,6,6a-tétrazapentalène (**55'**).<sup>69</sup>

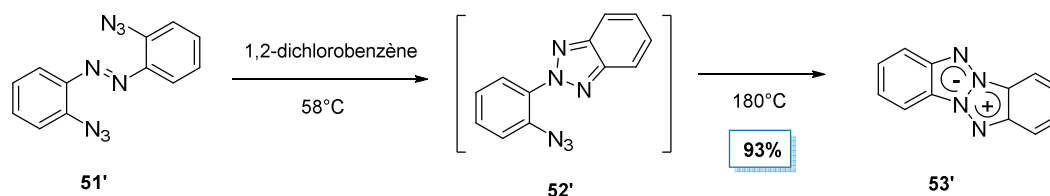


Figure 49 : Synthèse du dibenzo-1,3a,4,6a-tetraazapentalène (**53'**).

La structure linéaire (**53'**) est obtenue à partir du *o,o'*-diazidoazobenzène (**51'**) *via* une double cyclisation à partir des azotures. Il a été observé lors de l'étape de pyrolyse une première cyclisation intramoléculaire à 58°C conduisant à la formation de l'intermédiaire benzotriazole, suivie de la deuxième cyclisation qui débute à 180°C (Figure 49). Cette méthode conduit à la synthèse du composé désiré (**53'**) avec un excellent rendement. De la même manière, la synthèse de l'analogue tétracyclique courbé (**55'**) est réalisée par thermolyse à partir de l'intermédiaire (*o*-azidophenyle)-1*H*-benzotriazole (**54'**) (Figure 50).

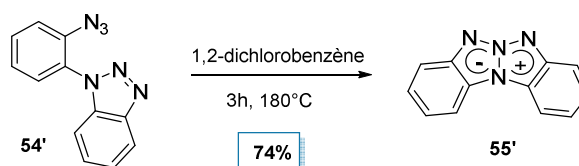


Figure 50 : Dibenzo-1,3a,6,6a-tetraazapentalène (**55'**).

Lors de ses travaux, Carboni met en avant l'importance de la conjugaison pour la stabilisation du noyau 1,3a,6a-triazapentalène central. La présence d'une conjugaison supplémentaire impacte la résonance du noyau polyazoté. Ainsi avec le composé (**55'**), une augmentation de la stabilité thermique (aucune dégradation n'est observée jusqu'à 300°C) et de la stabilité chimique en présence d'acides forts et d'oxydants comme  $\text{KMnO}_4$  a été observée.

<sup>69</sup> (a) Carboni, R. A. & Castle, J. E. Dibenzo-1,3a,4,6a-Tetraazapentalene-A New Heteroaromatic System. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 2453–2454 (1962). (b) Carboni, R. A., Kauer, J. C., Castle, J. E. & Simmons, H. E. Aromatic azapentalenes. I. Dibenzo-1,3a,4,6a-tetraazapentalene and dibenzo-1,3a,6,6a-tetraazapentalene. New heteroaromatic systems. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 2618–2625 (1967). (c) Carboni, R. A., Kauer, J. C., Hatchard, W. R. & Harder, R. J. Aromatic azapentalenes. II. Reactions of monobenzo- and dibenzo-1,3a,4,6a-tetraazapentalenes. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 2626–2633 (1967).

Balachari et *coll.* notent que la présence d'azotes supplémentaires dans les cycles apporte également un gain de stabilité notamment du point de vue thermique. Le composé (**60'**) ne se décompose qu'à partir de 396°C (vs. 300°C pour son analogue (**55'**)).<sup>70</sup>

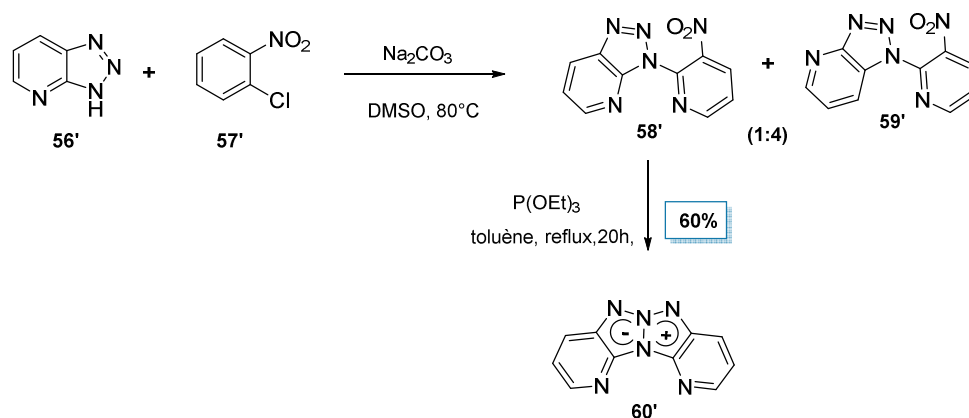


Figure 51 : Synthèse du dipyrdo-1,3a,6,6a-tetraazapentalene (**60'**).

D'autres exemples avec des méthodes semblables conduisant à la formation de triazapentalènes tétracycliques peuvent être considérés.<sup>71</sup>

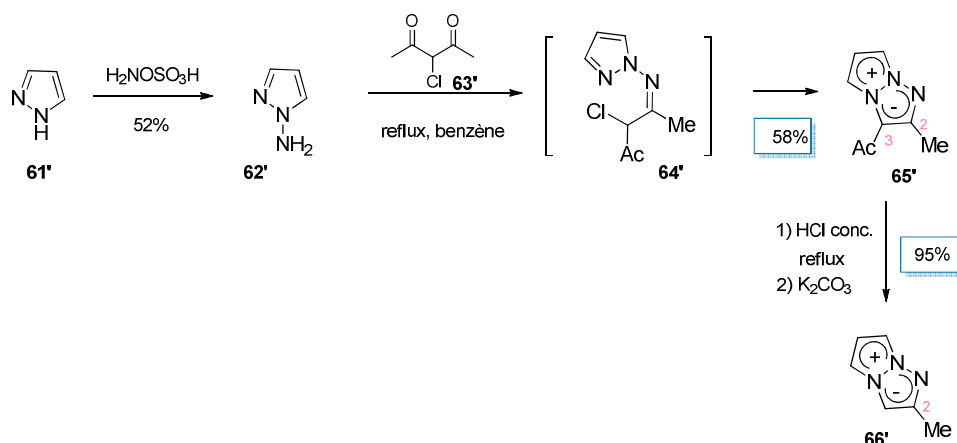
### c) Méthodes de synthèse de 1,3a,6a-triazapentalènes bicycliques

A cause de la faible stabilité des structure bicycliques, très peu d'exemples des analogues du 1,3a,6a-triazapentalène de ce type ont été rapportés. Un premier exemple a été développé par Hirobe et *coll.* en 1978.<sup>72</sup> Il s'agit de la synthèse du 1,3a,6a-triazapentalène substitué en position C<sup>2</sup> par un méthyle. La méthode comporte trois étapes et utilise le 1H-pyrazole comme substrat de départ (Figure 52). Après la réaction d'amination du pyrazole, le composé obtenu (**62'**) est mis en réaction avec le 2-chloroacétylacétone (**63'**) au reflux du benzène, permettant d'obtenir le motif triazapentalène di-substitué en position C<sup>2</sup> par un méthyle et en C<sup>3</sup> par un acétate (**64'**). La déacétylation en milieu acide suivie d'une neutralisation permet d'accéder avec un rendement de 95% à la structure bicyclique monosubstitué (**66'**).

<sup>70</sup> Balachari, D., Stevens, E. D., Trudell, M. L., Beardall, D. & Wight, C. A. Synthesis, Thermal Stability and Impact Stability of Novel Tetranitro-Dipyridotetraazapentalene Derivatives. *Propellants, Explos. Pyrotech.* **25**, 75–80 (2000).

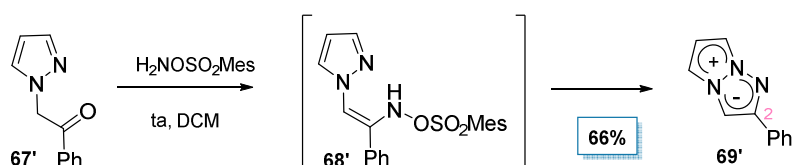
<sup>71</sup> (a) Tsuge, O. & Samura, H. Studies of polyazapentalenes. I. The preparation of 6-dehydroindazolo[1,2-a]benzotriazole. *J. Heterocycl. Chem.* **8**, 707–710 (1971). (b) Tsuge, O. & Samura, H. Studies of polyazapentalenes. II. The preparation of 1,3a,6a-triazapentalenes. *Org. Prep. Proced. Int.* **4**, 273–281 (1972). (c) Nunn, A. J. & Rowell, F. J. Synthesis and reactions of 12-aryl-1,2,3,4-tetrahydro-6H-indazolo-[2,1-a]benzotriazolium hydroxide inner salts and 8,9,10,11-tetrahydro-7,10,10-trimethyl-8-oxo-5H-indazolo[1,2-a]benzotriazolium hydroxide inner salt. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 629 (1975). (d) Lee, J. H., Matsumoto, A., Yoshida, M. & Simamura, O. New routes to 1,2-diazoles with a fused ring system by reductive and oxidative cyclizations. *Chem. Lett.* **3**, 951–954 (1974).

<sup>72</sup> Koga, H., Hirobe, M. & Okamoto, T. Mesionic 1,3a,6a-triazapentalenes. *Tetrahedron Lett.* **19**, 1291–1294 (1978).



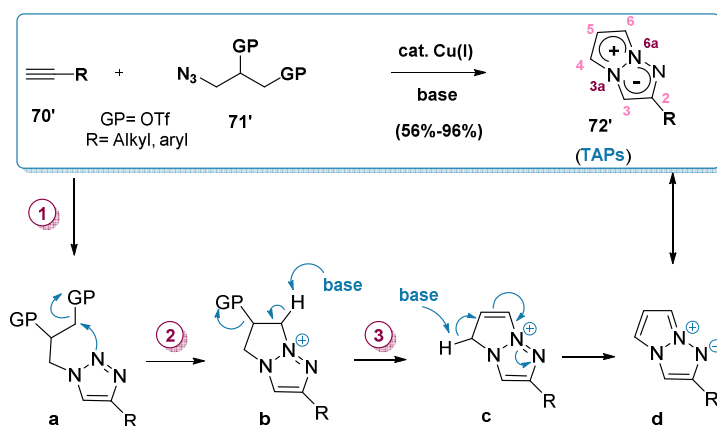
**Figure 52** : Synthèse de 2-méthyl- 1,3a,6a-triazapentalène (**66'**) rapporté par Hirobe et coll.

Un deuxième exemple présenté par les mêmes auteurs est la synthèse du 2-phényl-1,3a,6a-triazapentalène (**Figure 53**). La pyrazolyle-acétophénone (**67'**) interagit avec l'*o*-(mésitylsulfonyl)-hydroxylamine pour obtenir l'énamine intermédiaire qui *via* une cyclisation intramoléculaire par formation de la liaison N-N permet d'isoler le composé mésoionique (**69'**).



**Figure 53** : Synthèse de 2-phényl-1,3a,6a-triazapentalène (**69'**) rapportée par Hirobe et coll.

Très récemment, les azapentalènes aromatiques ont attiré l'attention de l'équipe du Pr Keiji Tanino et du Pr Kosuke Namba. Ainsi, en 2011 Namba et coll. reportent une première méthode générale permettant d'accéder aux structures bicycliques de type 1,3a,6a-triazapentalenes (également appelés **TAP**)<sup>73</sup> *via* une catalyse au cuivre.<sup>2</sup> Les composés d'intérêt sont dans ce cas monosubstitués en position C<sup>2</sup>, étant la position la plus facile d'accès (**Figure 54**). C'est un processus de type « one-pot » qui se déroule en trois étapes successives soit une réaction de "click-chemistry" puis une cyclisation et enfin une aromatisation, selon le mécanisme décrit dans la **Figure 54**.



**Figure 54** : Synthèse générale de noyaux TAPs.

<sup>73</sup> Note : abréviation utilisée par les auteurs.

La première étape est une réaction de type Huisgen réalisée à partir d'un azoture et d'un alcyne catalysée par du cuivre. L'intermédiaire (**a**) obtenu subit alors une cyclisation intramoléculaire, au cours de laquelle un premier groupement partant est éliminé par l'attaque nucléophile de l'azote central du triazole formé précédemment. Pour la troisième étape, la présence d'une base est requise, car elle permet de réaliser l'élimination du deuxième groupement partant. Puis une aromatisation finale permet d'accéder aux structures bicycliques avec d'excellents rendements. Cette méthode permet de varier le groupement R en utilisant différents alcynes. Cette réaction peut être réalisée dans des solvants organiques ou aqueux et à température ambiante.

La synthèse développée par Namba et coll., réalisée en présence du triméthylsilylacétylène permet d'accéder au 1,3a,6a-triazapentalène (**75'**) avec un groupement TMS sur la position C<sup>2</sup> (Figure 55). Ce dernier peut être facilement éliminé en présence de TBAF pour obtenir le triazapentalène (**76'**) non substitué. Les auteurs notent que la structure silylée (**75'**) est instable lors de purification sur colonne de gel de silice mais aussi sous l'irradiation à la lampe UV. Pour cette raison, elle a été engagée directement dans l'étape de déprotection, pour obtenir le triazapentalène non substitué avec un rendement de 46% sur les deux étapes.

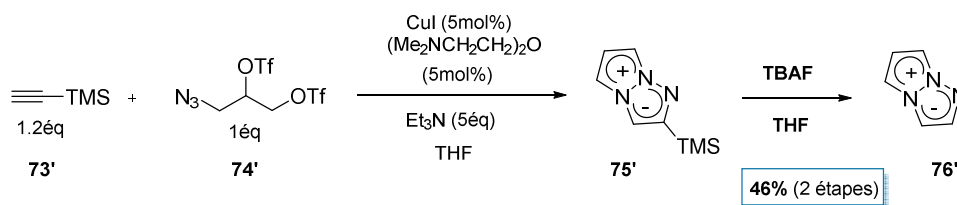


Figure 55 : Synthèse du 1,3a,6a-triazapentalène non substitué par Namba et coll.

En utilisant cette méthode, il est également possible d'obtenir des produits substitués en positions C<sup>4</sup> et C<sup>5</sup> du triazapentalène. Pour cela, il est nécessaire d'introduire les substituants en positions C<sup>2'</sup> et C<sup>3'</sup> de la chaîne carbonée de l'azoture (**77'**) avant la cyclisation (Figure 56).<sup>74</sup>

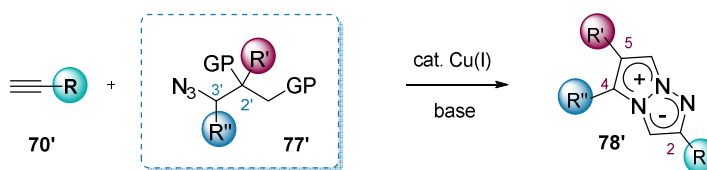


Figure 56 : Fonctionnalisation des positions C<sup>4</sup> et C<sup>5</sup> des triazapentalènes bicycliques.

Selon la voie de synthèse précédente, le groupe de Namba s'est intéressé aux triazapentalènes disubstitués en C<sup>2</sup>/C<sup>5</sup> et C<sup>2</sup>/C<sup>4</sup> afin d'évaluer l'effet d'un système donneur-accepteur, autrement dit «push-pull» sur les propriétés photophysiques du bicycle. Ainsi les composés de type C<sup>2</sup>/C<sup>5</sup> ont été obtenus selon le schéma décrit ci-dessous (Figure 57).

<sup>74</sup> (a) Namba, K. *et al.* One-Pot Synthesis of Highly Fluorescent 2,5-Disubstituted-1,3a,6a-triazapentalene. *Org. Lett.* **14**, 5554–5557 (2012). (b) Nakayama, A. *et al.* Substituent Effect at the C4-Position of 1,3a,6a-Triazapentalene. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **64**, 830–7 (2016). (c) Namba, K. *et al.* Synthesis of yellow and red fluorescent 1,3a,6a-triazapentalenes and the theoretical investigation of their optical properties. *Chem. Sci.* **6**, 1083–1093 (2015).

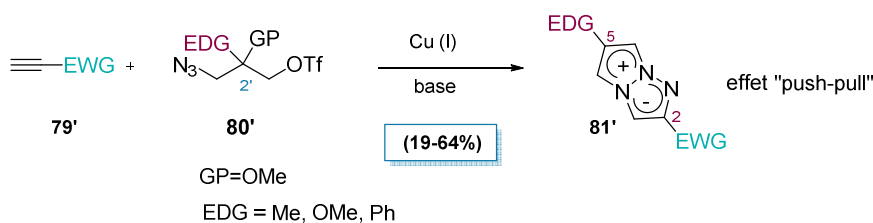


Figure 57 : Synthèse de 1,3a,6a-triazapentale 2,5-disubstitués (**81'**).

Dans ce cas, la position C<sup>2'</sup> de l'intermédiaire (**80'**) possède deux substituants : le groupement partant et le groupement électrodonneur. Quelques exemples de triazapentalènes ont été obtenus avec des rendements allant de faibles à bons. Notons que l'utilisation de substrats de départ plus fonctionnalisés, se traduit par une multiplication des étapes de synthèse et une diminution du rendement global.

Les composés de type C<sup>2</sup>/C<sup>4</sup> ont été obtenus à partir d'azotures fonctionnalisés sur la position C<sup>3'</sup> (Figure 58).<sup>75b</sup> En partant du méthyl- ou du phényltriflate, il a été possible d'accéder à des composés de type 4-méthyl ou 4-phényl 1,3a,6a-triazapentalènes avec des divers groupements électroattracteurs sur la position C<sup>2</sup>.

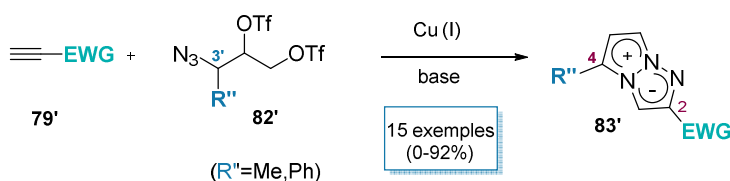


Figure 58 : Synthèse du 1,3a,6a-triazapentale 2,4-disubstitués.

En parallèle avec les travaux de Namba, Cai et *coll.* ont développé une méthode de synthèse pour accéder aux zwitterions bicycliques à partir des triazoles-alcynes.<sup>75</sup> Le motif triazapentalène (**85'**) est obtenu *via* une cyclisation intramoléculaire catalysée par l'or (Figure 59). Avec cette méthode, il est possible d'obtenir de nombreux exemples en faisant varier les groupements R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub> avec des rendements allant de bons à excellents. En revanche, cette approche est limitée par la synthèse de l'intermédiaire (**84'**) polyfonctionné complexe. L'enjeu ici est d'obtenir sélectivement l'isomère N<sup>2</sup> du triazole, en faveur du N<sup>1</sup> ou N<sup>3</sup>.

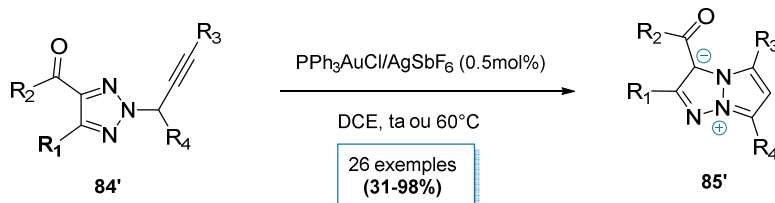


Figure 59 : Synthèse des analogues de TAP *via* la méthode de Cai *et coll.*

<sup>75</sup> Cai, R. *et al.* Facile synthesis of fluorescent active triazapentalenes through gold-catalyzed triazole-alkyne cyclization. *Chem. Commun.* **50**, 7303 (2014).

## 2.2. La fluorescence des 1,3a,6a-triazapentalènes

En dehors de leur méthode originale permettant l'accès à ces structures, Namba *et coll.* sont les premiers à noter le caractère fluorescent très prometteur des structures 1,3a,6a-triazapentalènes bicycliques (*Figure 60*).<sup>2</sup>

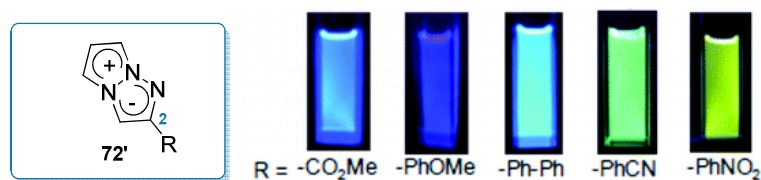


Figure 60 : Exemples de TAP fluorescents.

La fonctionnalisation du bicycle TAP a permis d'étudier et d'optimiser les propriétés spectroscopiques de cette nouvelle famille de fluorophores organiques. Par exemple, la présence d'un groupement phényle en C<sup>2</sup> permet d'améliorer considérablement le rendement quantique du squelette non fonctionnalisé et apporte un effet bathochrome qui conduit à des longueurs d'onde d'émission supérieures à 500 nm. Les diverses analyses ont montré que les meilleurs résultats en termes d'émission et de rendement quantique sont obtenus en utilisant des aryles substitués avec des groupements électroattracteurs tels que : nitro, cyano ou esters. De plus, l'augmentation du nombre de groupements électroattracteurs sur le phényle augmente l'effet bathochrome (*Figure 61*). Ainsi, la fonctionnalisation des positions *ortho* et *para* avec des groupements cyano et ester a permis d'identifier une petite molécule (**89'**) émettant dans le rouge ( $\lambda_{em} = 632$  nm) qui présente un déplacement de Stokes de 166 nm, une valeur remarquable et peu commune. Son rendement quantique n'est cependant que de 10% dans le DCM.<sup>74</sup>

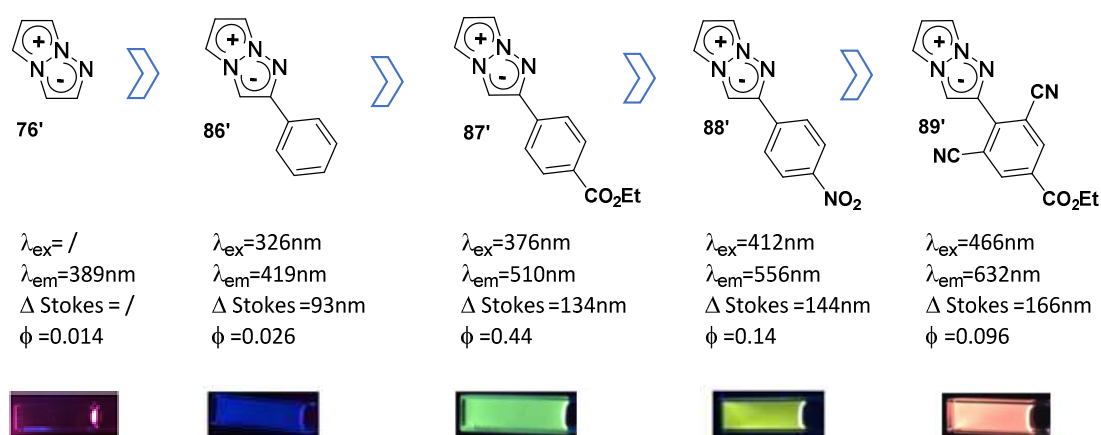
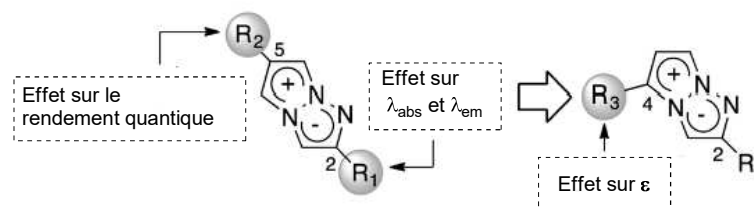


Figure 61 : Evolution des propriétés photophysiques des 1,3a,6a-triazapentalènes C<sup>2</sup>-substitués ; analysés dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> avec le 9,10-Diphenylanthracène (9,10-DPA) comme référence pour les calculs du rendement quantique. Effet sur le rendement quantique.

A travers diverses modifications structurales, les auteurs ont montré qu'il est possible de moduler les propriétés photophysiques en fonction de la position et de la nature des groupements  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$  (Figure 62).



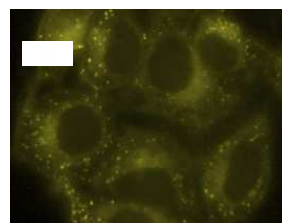
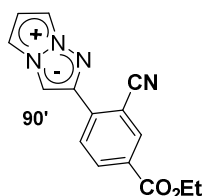
**Figure 62** : Positions substituées et leur effet sur les propriétés photophysiques du TAP.

#### a) *Evaluation des triazapentalènes fluorescents in vivo*

Afin de valoriser ces nouvelles structures fluorescentes, des tests d'imagerie cellulaire ont été réalisés. Comme le composé (**89'**) émettant dans le rouge présenté précédemment était peu stable, cette analyse a été réalisée sur son analogue (**90'**) comportant un groupement phényle fonctionnalisé (Figure 63a).<sup>75c</sup> Ainsi des cellules vivantes de type *HeLa* ont été traitées avec une solution du composé fluorescent dissout dans le DMSO (0,02%) avec une concentration de 10 mM (Figure 63b).

a)

$\lambda_{ex}$  = 420nm  
 $\lambda_{em}$  = 572nm  
 $\Delta$  Stokes = 152nm  
 $\phi$  = 0.34  
 $CH_2Cl_2$



**Figure 63** : Test de fluorescence sur cellules vivantes *HeLa* avec 10 $\mu$ M de composé fluorescent dissout dans 0,02% DMSO. Les cellules sont analysées sans un lavage préalable après l'incubation. L'image est obtenue à l'aide d'un microscope à fluorescence (BZ-9000, Keyence) ( $\lambda_{ex}$ =452nm (45 nm),  $\lambda_{em}$ =607nm (70nm)).

La visualisation des cellules par microscopie à fluorescence a permis de montrer la bonne pénétration du fluorophore à travers la membrane cellulaire mais aussi une distribution dans les lysosomes. De plus, la molécule choisie est décrite comme non toxique durant ces tests de fluorescence.

### 2.3. Les limitations des triazapentalènes fluorescents

Malgré les diverses caractéristiques intéressantes des triazapentalènes bicycliques décrites par Namba, comme des déplacements de Stokes importants, des longueurs d'onde d'émissions allant



jusqu'à 600 nm et des structures très compactes, ces composés souffrent de quelques limitations pour une utilisation en imagerie cellulaire.

#### a) Limitations liées à la synthèse

Une première limitation concerne le nombre de positions susceptibles d'être fonctionnalisées en égard aux voies de synthèse utilisées car seulement 3 positions sont accessibles ( $C^2$ ,  $C^4$  et  $C^5$ ). De plus, alors que les acétylènes sont faciles d'accès, la synthèse du deuxième intermédiaire comportant la fonction azoture limite la nature des groupements  $R'$  et  $R''$ . Alors que le groupement  $R$  a pu être changé par des groupements aromatiques appauvris ou riches en électrons, les positions  $C^4$  et  $C^5$  n'ont été que très peu modulées.

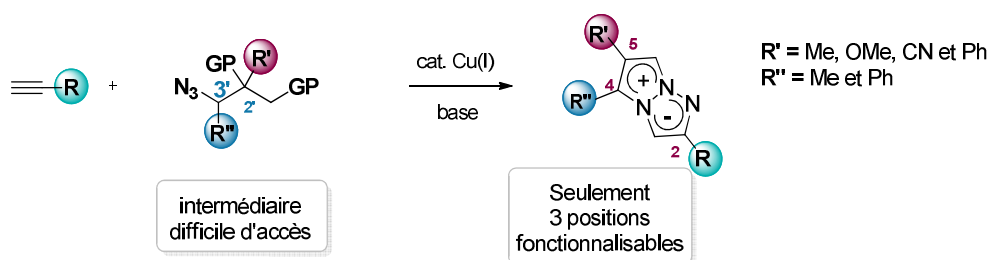


Figure 64 : Limitations liées à la synthèse des triazapentalènes bicycliques.

#### b) L'effet du pH

Il a été noté que la structure et les propriétés spectroscopiques des triazapentalènes sont dépendantes du pH. Ce phénomène a été remarqué lorsque certains composés étaient dissous dans le chloroforme deutéré, les solutions jaunes très claires devenaient bleues ou vertes.<sup>76</sup> Ce changement était dû à la présence des traces d'acide présent dans le solvant deutéré. Pour confirmer cette hypothèse, dix équivalents de TFA ont été ajoutés à une solution de 2-(4-cyanophényl)-TAP dans le dichlorométhane, et un changement de couleur du jaune vers le bleu a été constaté (Figure 65).

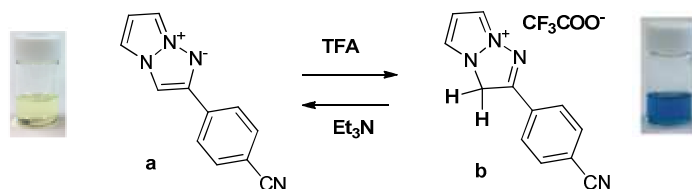


Figure 65 : Comportement des TAP en milieu basique et acide.

<sup>76</sup> Thèse de Ayumi Osawa: « Development and Application of 1,3a,6a-Triazapentalene Derivatives as a Novel Fluorescent Molecule ».

Un spectre d'absorption a été effectué dans les deux conditions et une modification du spectre a été observée avec l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption vers 650 nm. Cependant, aucune mention de fluorescence n'a été faite par l'équipe de Namba.

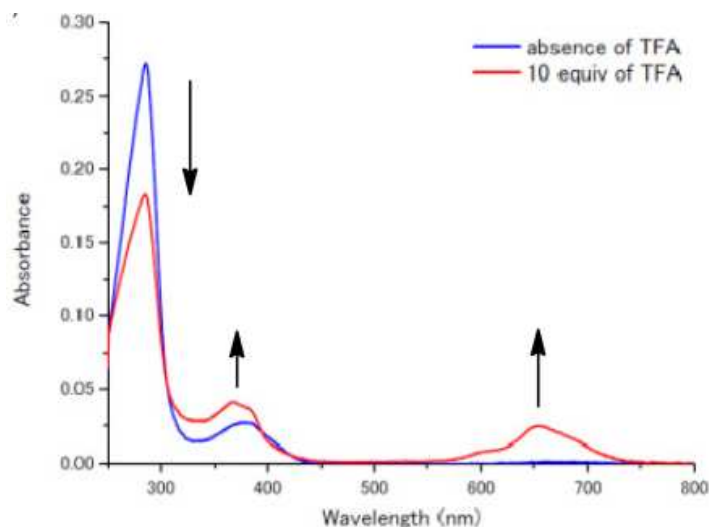


Figure 66 : Spectres d'absorption du 2-(4-cyanophenyl)-TAP avec et sans acide.

Ce processus reste réversible, car le traitement de la solution acidifiée avec la triéthylamine permet de récupérer les caractéristiques initiales du triazapentalène et ce même après plusieurs cycles d'acidification/basification.

### c) Brillance et photosensibilité

Lors de leurs derniers travaux sur les triazapentalènes, Namba *et coll.* ont remarqué que la fonctionnalisation des positions C<sup>2</sup>/C<sup>4</sup> permettait d'améliorer les valeurs des coefficients d'extinction molaire vis-à-vis des analogues fonctionnalisés seulement sur la position C<sup>2</sup>. Quelques exemples de ces structures sont représentées ci-dessous (Figure 67).

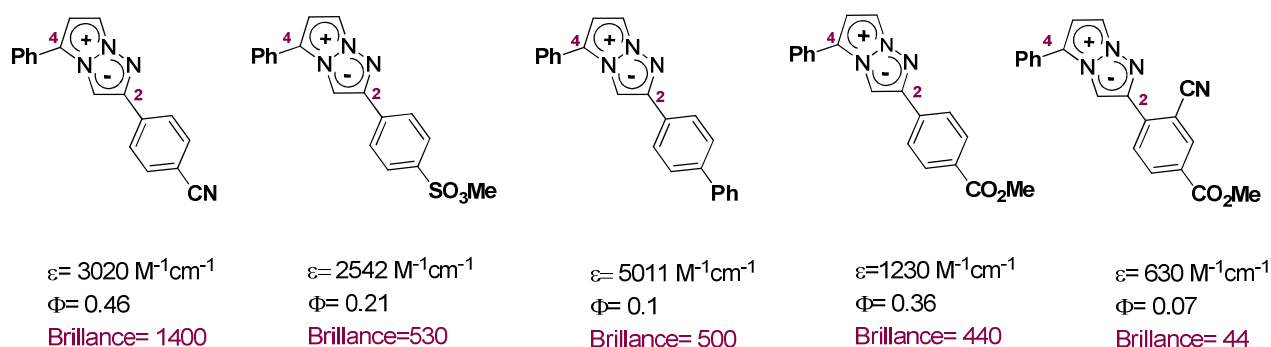
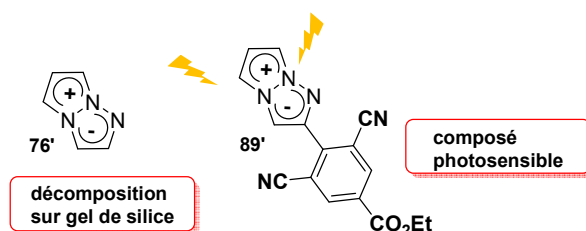


Figure 67 : Coefficients d'extinction et de brillance des 1,3a,6a-triazapentalènes disubstitués en C<sup>2</sup>/C<sup>4</sup> (molécules analysées dans le DCM)

Malgré cette hausse, les valeurs des coefficients d'extinctions molaires associées aux longueurs d'ondes d'excitations restent relativement basses (comprises entre 630 et 5000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). De plus il a été rapporté dans le même article qu'une autre conséquence de la fonctionnalisation en C<sup>4</sup> est la baisse du rendement quantique. Au final, ces faibles caractéristiques photophysiques conduisent à une brillance de ces composés assez modeste (comprise entre 44 et 1400).

Des limitations concernant la stabilité de ces structures ont été également observées. Il est à noter que certains de ces composés sont photosensibles (dégradation durant l'exposition à la lumière UV) comme le composé rouge comportant un phényle trisubstitué (*Figure 68*) qui n'a pas pu être testé *in vitro*.<sup>76c</sup>



**Figure 68** : Exemples de 1,3a,6a-triazapentalènes photosensibles.

### 3. Conclusion

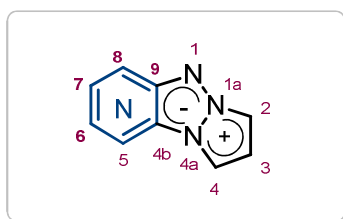
Comme nous avons pu le voir, des avancées considérables ont été réalisées dans le domaine des triazapentalènes ces dernières années. Namba *et coll.* ont proposé une nouvelle méthode de type « one-pot » qui permet d'accéder avec de très bons rendements aux structures de type 1,3a,6a-triazapentalène. De plus ils ont été les premiers à mettre en avant la fluorescence de ce motif bicyclique. Ainsi durant les cinq dernières années, ils ont mis en avant les bons rendements quantiques (allant jusqu'à 57%) et les déplacements de Stokes pouvant aller jusqu'à 170 nm. Ils ont également montré à l'aide de calculs théoriques et de fonctionnalisations judicieuses que certaines structures pouvaient fluorescer à des  $\lambda_{em} > 550\text{nm}$ .

Malgré les nombreux avantages que présentent ces petites structures, quelques problématiques subsistent, comme les faibles coefficients d'extinction molaires, une synthèse laborieuse des produits de départ et une fonctionnalisation limitée qui réduisent le panel d'application de ces structures inédites. De plus, certaines structures ne sont pas photostables et voient leurs propriétés photophysiques changer en fonction du pH.

Ayant pour ambition d'identifier de nouveaux composés fluorescents et de part l'expérience du laboratoire dans la synthèse des motifs triazapentalènes, nous nous sommes intéressés à cette classe de fluorophores dans le but de proposer des sondes fluorescentes optimisées pour une utilisation en imagerie cellulaire et se différenciant des autres sondes conventionnellement utilisées par les biologistes.



Partie B : Synthèse de nouveaux fluorophores tricycliques analogues  
du 1,3a,6a-triazapentalène





## Chapitre 1: Positionnement du sujet

Eu égard aux derniers travaux sur les triazapentalènes et aux limitations associées, le but de ce premier chapitre est de faire part des diverses solutions que nous avons envisagées pour améliorer la stabilité et les performances de fluorescence de ces structures originales. Notre raisonnement s'appuie sur les travaux antérieurs réalisés au sein de notre équipe sur la synthèse de triazapentalènes tricycliques.

### 1. Les travaux antérieurs de l'équipe

En parallèle avec l'équipe de Namba, notre laboratoire s'est intéressé à la synthèse des structures tricycliques comportant le motif 1,3a,6a-triazapentalène, dont la polynitration ouvre des applications dans le domaine des matériaux énergétiques.<sup>77</sup>

Lors de ces études, il a été développé une méthodologie de synthèse permettant d'accéder aux composés appartenant à la série « pyrido-1,3a,6a-triazapentalènes » (Figure 69).<sup>78</sup> La méthode consiste à synthétiser les composés tricycliques attendus à partir de dérivés de pyrazole fonctionnalisés (ou non) et de nitro-pyridines chlorés. Les composés mésoioniques d'intérêt ont été ainsi préparés en deux étapes : par une substitution nucléophile aromatique suivie d'une cyclisation intramoléculaire.

C. Nyffenegger et coll. / *Tetrahedron* 2008, 64, 9567-9573

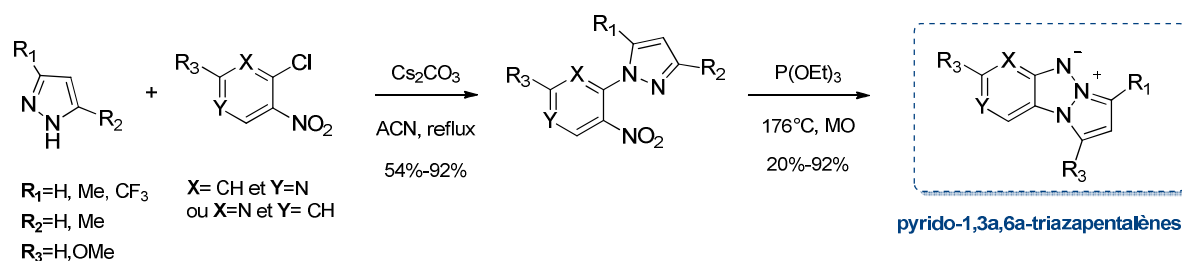


Figure 69 : Synthèse des analogues de « pyrido-1,3a,6a-triazapentalènes ».

Dans le but d'améliorer les performances énergétiques de ces structures tricycliques, notre groupe s'est intéressé à la synthèse d'analogues comportant des groupements nitro (groupements explosophores) et le motif 1,3a,6a-triazapentalène a été fusionné à un noyau pyrazine.<sup>79</sup> Ce type de structures a été synthétisé selon la voie synthétique décrite dans la Figure 70. Elle consiste en une substitution nucléophile aromatique de la 2-azido-3-chloropyrazine par divers analogues azoliques

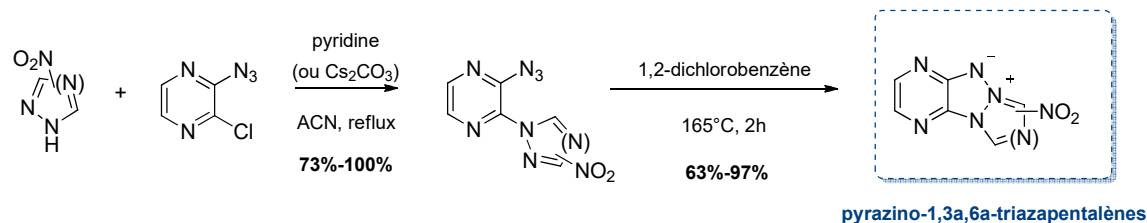
<sup>77</sup> Nyffenegger, C., Pasquinet, E., Suzenet, F., Poullain, D. & Guillaumet, G. Synthèse de molécules tricycliques polyazotées énergétiques; *CHOCS - Revue Scientifique et Technique de la Direction des Applications Militaires* 41-42, (2009)

<sup>78</sup> Nyffenegger, C., Pasquinet, E., Suzenet, F., Poullain, D., Jarry, C., Leger, J. M. & Guillaumet, G. An efficient route to polynitrogen-fused tricycles via a nitrene-mediated N-N bond formation under microwave irradiation; *Tetrahedron*, **64**, 9567-9573, (2008)

<sup>79</sup> Nyffenegger, C., Pasquinet, E., Suzenet, F., Poullain, D. & Guillaumet, G. Synthesis of nitro-functionalized polynitrogen tricycles bearing a central 1,2,3-triazolium ylide. *Synlett*, **8**, 1318-1320, (2009)

nitrés. Cette première étape est ensuite suivie d'une cyclisation intramoléculaire *via* la formation d'un nitrène intermédiaire.

C. Nyffenegger et coll. / Synlett 2009, 1318-1320

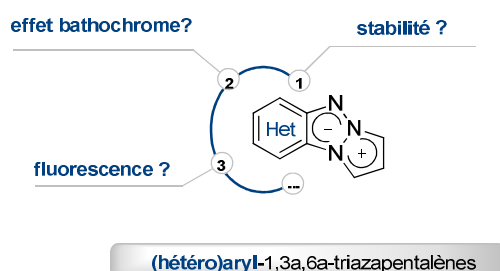


**Figure 70 :** Synthèse de pyrazino-1,3a,6a-triazapentalènes nitrés.

Un autre volet de ce travail a reposé sur l'étude spectroscopique détaillée de ce type de structures polyazotés et dichargées à l'aide de la RMN de proton de carbone (1D et 2D) et d'une étude inédite de l'azote 15.<sup>80</sup>

## 2. Objectifs et structures générales visées

Intrigués par l'originalité du motif 1,3a,6a-triazapentalène et par ses propriétés photophysiques prometteuses et encore très peu exploitées, notre priorité a été de concevoir des structures moléculaires inédites comportant ce motif bicyclique. Pour remédier aux limitations des triazapentalènes fluorescents évoqués dans le chapitre précédent et basés sur l'expérience du laboratoire dans la synthèse des hétérocycles polyazotés, nous nous sommes intéressés aux triazapentalènes fusionnés à des noyaux (hétéro)aromatiques (*Figure 71*).



**Figure 71 :** Structures générales visées.

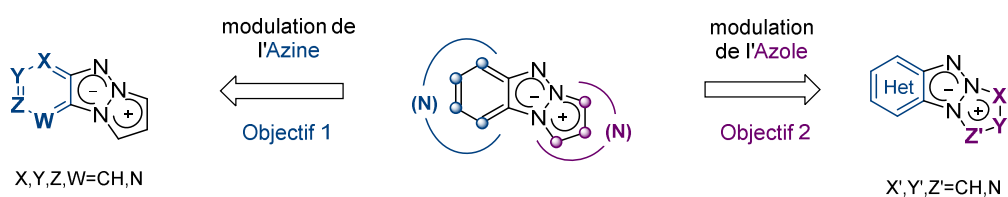
Ce type d'annélation s'est déjà montré efficace dans plusieurs cas, comme par exemple dans la stabilisation des pentalènes sensibles (*chapitre 2, partie A*).<sup>70b</sup> De surcroît, la présence d'un système conjugué supplémentaire pourrait induire un effet bathochrome permettant de déplacer les bandes d'absorption et d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées.

<sup>80</sup> Palmas, P., Nyffenegger, C., Pasquinet, E. &Guillaumet, G. 1H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR spectral assignments for new triazapentalene derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **47**, 752-756, (2009).



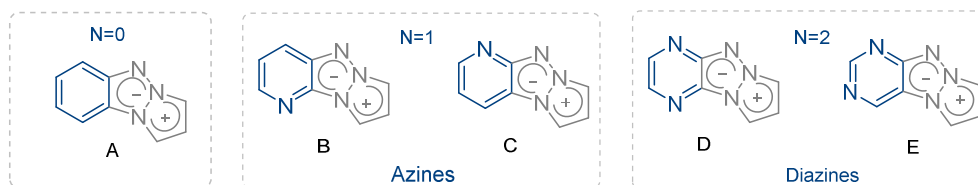
Durant les travaux réalisés récemment au laboratoire dans la série « triazapentalène », il a été observé que certains analogues tricycliques mésoioniques contenant des azotes dans le cycle fusionné montraient des propriétés de fluorescence apparentes alors que leurs analogues non azotés comme le (benzo)triazapentalène, ont été décrits comme non fluorescents.<sup>81</sup> Basée sur ces observations et sur notre volonté d'identifier de nouveaux motifs fluorescents, notre ambition est de réaliser une étude plus approfondie de la famille des (hétéro)aryl-1,3a,6a-triazapentalènes.

Dans ce contexte, notre but est d'étudier l'effet induit par la présence d'un hétérocycle additionnel sur les propriétés de fluorescence du motif 1,3a,6a-triazapentalène. Ce travail s'est réparti en deux objectifs illustrés par la *Figure 72*, basés sur l'effet du nombre et de la position des azotes sur l'ensemble du tricycle.



**Figure 72 :** Modulation de l'Azine et de l'Azole.

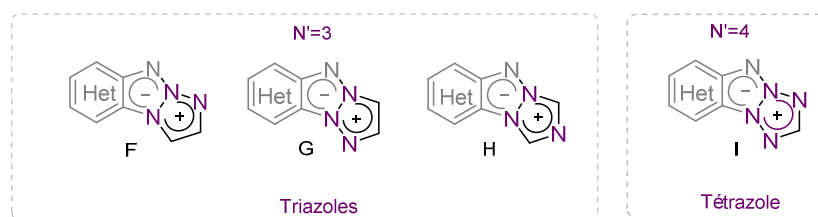
Le premier objectif vise à étudier l'effet induit par la présence d'azotes dans le cycle à 6 chaînons (objectif 1, *Figure 72*). Pour cela, les synthèses de motifs tricycliques contenant des azines de type pyridinique (**B**) et (**C**)<sup>77</sup>, et des diazines de type pyrazinique (**D**)<sup>78</sup>, et pyrimidinique(**E**) sont envisagées (*Figure 73*). La synthèse du (benzo)triazapentalène (**A**), analogue non azoté, est également envisagée comme élément de comparaison des propriétés spectroscopiques.



**Figure 73 :** Structures visées avec la modulation de l'azine (N= nb. d'azotes dans le cycle à 6 chaînons).

Le candidat issu de cette première étude présentant les meilleures propriétés de fluorescence, sera engagé dans une deuxième série d'optimisations structurales qui portera sur la modulation du cycle azole (objectif 2, *Figure 72*). Nous envisageons d'utiliser différents analogues azotés de la famille du pyrazole à savoir : des triazoles et des tétrazoles (*Figure 74*).

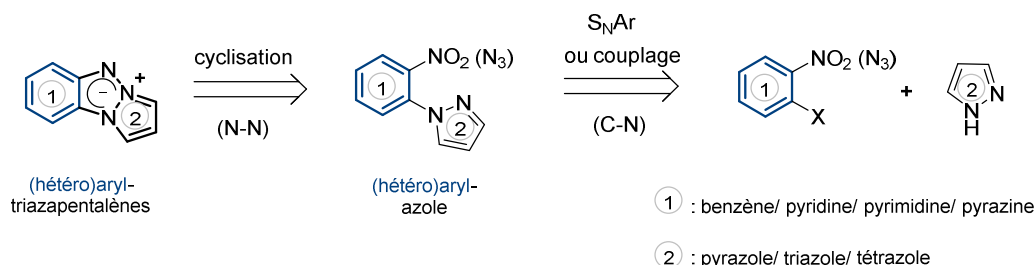
<sup>81</sup>Lynch, B. M. & Hung, Y.-Y. Pyrazolo[1,2-a]benzotriazole and related compounds. *J. Heterocycl. Chem.* **2**, 218–219 (1965).



**Figure 74** : Structures visées avec la modulation de l'azole ( $N'$  = nb. d'azotes dans le cycle à 5 chaînons terminal).

### 3. Méthodes générales de synthèse

En nous basant sur les résultats du laboratoire et sur les résultats issus de la bibliographie décrites précédemment, nous envisageons d'obtenir les (hétéro)aryl-1,3a,6a-triazapentalènes selon la voie rétrosynthétique générale schématisée ci-dessous (*Figure 75*).



**Figure 75** : Voie rétrosynthétique générale envisagée.

Cette stratégie vise l'obtention des composés tricycliques d'intérêt à partir des intermédiaires bicycliques comportant soit un groupement nitro, soit un azoture. Ces deux fonctions azotées sont des précurseurs du nitrène, nitrène qui est impliqué dans la cyclisation intramoléculaire avec la formation d'une liaison N-N. Le (hétéro)aryl-azole intermédiaire serait obtenu par des réactions de substitution nucléophile aromatique, ou par une réaction de *N*-arylation catalysée par des métaux de transition (de type Ullmann ou Buchwald-Hartwig). Le choix de l'une ou l'autre des deux méthodes sera fonction de la réactivité des dérivés halogénés et de la nucléophilie de l'azole employé. Ainsi, les méthodes de couplage seront privilégiées uniquement dans les cas où la  $S_NAr$  ne sera pas envisageable.

#### 3.1. Etat de l'art sur la formation de la liaison N-N et C-N

La formation des liaisons N-N et C-N étant les étapes clés de la stratégie générale de synthèse proposée (*Figure 75*), il semble donc opportun de faire quelques rappels sur les grandes méthodes décrites dans la littérature. Il s'agit dans un premier temps de présenter les méthodes principales permettant de former la liaison N-N et d'évoquer l'importance du nitrène dans ce processus. Dans la deuxième partie sont présentées les méthodes de formation des liaisons C-N en se focalisant plus sur les dernières avancées concernant la *N*-arylation des azoles.

## a) La formation de la liaison N-N : Cyclisation via les nitrènes

## ➤ Quelques généralités sur les nitrènes

Tout comme les carbènes, les nitrènes sont des espèces moléculaires neutres et hautement réactives, contenant un azote monovalent. Leur forte réactivité est le résultat d'une déficience électronique, ayant seulement 6 électrons sur la couche externe. Selon la répartition de ces électrons deux états peuvent être considérés : l'état triplet et l'état singulet (Figure 76).

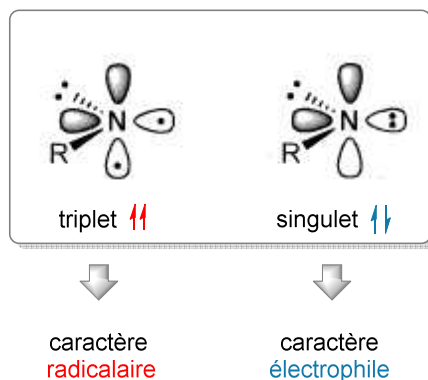


Figure 76 : Les deux états électroniques du nitrène.

L'état triplet est l'état le moins énergétique, appelé également « l'état fondamental » du nitrène. Dans ce cas, l'ensemble des orbitales externes est occupé, laissant les deux orbitales  $p$  avec un seul électron chacun. A l'opposé, dans l'état singulet les deux électrons sont appariés laissant une orbitale  $p$  vacante. Cette deuxième répartition est contraire aux règles de Hund et est donc caractérisée par une énergie plus importante que celle de l'état triplet. En pratique, cette différence énergétique et électronique des deux espèces se traduit par une différence de réactivité. En règle général le nitrène triplet réagit comme une entité radicalaire, alors que l'espèce singulet sera caractérisée par un fort caractère électrophile dû à la présence de la case vacante.<sup>82</sup>

## ➤ La formation des nitrènes

Photolyse/thermolyse

De manière générale, la photolyse et la thermolyse des azotures sont les méthodes les plus couramment utilisées pour générer les nitrènes. Les deux approches supposent la formation de l'espèce réactive par une décomposition de l'azoture sous l'effet de la lumière ou de la chaleur. Dans certains cas, le choix judicieux de paramètres réactionnels (comme le solvant ou le photosensibilisateur) permet de contrôler la nature électronique du nitrène formé. A titre d'exemple, dans le cas de la photolyse, l'absorption indirecte de l'énergie par l'intermédiaire des agents sensibilisateurs (acétophénone, pyrène) conduisent à la formation de la forme triplet. A l'opposé,

<sup>82</sup> P. A. S. Smith, in Nitrenes, W. Lwowski (ed.), Interscience, New York, NY, 1970, pp. 99-162

l'irradiation directe du substrat aromatique comportant l'azoture conduit à la formation du nitrène singulet.<sup>83</sup>

Il est important de noter qu'un nitrène à l'état singulet peut évoluer vers l'état triplet qui est plus stable, *via* un processus de relaxation (Figure 77).

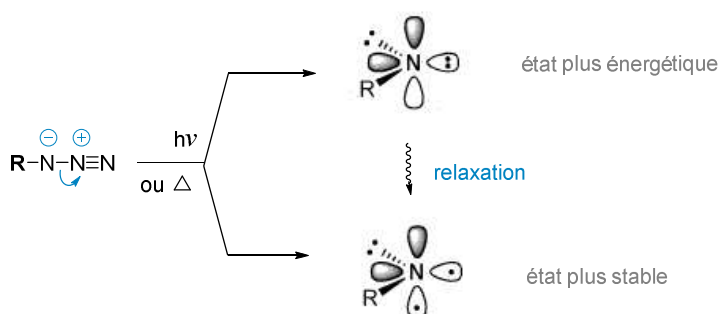


Figure 77 : Formation et évolution des nitrènes.

La formation des nitrènes *via* la thermolyse, ou la pyrolyse, nécessite de températures comprises entre 100 et 180°C. Ainsi l'utilisation de solvants à haut point d'ébullition comme la décàline, le diglyme, le cumène, le xylène, ou encore plus récemment le 1,2-dichlorobenzène sont courants.<sup>69</sup> Les milieux réactionnels sont généralement dilués afin de minimiser la réaction intermoléculaire conduisant à la polymérisation des substrats.

#### Désoxygénation des hétéroaryles nitrés

L'obtention des nitrènes par la réaction de désoxygénation s'effectue à partir des substrats comportant un groupement nitro ou nitroso en présence d'un phosphore trivalent (généralement la triéthylphosphite). Le mécanisme de désoxygénation est présenté ci-après (Figure 78).

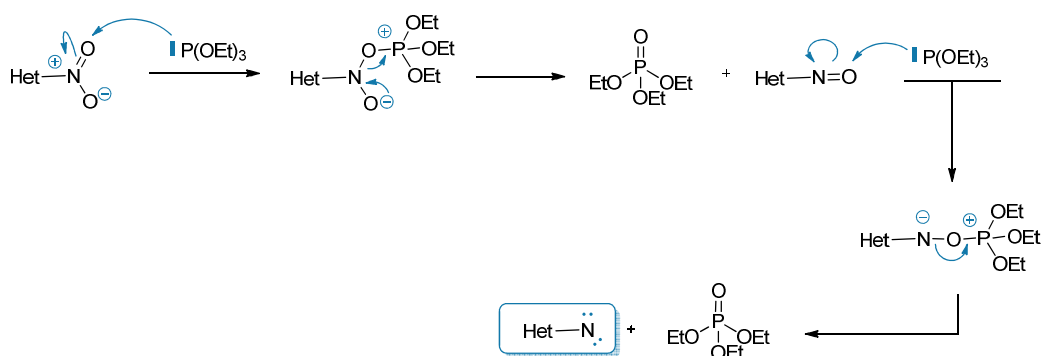


Figure 78 : Formation des nitrènes par désoxygénation.

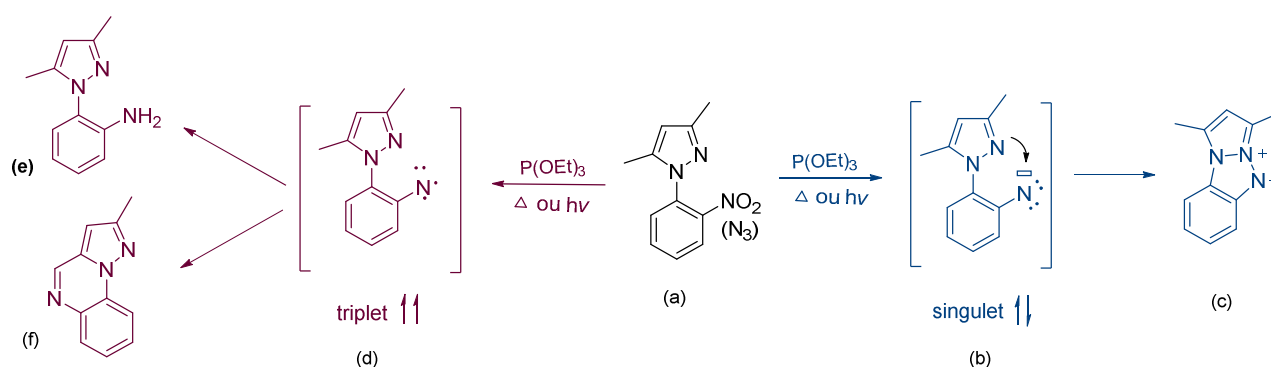
<sup>83</sup> Swenton, J. S., Ikeler, T. J. & Williams, B. H. Photochemistry of singlet and triplet azide excited states. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 3103–3109 (1970).

Ce mécanisme révisé,<sup>84</sup> comporte deux étapes clés nécessitant deux équivalents d'agent désoxygénant. Dans un premier temps, le groupement nitro est transformé en nitroso avec la consommation du premier équivalent de triéthylphosphite et libération de la phosphine. Le deuxième équivalent de phosphite réagit ensuite avec le groupement nitroso pour générer le nitrène avec une deuxième libération de l'espèce oxydée.

L'obtention des nitrènes par cette méthode requiert souvent un temps de réaction plus long et une température plus élevée par rapport à la thermolyse des azotures. En revanche, les composés nitrés sont souvent plus faciles d'accès, plus stables et nécessitent des précautions d'emplois moins drastiques que dans le cas des azotures organiques. Par conséquent le choix entre la thermolyse ou la désoxygénation dépendra essentiellement de la disponibilité et de la stabilité des produits de départ.

➤ *La réactivité de nitrènes : Formation de la liaison N-intramoléculaire*

Une étude très riche sur les cyclisations intramoléculaires et la compétitivité des nitrènes triplet et singulet a été réalisée par l'équipe de Meth-Cohn.<sup>85</sup> La molécule modèle utilisée est le 1-(2-nitrenophényl)-3,5-diméthylpyrazoles sous sa forme singulet (**b**) ou triplet (**d**), obtenue à partir du dérivé nitré ou azoture (**a**). A partir de ce modèle ils ont pu montrer les diverses possibilités qui peuvent se présenter en fonction de la nature du nitrène formé (*Figure 79*).



**Figure 79** : Compétition entre le nitrène singulet et triplet.

Selon cette étude, la seule option qui permet d'obtenir le (benzo)triazapentalène (**c**), *via* la formation la liaison N-N, consiste à passer par un nitrène singulet. Dans ce cas, une cyclisation intramoléculaire fait suite à l'attaque d'un azote nucléophile du pyrazole sur l'azote électrophile du nitrène. Lorsque le nitrène triplet est formé, son caractère radicalaire engendre la formation de

<sup>84</sup> (a) Sundberg, R. J. Deoxygenation of Nitro Groups by Trivalent Phosphorus. Indoles from o-Nitrostyrenes. *J. Org. Chem.* **30**, 3604–3610 (1965). (b) Smolinsky, G. & Feuer, B. I. Deoxygenation of Nitro Groups. The Question of Nitrene Formation. *J. Org. Chem.* **31**, 3882–3884 (1966). (c) Lwowski, W. Nitrenes. Wiley-Intersciences, New York, p. 170, (1970)

<sup>85</sup> Lindley, J. M., McRobbie, I. M., Meth-Cohn, O. & Suschitzky, H. Competitive cyclisations of singlet and triplet nitrenes. Part 8. The 1-(2-nitrenophenyl)pyrazoles and related systems. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 982 (1980).

divers sous-produits tels que l'aniline (**e**) par hydrogénation du nitrène, ou le composé tricyclique (**f**) *via* la formation de liaison C-N.

Ces études menées par Meth-Cohn et *coll.* révèlent une dépendance non négligeable entre la nature du nitrène formé et la nature des solvants. Un autre facteur important est la nature des groupements présents sur le noyau benzénique et sur le pyrazole du substrat de départ (**a**). Il a été montré que l'appauvrissement de la partie benzénique par l'ajout des groupements attracteurs accroît le caractère électrophile du nitrène. De la même manière, la présence des groupements donneurs sur le noyau azolique renforce son caractère nucléophile et favorise la formation de la liaison N-N. A l'opposé, l'enrichissement du cycle benzénique et l'appauvrissement électronique du pyrazole contribuent à la stabilisation du nitrène triplet conduisant à la formation des sous-produits (**e**) et (**f**).

Il a été montré également que la présence du cuivre dans le milieu déplace l'équilibre vers la formation de l'espèce triplet et que la présence de l'oxygène conduit essentiellement à la dégradation. Pour cette raison il semble préférable de réaliser les thermolyses en absence de cuivre et sous atmosphère inerte.

#### b) La formation de la liaison C-N : Le couplage d'Ullmann

Une des méthodes les plus courantes pour accéder à des *N*-arylpyrazoles, consiste à construire le noyau azolique *via* une cyclo condensation sur des structures 1,3-difonctionnalisées (voie A, Figure 80). Un exemple est la réaction de Knorr qui permet d'obtenir le noyau azolique à partir d'une hydrazine et d'un dérivé 1,3-dicarbonylé.<sup>86</sup> Une des alternatives possibles est la synthèse des aryles pyrazoles au départ de 1*H*-pyrazole par substitution nucléophile aromatique ou encore *via* des réactions métallo-catalysées de type Ullmann (voie B, Figure 80).

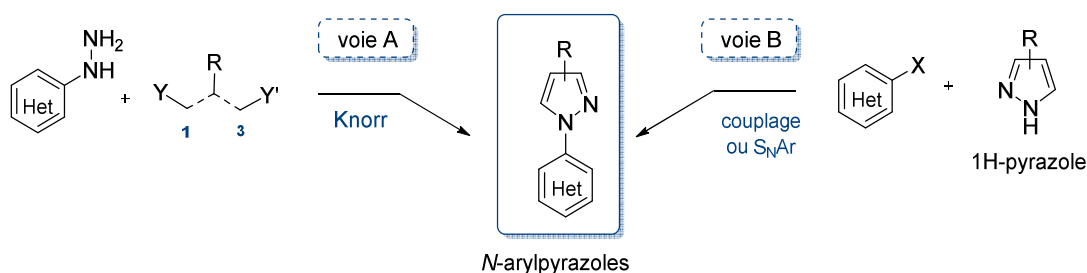


Figure 80 : Méthodes générales pour la synthèse de *N*-aryle pyrazoles.

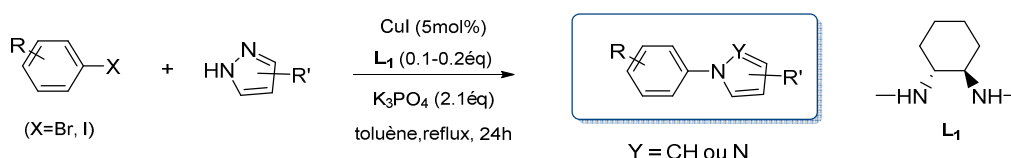
Le couplage d'Ullmann a été mis au point par Fritz Ullmann et Jean Bielecki en 1901.<sup>87</sup> La version classique d'un couplage dit d'Ullmann consiste à obtenir des biphényles substitués à partir d'halogénures d'aryle *via* une catalyse au cuivre. Quelques années après, cette méthodologie a été

<sup>86</sup> (a) Knorr, L. Einwirkung von Acetessigester auf Phenylhydrazin. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft.* **16**, 2597–2599 (1883). (b) Li, J. J. & Corey, E. J. *Name Reactions in Heterocyclic Chemistry II*. (Wiley, 2011).

<sup>87</sup> Ullmann, F. & Bielecki, J. Ueber Synthesen in der Biphenylreihe. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft.* **34**, 2174–2185 (1901).

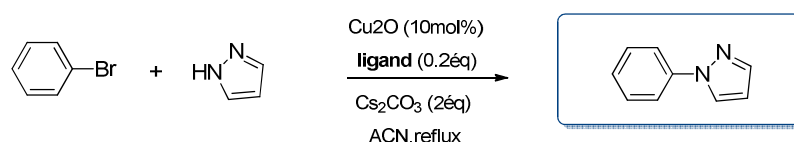
appliquée à la synthèse de *N*-aryles aminées avec l'utilisation d'une quantité stœchiométrique de cuivre.<sup>88</sup> Depuis cette découverte, de nombreuses équipes ont cherché à élargir les contours de cette réaction et à comprendre ses divers aspects mécanistiques.<sup>89</sup>

Les méthodes conventionnelles de *N*-arylation impliquent généralement l'utilisation de la 1,10-phénantroline ou des dérivés du diaminocyclohexane comme ligands.<sup>90</sup> L'équipe de Buchwald, par exemple, a mis au point une méthode utilisant de l'iodure de cuivre comme espèce catalytique qui peut être appliquée à une large variété d'azoles (pyroles, pyrazoles, indazoles, imidazoles et triazoles).<sup>91</sup> Le ligand qui s'est montré le plus efficace pour ce type de réaction est un ligand diaminé chiral (**L**<sub>1</sub>), un composé très accessible et peu cher (*Figure 81*).



**Figure 81** : *N*-arylation des azoles *via* la méthode de Buchwald.

Quelques années après, le groupe de Taillefer s'est essentiellement concentré sur la réaction de *N*-arylation de pyrazoles en présence de bromo- ou d'iodoaryles.<sup>92</sup> Sur la base d'une réaction modèle entre le pyrazole et le bromobenzène, les auteurs ont identifié les meilleures conditions opératoires pour le couplage, à savoir : l'utilisation d'oxyde de cuivre (I) et de carbonate de césium dans l'acétonitrile (*Figure 82*).



**Figure 82** : Réaction modèle pour la synthèse du phenyl-1H-pyrazole décrite par Taillefer.

Un criblage de différents ligands usuels (comme la 1,10-phénantroline (**a**) ou la diamine (**b**)) et de ligands moins conventionnels (comme des bases de Schiff, des oxazolines, des oximes, des guanidines, des urées, des hydrazines ainsi que des carbènes) a ensuite permis de mettre en avant

<sup>88</sup> Ullmann, F. & Sponagel, P. Ueber die Phenylirung von Phenolen. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*. **38**, 2211–2212 (1905).

<sup>89</sup> Sambiaro, C. *et al.* Copper catalysed Ullmann type chemistry: from mechanistic aspects to modern development. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 3525 (2014).

<sup>90</sup> Kiyomori, A., Marcoux, J.-F. & Buchwald, S. L. An efficient copper-catalyzed coupling of aryl halides with imidazoles. *Tetrahedron Lett.* **40**, 2657–2660 (1999).

<sup>91</sup> (a) Klapars, A., Antilla, J. C., Huang, X., & Buchwald, S. L. A General and Efficient Copper Catalyst for the Amidation of Aryl Halides and the *N*-Arylation of Nitrogen Heterocycles. **123**, 31, 7727–7729 (2001) (b) Antilla, J. C., Baskin, J. M., Barder, T. E. & Buchwald, S. L. Copper–Diamine-Catalyzed *N*-Arylation of Pyrroles, Pyrazoles, Indazoles, Imidazoles, and Triazoles. *J. Org. Chem.* **69**, 5578–5587 (2004).

<sup>92</sup> Cristau, H.-J., Cellier, P. P., Spindler, J.-F. & Taillefer, M. Mild Conditions for Copper-Catalysed *N*-Arylation of Pyrazoles. *Eur. J. Org. Chem.* **4**, 695–709 (2004).

le potentiel de la famille des oximes, et tout particulièrement du ligand salicylaldoxime (**c**) (Figure 83). Ce dernier s'est en effet avéré particulièrement efficace avec une grande diversité de substrats azoliques. Un des autres avantages de ce ligand réside dans son faible coût, contrastant avec beaucoup d'autres ligands usuels. Enfin, les auteurs ont montré que les couplages avec des aryles iodés sont beaucoup plus efficaces qu'avec leurs analogues bromés. Ces premiers résultats ont permis une réelle avancée pour la réaction de *N*-arylation de pyrazoles, cette réaction a pu ensuite être généralisée à d'autres dérivés comme les triazoles, pyrroles et à d'autres hétérocycles azotés.

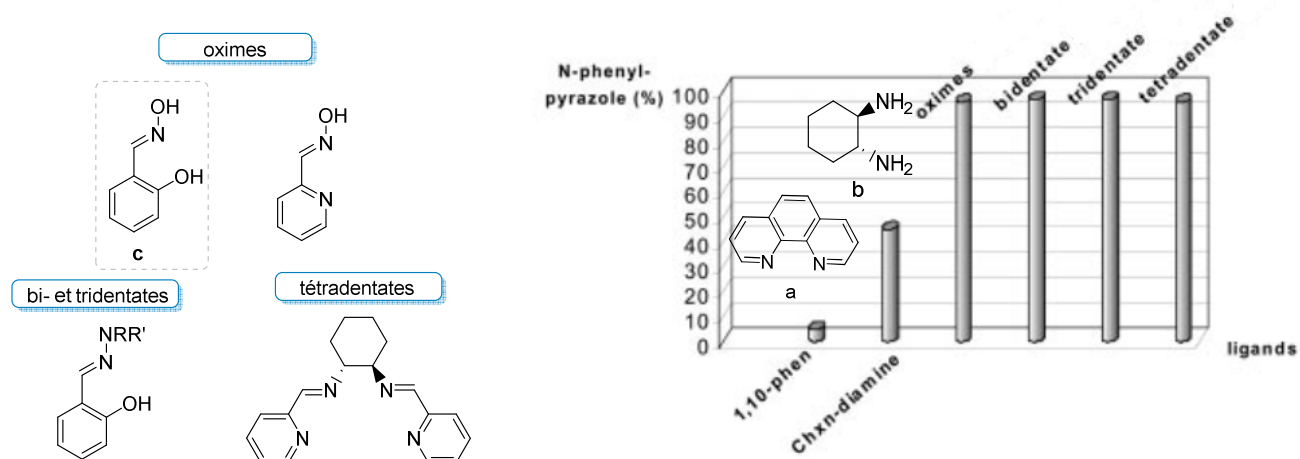


Figure 83 : Efficacité des divers ligands pour la *N*-arylation du 1*H*-pyrazole.

Une autre option permettant de réaliser le couplage des pyrazoles avec des hétéroaryles est de réaliser la réaction sans ligand. En effet, l'équipe de Taillefer a montré, que cette réaction peut être réalisée aussi efficacement en présence d'un mélange de deux catalyseurs à base de cuivre ( $\text{Fe}(\text{acac})_3/\text{CuO}$ ).<sup>93</sup> De manière similaire, Hell *et coll.* ont développé une catalyse exclusivement à l'oxyde de cuivre (II).<sup>94</sup>

<sup>93</sup> Taillefer, M., Xia, N. & Ouali, A. Efficient Iron/Copper Co-Catalyzed Arylation of Nitrogen Nucleophiles. *Angew. Chemie Int. Ed.* **46**, 934–936 (2007).

<sup>94</sup> Németh, J., Debreczeni, N., Gresits, I., Bálint, M. & Hell, Z. An efficient heterogeneous catalytic method for the *N*-arylation of pyrrole and other *N*-heterocycles. *Catal. Letters*. **145**, 1113–1119 (2015).



## Chapitre 2: Etude de l'effet des azotes sur la fluorescence des dérivés tricycliques du 1,3a,6a-triazapentalène

Comme il a été évoqué précédemment, notre premier objectif est d'identifier le (les) squelette(s) tricyclique(s) azoté(s) avec les meilleures performances photophysiques. Ce chapitre est donc dédié à la synthèse de divers noyaux hétérocycliques comportant un noyau triazapentalène central, où une variation du nombre et de la position des azotes sera effectuée.

### 1. Modulation de l'azine

#### 1.1. Synthèse du noyau benzo-1,3a,6a-triazapentalène

Pour débiter ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse du composé tricyclique de référence (**1**), comportant un noyau aromatique à 6 chaînons dépourvus d'azotes (*Figure 84*). Selon les divers ouvrages il est possible de trouver différents noms pour cette structure, à savoir un pyrazolo-[1,2-*a*]benzotriazole, un triazolopyrazolobenzène ou encore un **benzotriazapentalène**. Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser la dernière appellation.

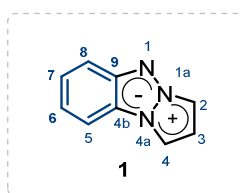


Figure 84 : Benzotriazapentalène.

La synthèse de ce composé a été proposée pour la première fois par Hung et *coll.* en 1965. La méthode de préparation proposée suppose une cyclisation réductive en présence de triéthylphosphite qui joue à la fois le rôle de réactif et de solvant. Ainsi, le **benzotriazapentalène** est obtenu après 12h de reflux avec un rendement de 18%.<sup>95</sup> Selon cette même approche, nous avons obtenus le composé d'intérêt (**1**) en deux étapes à partir du 1-iodo-2-nitrobenzène commercial (*Schéma1*).

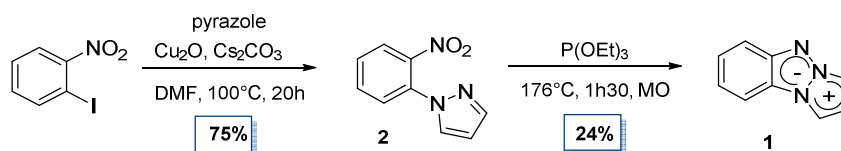


Schéma 1 : Synthèse du benzotriazapentalène (**1**).

La première étape a été réalisée selon les conditions de Hell, consistant à insérer le nucléophile *via* une catalyse au cuivre(I) en absence de ligand.<sup>94</sup> Nous avons ainsi pu obtenir le 2-nitrophenyl-1*H*-pyrazole (**2**) avec un rendement satisfaisant de 75%. Afin d'améliorer le rendement

<sup>95</sup> Lynch, B. M. & Hung, Y.-Y. Pyrazolo[1,2-*a*]benzotriazole and related compounds. *J. Heterocycl. Chem.* **2**, 218–219 (1965).

de 18% obtenu par Hung lors de l'étape de cyclisation intramoléculaire, nous avons fait appel à une méthode mise au point au laboratoire permettant de réaliser cette réaction via une irradiation aux micro-ondes.<sup>95</sup> Cependant, malgré une conversion totale après 1h30 de réaction, le rendement n'a été amélioré que très légèrement (24% vs 18%). Ceci est dû essentiellement à la dégradation du composé tricyclique lors des purifications sur gel de silice, malgré plusieurs silices testées. Il est d'ailleurs important de constater que ce produit noircit très rapidement à température ambiante et au contact de l'air.

Malgré la valeur modeste du rendement global, nous avons poursuivi notre étude sans optimiser cette synthèse, la quantité de produit étant suffisante pour réaliser nos analyses spectroscopiques. En effet, à ce stade, notre première intention se résume essentiellement à l'identification des candidats fluorescents et leur caractérisation photophysique. Les études d'optimisation seront envisagées une fois le « lead » fluorescent identifié. Ceci sera valable tout au long de ce chapitre.

## 1.2. Synthèse du noyau pyrido-1,3a,6a-triazapentalène

Les deux candidats envisagés dans cette deuxième partie comportent un noyau de type azine avec un azote soit sur la position 5, soit sur la position 8 (*Figure 85*). Le composé (**3'**) ayant déjà été obtenu au laboratoire<sup>77</sup> et étant disponible, nous avons concentrés nos efforts sur la synthèse du noyau **pyridotriazapentalène** (**4**), encore jamais décrit.

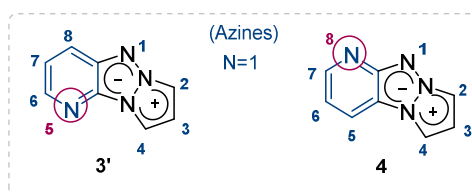


Figure 85 : Structures pyridotriazapentalènes.

### a) Approche 1 : Synthèse du pyridotriazapentalène (**4**) à partir d'un dérivé nitré

Tout comme précédemment, le dérivé tricyclique (**4**) peut être obtenu en deux étapes selon le schéma rétrosynthétique résumé ci-dessous (*Schéma 2*). Le choix de la fonction nitro comme précurseur de nitrène, a été motivé par l'accessibilité au 3-bromo-2-nitropyridine qui est un produit commercial. Quant à l'insertion du pyrazole, la réaction d'Ullmann a été privilégiée car le brome occupe une position peu favorable pour réaliser des  $S_NAr$ .

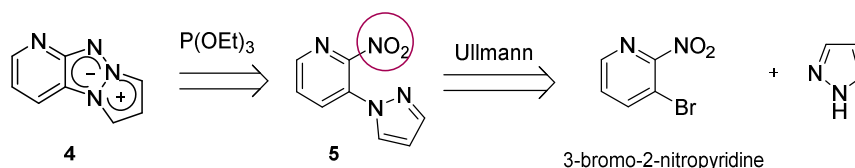
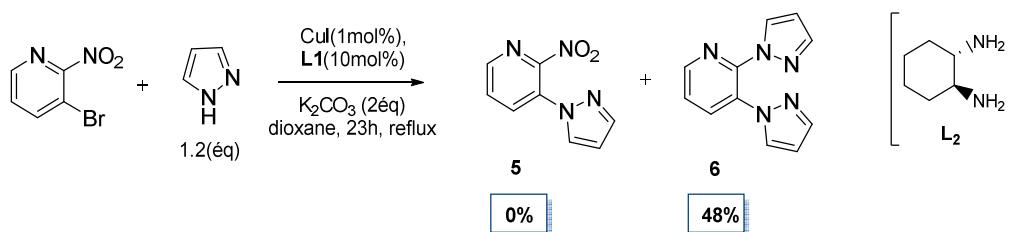


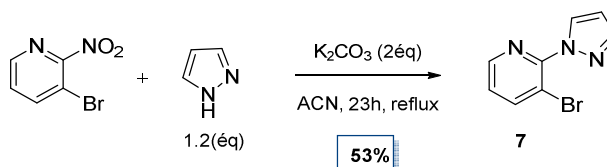
Schéma 2 : Voie rétrosynthétique du composé d'intérêt (**4**).

Pour la première étape, nous avons utilisé les conditions opératoires mises au point par l'équipe de Buchwald, qui permettent de coupler avec des excellents rendements des structures azotées, dont les pyrazoles, à des cycles aromatiques halogénés.<sup>91a</sup> Dans ces travaux, Buchwald met en avant la haute performance du système catalytique composé de CuI (1 mol%), non-oxydable à l'air avec le *trans*-cyclohexanediamine (**L**<sub>2</sub>) (10 mol%), un ligand peu onéreux. En effet, dans notre cas ces conditions se montrent très efficaces. Cependant, en plus du couplage sur le brome, nous favorisons aussi la substitution du groupement nitro par un deuxième pyrazole. Ainsi, après 23h de réaction nous obtenons essentiellement le produit (**6**), la présence d'aucune trace du composé nitré (**5**) souhaité n'étant pas constatée (*Schéma 3*).



**Schéma 3** : N-arylation catalysée au cuivre en présence du pyrazole.

L'insertion du pyrazole par une S<sub>N</sub>Ar sur la position nitrée a pu être confirmée par un test réalisé entre le 3-bromo-2-nitropyridine et le pyrazole en milieu basique (*Schéma 4*). Le produit de substitution (**7**) est obtenu avec un rendement de 53% après 23h de réaction.



**Schéma 4** : Réaction entre le 3-bromo-2-nitropyridine et pyrazole.

Cette grande réactivité de la fonction nitro vis-à-vis de la réaction de S<sub>N</sub>Ar, nous oblige à envisager la fonction azoture comme précurseur du nitrène.

#### *b) Approche 2 : Synthèse du pyridotriazapentalène (4) à partir d'un dérivé azoturé*

A la vue des résultats en série nitrée, nous avons opté pour la deuxième stratégie de synthèse qui consiste à synthétiser le **pyridotriazapentalène (4)** à partir de la 2-azido-3-pyrazolopyridine (**8**) selon la voie rétrosynthétique illustrée dans le *Schéma 5*.

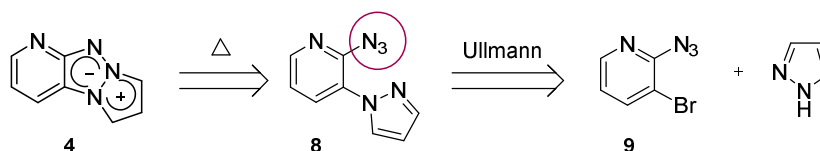


Schéma 5 : Voie rétrosynthétique du composé d'intérêt (4).

L'étape clé de cette voie de synthèse est l'obtention de l'intermédiaire 2-azido-3-bromopyridine (9). Pour accéder à cette pyridine fonctionnalisée, non décrite dans la littérature, il a été nécessaire de mener une étude bibliographique sur les méthodes permettant, de manière générale, la formation des azotures hétérocycliques. Les méthodes qui nous ont paru les plus pertinentes sont résumées ci-après.

➤ *Formation des azotures aromatiques : quelques méthodes et stratégies de synthèse*

Dans cette partie nous nous sommes concentrés essentiellement sur les méthodes les plus courantes permettant d'accéder aux azotures hétérocycliques (Figure 86).

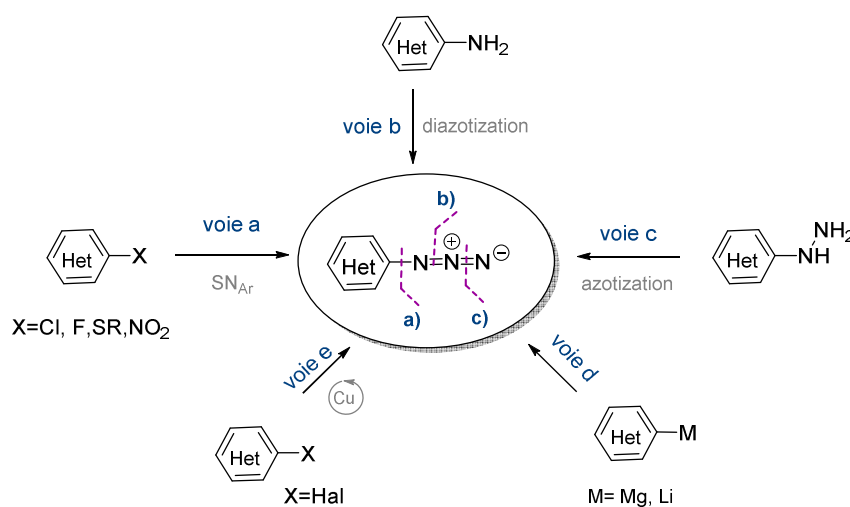
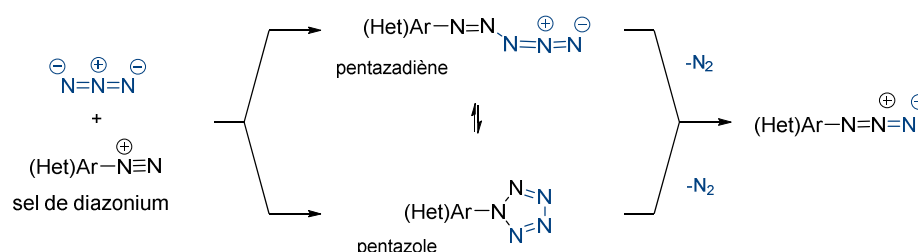


Figure 86 : Méthodes générales pour la synthèse d'azotures hétérocycliques.

Une des méthodes les plus répandues est l'insertion du groupement  $N_3$  par un mécanisme de substitution nucléophile aromatique (voie a). Généralement, cette réaction requière l'utilisation d'hétéroaryles halogénés comme espèces électrophiles et des azotures inorganiques ( $NaN_3$  typiquement) comme source de  $N_3$ .

Il est aussi possible, dans certains cas, d'utiliser d'autres groupements nucléofuges comme des thioethers ou encore des fonctions nitrées.<sup>96,97,98</sup>

La deuxième méthode (**voie b**) qui est aussi une des méthodes les plus anciennes, mais toujours d'actualité, est l'insertion de deux azotes par le transfert d'un groupement diazo (**voie b**). Contrairement à la première méthode, ici, l'azoture est obtenu en deux étapes. Cette transformation débute par la diazotisation de l'aniline correspondante pour obtenir le sel de diazonium. Cette première étape se réalise en milieu acide, en présence d'une source directe d'ion nitrosyl (ex : *t*BuONO) ou de ses précurseurs (ex : NaNO<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).<sup>99</sup> L'étape suivante vise la formation de l'azoture à partir de l'intermédiaire diazonium par l'action d'un agent de transfert du groupement diazo.<sup>100</sup> Selon le mécanisme proposé par Huisgen et Ugi, l'attaque du groupement N<sub>3</sub><sup>-</sup> sur l'ion diazonium engendre la formation soit de l'intermédiaire linéaire pentazadiène, soit la formation de son analogue cyclique, le pentazole (*Figure 87*).<sup>101</sup> Des études mécanistiques plus récentes ont montré que les deux intermédiaires azotés sont envisageables car la présence des deux espèces a été déterminée via des techniques spectroscopiques.<sup>102</sup>



**Figure 87** : Mécanisme de formation de l'azoture à partir du sel de diazonium.

La synthèse des azotures aromatiques *via* la nitrosation des hydrazines (**voie c**) est aussi une méthode ancienne mais toute aussi efficace pour la préparation d'une grande variété d'azotures d'hétéroaryles.<sup>103</sup> Cette transformation se résume en une seule étape ayant lieu en milieu acide en présence d'acide nitreux, de chlorure de nitrosyle ou encore de nitrite de sodium.<sup>104</sup> L'avantage de

<sup>96</sup> Yang, W., Miao, T., Li, P. & Wang, L. Regioselective synthesis of triazoles via base-promoted oxidative cycloaddition of chalcones with azides in aqueous solution. *RSC Adv.* **5**, 95833–95839 (2015).

<sup>97</sup> Chehade, K. A. H. & Spielmann, H. P. Facile and Efficient Synthesis of 4-Azidotetrafluoroaniline: A New Photoaffinity Reagent<sup>†</sup>. *J. Org. Chem.* **65**, 4949–4953 (2000).

<sup>98</sup> Efimov, I., Beliaev, N., Beryozkina, T., Slepukhin, P. & Bakulev, V. A catalyst and additive-free three-component reaction of highly electrophilic azides with cyclic ketones and cycloaliphatic amines. Synthesis of novel N-heteroaryl amidines. *Tetrahedron Lett.* **57**, 1949–1952 (2016).

<sup>99</sup> (a) Dai, Z.-C., Chen, Y.-F., Zhang, M., Li, S.-K., Yang, T.-T., Shen, L., Wang, J.-X., Qian, S.-S., Zhu, H.-L. & Ye, Y.-H. Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole phenylhydrazone derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 477–486 (2014). (b) Zanato, C., Cascio, M., Lazzari, P., Pertwee, R., Testa, A. & Zanda, M. Tricyclic Fused Pyrazoles with a 'Click' 1,2,3-Triazole Substituent in Position 3 Are Nanomolar CB1 Receptor Ligands. *Synthesis*. **47**, 817–826 (2015).

<sup>100</sup> Kölmel, D. K. *et al.* Azides – Diazonium Ions – Triazenes: Versatile Nitrogen-rich Functional Groups. *Aust. J. Chem.* **67**, 328 (2014).

<sup>101</sup> Huisgen, R. & Ugi, I. Pentazole, I. Die Lösung Eines Klassischen Problems der Organischen Stickstoffchemie. *Chem. Ber.* **90**, 2914–2927 (1957).

<sup>102</sup> Butler, R. N., Fox, A., Collier, S. & Burke, L. A.; Pentazole chemistry: the mechanism of the reaction of aryl diazonium chlorides with azide ion at –80 °C, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2243–2248, (1998).

<sup>103</sup> Boyer, J. H. & Canter, F. C. Alkyl and Aryl Azides. *Chem. Rev.* **54**, 1–57 (1954).

<sup>104</sup> Scriven, E. F. V., Turnbull, K. Azides: their preparation and synthetic uses, *Chem. Rev.*, **88**, 2, 297–368, (1988)

cette méthode est liée à la haute réactivité de l'hydrazine qui se traduit par des temps de réactions très courts. Une autre méthode traditionnelle consiste à préparer les azotures à partir des réactifs organométalliques, de type organomagnésiens<sup>105</sup> ou organolithiens,<sup>106</sup> généralement en présence d'azotures électrophiles, comme typiquement le *p*-toluènesulfonyl (TsN<sub>3</sub>) (voie d). D'autres méthodes plus récentes consistent à obtenir ce type d'azoture par des réactions de couplage catalysées généralement par le cuivre (voie e).<sup>107</sup> Comme la voie a, ces méthodes visent la formation des azotures hétérocycliques à partir d'électrophiles halogénés et d'une source d'azoture mais celles-ci peuvent être étendues à des substrats aromatiques plus riches en électrons.

Notre but étant d'obtenir des produits finaux hétérocycliques avec des méthodes économiques et rapides, les trois premières méthodes (voies a-c) sont retenues pour réaliser la synthèse du synthon 2-azido-3-bromopyridine (7).

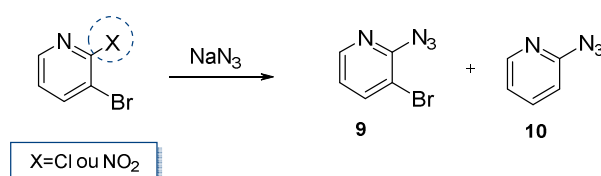
➤ *Synthèse du 2-azido-3-bromopyridine (9)*

Basés sur les diverses méthodes et conditions opératoires sélectionnées lors de l'étude bibliographique, nous avons tout d'abord mis en oeuvre la synthèse de la 2-azido-3-bromopyridine intermédiaire (9) à l'aide d'une réaction de substitution nucléophile aromatique.

- Substitution nucléophile aromatique : (voie a)

Cette réaction a été réalisée en parallèle à partir de la 3-bromo-2-chloropyridine et de la 3-bromo-2-nitropyridine (en se basant sur les observations précédentes concernant la réactivité des nitropyridines). Les essais réalisés sont illustrés dans le *Tableau 1*.

**Tableau 1** : Introduction de l'azoture par S<sub>N</sub>Ar.



Entrée	X	NaN <sub>3</sub>	solvant	T(°C)	Temps	η(9)	η(10)
1	Cl	5 éq.	DMF <sub>anh.</sub>	110°C	21h	11%	44%
2	Cl	3 éq	DMF/H <sub>2</sub> O	110°C	48h	12%	/
3	NO <sub>2</sub>	10 éq	DMF <sub>anh.</sub>	80°C	3h	47%	/

<sup>105</sup> Smith, P. A. S., Rowe, C. D. & Bruner, L. B. Azides and amines from Grignard reagents and tosyl azide. *J. Org. Chem.* **34**, 3430–3433 (1969).

<sup>106</sup> Spagnolo, P. & Zanirato, P. A convenient synthesis of azidothiophenes and some of their reactions. *J. Org. Chem.* **43**, 3539–3541 (1978).

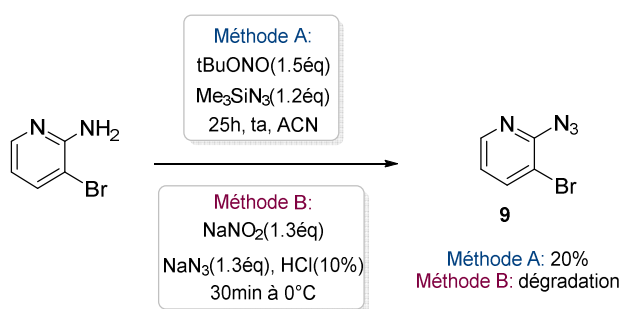
<sup>107</sup> (a) Zhu, W. & Ma, D. Synthesis of aryl azides and vinyl azides via proline-promoted CuI-catalyzed coupling reactions. *Chem. Commun.* **7**, 888–889 (2004). (b) Hajipour, A., Karimzadeh, M. & Ghorbani, S. Selective Azidation of Aryl Halides to Aryl Azides Promoted by Proline and CuFeO<sub>2</sub>. *Synlett*, **25**, 2903–2907 (2014).

En utilisant le précurseur chloré le rendement obtenu pour les deux essais (*entrées 1 et 2*) est de 11 et 12%, et ceci malgré l'augmentation de la température et du temps de la réaction. De plus, dans les conditions anhydres, pour une raison inexplicable, une quantité non négligeable de produit déhalogéné (**10**) est formée. Des meilleurs résultats sont obtenus en utilisant l'intermédiaire nitré (*entrée 3*). En partant du 3-bromo-2-nitropyridine le composé souhaité est obtenu avec un meilleur rendement (47%) et ce, après seulement 3h de réaction à 80°C.

Malheureusement, le prix élevé du 3-bromo-2-nitropyridine associé au rendement moyen de la  $S_NAr$  ne nous ont pas paru compatibles avec les optimisations à venir sur la réaction du couplage. Par conséquent, nous avons poursuivi l'optimisation de la synthèse du composé (**9**) avec la méthode d'introduction d'azote (*voie b*).

- Transfert du groupement diazo (*voie b*)

Pour cette voie de synthèse, deux méthodes ont été employées en utilisant le 2-amino-3-bromopyridine (*Schéma 6*). La méthode A utilise des conditions plus douces, alors que la méthode B suppose l'utilisation en conditions classiques d'acides forts.

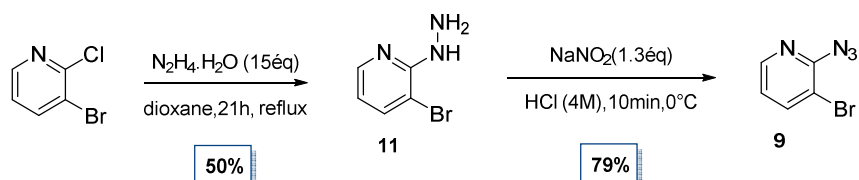


**Schéma 6 :** Formation de l'azoture **7** à partir d'une amine primaire.

L'utilisation du *tert*-butyle de nitrite en combinaison avec l'azoture de triméthylsilyle permet d'obtenir le produit (**9**) avec seulement 20% de rendement (Méthode A). Un résultat encore plus médiocre est obtenu avec la Méthode B. La réaction est dans ce cas réalisée en milieu aqueux, conduisant essentiellement à la dégradation complète du produit de départ, et ce malgré une basse température.

- Diazotization de l'hydrazine (*voie c*)

Selon cette dernière stratégie de synthèse, le composé (**9**) devrait être obtenu à partir de l'intermédiaire (**11**) comportant l'hydrazine comme précurseur de l'azoture. Cet intermédiaire est obtenu préalablement par action de l'hydrazine monohydrate sur la 3-bromo-2-chloropyridine commerciale (*Schéma 7*).

Schéma 7 : Synthèse du composé (**9**) par la diazotization de l'hydrazine (**11**).

Afin d'obtenir l'intermédiaire (**11**), plusieurs essais ont été réalisés en changeant le solvant et la quantité de nucléophile introduit. Les meilleures conditions supposent l'utilisation d'un large excès d'hydrazine et d'un chauffage prolongé à haute température (en système ouvert). Un rendement de 50% a été observé lors de cette première étape, rendement assez modeste expliqué par l'évaporation partielle du réactif dû au reflux. Il pourrait cependant être intéressant d'effectuer cette réaction en tube scellé.

La deuxième étape consiste donc à réaliser la transformation de l'hydrazine en azoture *via* la diazotation réalisée selon des conditions classiques issues de la littérature. La conversion totale est atteinte après 10 minutes de réaction à basse température, le produit (**9**) étant isolé avec un rendement de 79%. Cette dernière méthode a permis d'obtenir l'azoture hétérocyclique souhaité avec un rendement de 40% sur les deux étapes. Ce résultat est du même ordre de grandeur que celui obtenu en substituant la fonction nitro par l'azoture. Cependant, compte tenu du prix et de la disponibilité des produits de départ, cette dernière méthode sera privilégiée pour la synthèse du 2-azido-3-bromopyridine (**9**) à plus grande échelle.

### c) Le couplage d'Ullmann

Basés sur les résultats bibliographiques, nous avons débuté notre étude d'optimisation pour obtenir le composé (**8**) avec la méthode mise au point par Taillefer.<sup>94</sup> Cette dernière consiste à réaliser le couplage entre le dérivé bromé (**9**) et le pyrazole en présence du  $Cu_2O$  et salicylaldoxime (avec une proportion respective de 5 mol% et 20 mol%), d'une base inorganique, à reflux de l'acétonitrile pendant 20h (Schéma 8).

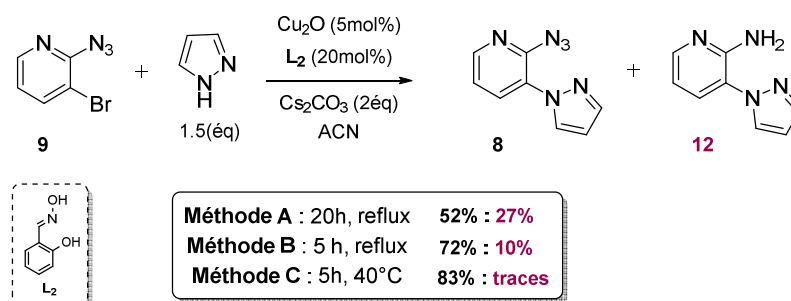


Schéma 8 : Couplage d'Ullmann.



Dans ces conditions le composé souhaité (**8**) est isolé avec 52% de rendement avec cependant 27% du produit réduit (**12**). En laissant la réaction uniquement 5h à reflux le rendement en (**8**) est amélioré mais il reste toujours 10% du sous-produit aminé. Enfin, le composé souhaité est isolé avec un bon rendement de 83% lorsque la température de la réaction est descendue à 40°C. Dans ce cas, le produit de réduction n'est présent qu'à l'état de traces.

Ce résultat est dû à une décomposition de l'azoture en amine, transformation possible avec le passage par un nitrène triplet. La présence de l'oxyde de cuivre est sans doute propice à la décomposition de notre azoture comme évoqué précédemment.<sup>108</sup>

#### d) Thermolyse

Nous avons ensuite engagé l'azoture (**8**) dans l'étape de thermolyse en suivant les conditions développées au laboratoire.<sup>78</sup> L'objectif, étant de favoriser la décomposition de l'azoture en nitrène singulet, pour former la liaison N-N intramoléculaire.

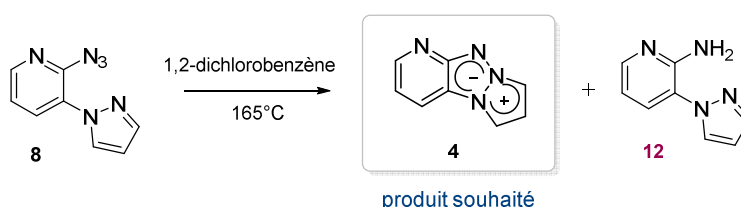


Schéma 9 : Réaction de thermolyse.

Malgré l'absence de cuivre dans le milieu, nous constatons à nouveau la formation de l'espèce réduite (**12**). Les diverses tentatives réalisées, en modifiant le temps de réaction et le mode de chauffage, conduisent soit à la réduction de l'azoture soit à la dégradation du produit de départ (Tableau 2).

Tableau 2 : Essais de thermolyse avec le composé (**8**).

Entrée	Solvant	T(C°)	Chauffage	Temps	Conversion (a/b)
1	1,2-dichlorobenzène	165	classique	2h	( <b>12</b> )+ dégradation
2	1,2-dichlorobenzène	165	classique	1h30	( <b>12</b> )+ dégradation
3	1,2-dichlorobenzène	120	μ-ondes	20min	départ
4	1,2-dichlorobenzène	165	μ-ondes	1h30	dégradation
5	DMSO	165	μ-ondes	30min	dégradation

<sup>108</sup> Gilchrist, T. L. & Rees, C. W., Carbenes, nitrenes and arynes. *Nelson and Sons Ltd.*, London, (1969)

La dégradation et la formation de l'amine, s'expliquent essentiellement par la réactivité des structures de type 2-azido pyridines, étudiée plus en détails par le groupe de C. Wentrup.<sup>109</sup> Ses travaux montrent que sous l'effet de la lumière (photolyse), ou de la température (thermolyse), le 2-azidopyrazole **1a** est en équilibre avec le tétrazolo[1,5-*a*]pyridine (**1b**), subissant une chaîne de modifications chimiques (Figure 88).

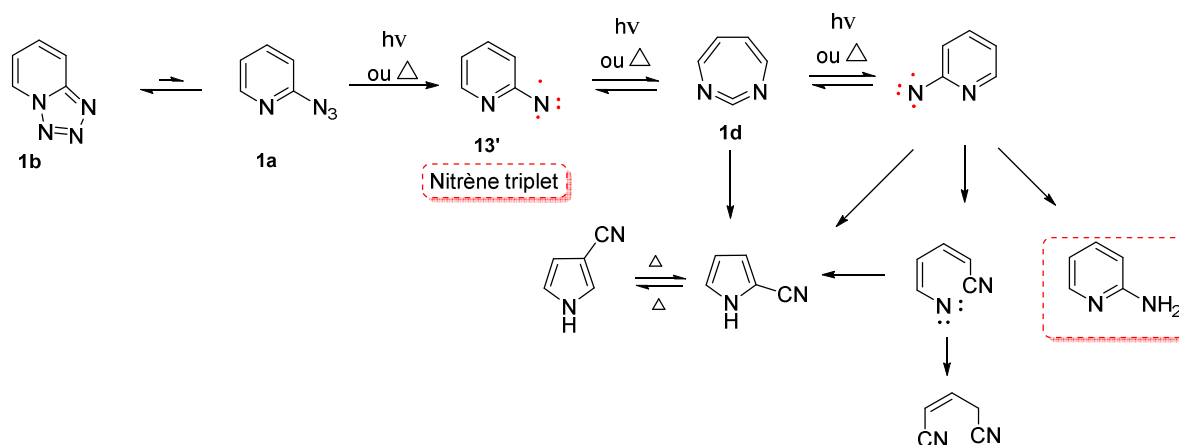


Figure 88 : Formation et les transformations du 2-pyridynitrène (**13'**).

La formation de ces diverses espèces chimiques issues du 2-pyridynitrène (**13'**) a été confirmée à l'aide de différentes techniques spectroscopiques (UV, Masse, IR, marquage à l'azote 15).

### 1.3. Conclusion

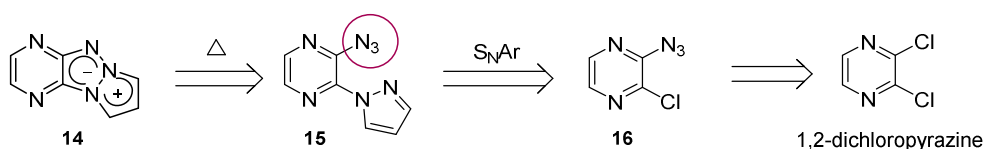
Malgré les différentes méthodes et stratégies employées, la synthèse du composé **pyridotriazapentalène (4)** a été abandonnée. Les derniers résultats ont montré qu'en présence de cuivre ou par augmentation de la température de réaction, le produit azoturé se réduit rapidement. Face à ces résultats infructueux nous avons abandonné la synthèse de cette structure tricyclique avec l'azote sur la position 8 du **benzotriazapentalène**.

<sup>109</sup> (a) Wentrup, C. *et al.* Nitrene-Nitrene Rearrangement under Thermal, Photochemical, and Electron-Impact Conditions: The 2-Azidopyridines/Tetrazolo[1,5-*a*]pyridines. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 4200–4206 (2016). (b) Patai, S., *Azides and Nitrenes: Reactivity and Utility*, Ed. The Chemistry of the Azido Group. Wiley, New York, p.105, (1971).

## 2. Modulation de la diazine

### 2.1. Synthèse du noyau pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène

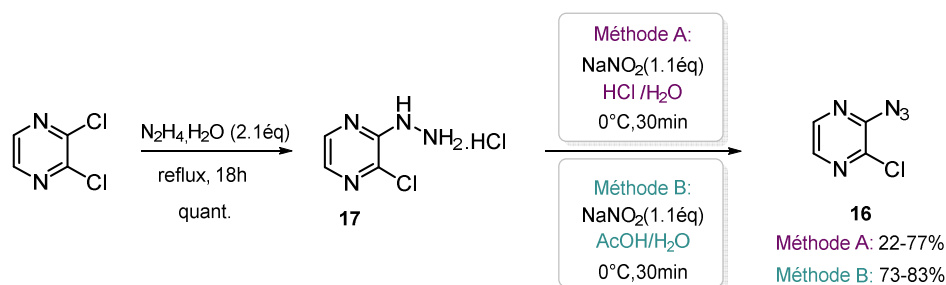
Pour la synthèse d'un triazapentalène lié au noyau pyrazine, nous nous sommes basés sur les résultats antérieurs obtenus au laboratoire.<sup>79</sup> La méthode développée consiste à obtenir le **pyrazinotriazapentalène (14)** en trois étapes à partir de la 2,3-dichloropyrazine commerciale (*Schéma 10*).



**Schéma 10** : Rétrosynthèse du pyrazino-1,3a-6a-triazapentalène.

#### a) Synthèse de la 3-azido-2-chloropyrazine

La synthèse de la 2-azido-3-chloropyrazine (**16**) repose sur la méthode d'azotisation en milieu acide de son précurseur (**17**) (*Schéma 11*). Ce dernier, sous forme de sel de chlorhydrate, est obtenu en traitant la 2,3-dichloropyrazine avec de l'hydrazine monohydrate avec un rendement quantitatif. Il est ensuite engagé dans la réaction d'azotisation en présence du nitrite de sodium.

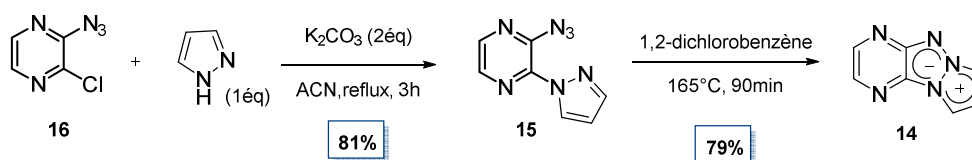


**Schéma 11** : Synthèse du 2-azido-3-chloropyrazine (**16**).

Pour réaliser cette deuxième réaction, deux méthodes ont été testées. La première méthode, développée au laboratoire (Méthode A), n'est dans ce cas pas applicable à grande échelle et peu reproductible. Face à ce problème, nous avons alors développé une seconde méthode (Méthode B), utilisant des conditions plus douces et aboutissant au composé (**16**) voulu avec un meilleur rendement à petite ou large échelle.

#### b) Synthèse du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène(14)

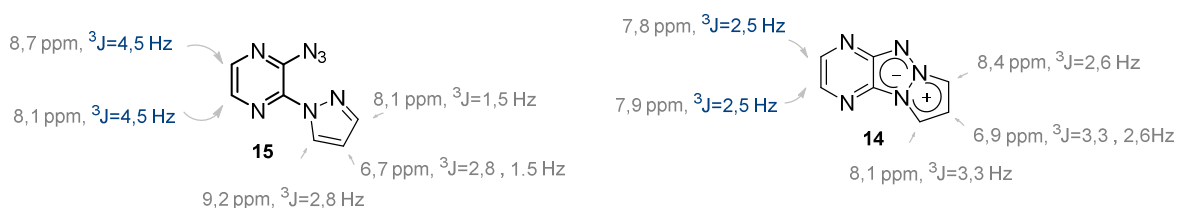
Le chlore étant situé sur une position activée de la pyrazine, l'introduction du pyrazole via une S<sub>N</sub>Ar a été la méthode de choix (*Schéma 12*).



**Schéma 12** : Synthèse du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène (**14**).

En effet, le traitement de la 2-azido-3-chloropyrazine (**16**) par le pyrazole en présence d'une base inorganique au reflux de l'acétonitrile conduit à la formation du bicyclic (**15**) avec un très bon rendement. La thermolyse de ce dernier aboutit ensuite à la formation de l'analogue tricyclique (**14**), isolé avec un rendement satisfaisant.

Outre une différence de polarité et de solubilité entre le composé bicyclique et tricyclique, ces deux composés présentent des spectres RMN du proton bien distincts. La plus grande différence est constatée au niveau du cycle pyrazine. Sur le noyau bicyclique les protons pyraziniques sont caractérisés par une constante de couplage de 4,5 Hz, alors que celle de la pyrazine cyclisée diminue jusqu'à 2,5 Hz (*Figure 89*).



**Figure 89** : Signaux caractéristiques des composés (**15**) et (**14**).

Cette différence, d'environ 2 Hz, est un indice important qui sera utilisé par la suite de l'étude pour confirmer la formation des espèces triazapentaléniques de la famille des pyrazines.

## 2.2. Synthèse du noyau pyrimido-1,3a,6a-triazapentalène

Le dernier objectif de cette partie était d'accéder au noyau tricyclique comportant une pyrimidine fusionnée au 1,3a,6a-triazapentalène avec des azotes sur les positions 6 et 8 (*Figure 90*).

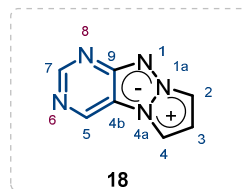


Figure 90 : Pyrimidotriazapentalène.

### a) Approche 1

La première voie rétrosynthétique retenue, vise l'obtention du pyrimidotriazapentalène (**18**) d'intérêt en 5 étapes à partir de la 4(3*H*)-pyrimidinone (*Schéma 13*). La séquence envisage une réaction de thermolyse après un couplage de type Ullmann entre le 4-azido-5-bromopyrimidine (**20**) et le pyrazole. L'introduction de l'azoture sur la pyrimidine serait réalisée *via* une  $S_NAr$  à partir du dérivé dihalogéné (**21**). Ce dernier pourrait être obtenu par une chloration et une bromation de la 4(3*H*)-pyrimidinone.

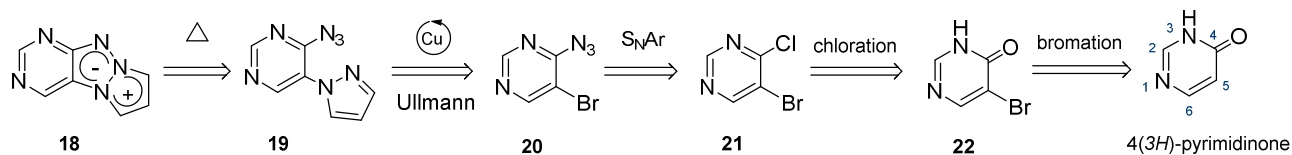


Schéma 13 : Rétrosynthèse du pyrimidotriazapentalène (**18**).

Le composé majeur de cette approche est l'intermédiaire dihalogéné (**21**), dont la synthèse a été réalisée selon des méthodes décrites dans la littérature (*Schéma 14*).<sup>110</sup>

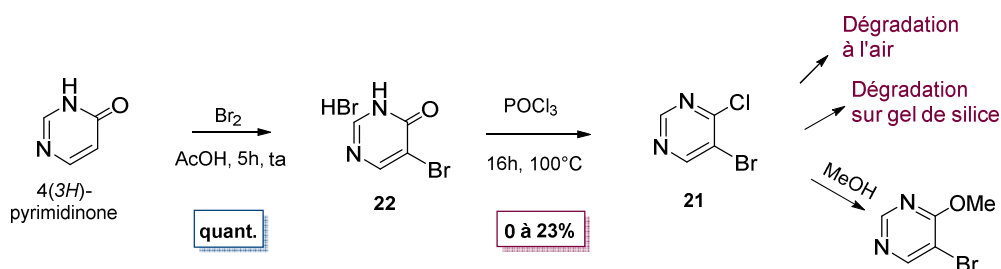


Schéma 14 : Synthèse du 5-bromo-4-chloropyrimidine(**21**).

<sup>110</sup> (a) McDonald, E., Blagg, J., Pichowicz, M. & Crumpler, S. R. Pyridine and pyrimidine based compounds as wnt signaling pathway inhibitors for the treatment of cancer. (2010), WO2010041054 A1. (b) Vankayalapati, H., Appaleni, R. P. & Reddy, Y. V. K. Substituted 5-(pyrazin-2-yl)-1*H*-pyrazolo [3, 4-*b*] pyridine and pyrazolo [3, 4-*b*] pyridine derivatives as protein kinase inhibitors. (2012). WO2012135631 A1.

La pyrimidinone bromée (**22**) est obtenu par un traitement de la 4(3*H*)-pyrimidinone avec le dibrome, en milieu acide. Cette première étape est parfaitement reproductible à petite et à grande échelle, et le composé (**22**) est isolé sous forme de sels avec d'excellents rendements. A l'opposé, la réaction de chloration en présence d'un excès de POCl<sub>3</sub> est une étape très peu reproductible. Malgré des variations de température de réaction ou de quantité de trichlorure de phosphore introduite, le rendement n'excède jamais 23%. Ceci est principalement dû à l'instabilité de l'intermédiaire dihalogéné (**21**) qui se dégrade quasi immédiatement au contact avec l'air et sur gel de silice. Il présente par ailleurs une grande réactivité avec les solvants nucléophiles comme le MeOH.

En dépit de ces inconvénients, nous avons poursuivi la séquence réactionnelle avec la synthèse de l'azoture (**20**) (Schéma 15). La méthode directe de substitution nucléophile aromatique (Voie A) réalisée en présence d'azoture de sodium a échoué. La méthode indirecte (Voie B) a permis d'obtenir quantitativement l'hydrazine intermédiaire (**23**) cependant celle-ci n'a pas pu être convertie en azoture.

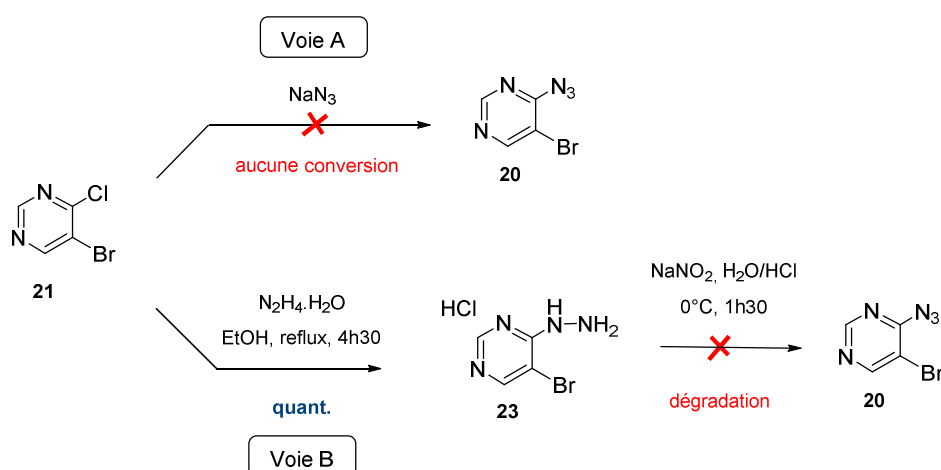


Schéma 15 : Essais de synthèse de la 5-bromo-4-azidopyrimidine (**20**).

## b) Approche 2

Face aux résultats infructueux obtenus lors des tentatives précédentes, nous avons imaginé une nouvelle voie rétrosynthétique (Schéma 16).

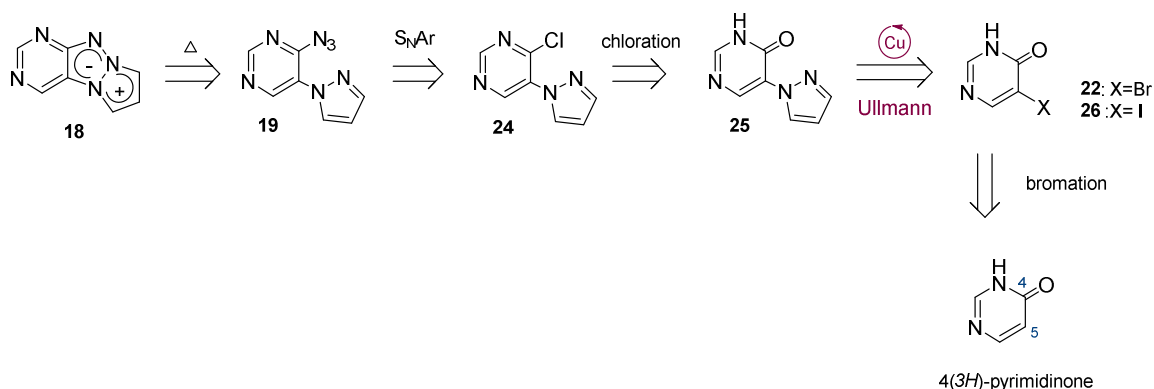
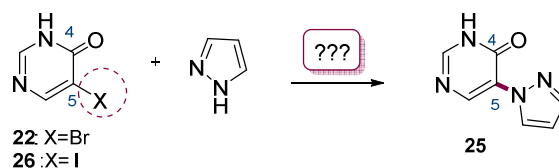


Schéma 16 : Rétrosynthèse du pyrimidotriazapentalène (**18**).

Celle-ci comporte le même nombre d'étapes, avec globalement les mêmes transformations. Ainsi, le composé (**18**) souhaité serait obtenu *via* une thermolyse du produit (**19**) dont les substituants seraient introduits par  $S_NAr$  après une chloration et un couplage d'Ullmann sur la 4(3H)-pyrimidinone bromée ou iodée. La différence clé de cette deuxième approche repose sur l'ordre de fonctionnalisation des positions 4 et 5 du noyau hétérocyclique (pyrimidinone ou pyrimidine). Afin d'éviter les problèmes de dégradation du dérivé dihalogéné (**21**), il nous a paru judicieux d'introduire le pyrazole par un couplage d'Ullmann au début de la chaîne réactionnelle pour stabiliser le noyau pyrimidinone. Ceci nous ramène vers l'enjeu de cette nouvelle stratégie qui est l'obtention du composé (**25**) à partir de la pyrimidinone halogénée (*Schéma 17*).



**Schéma 17** : Etape clé de l'approche 2.

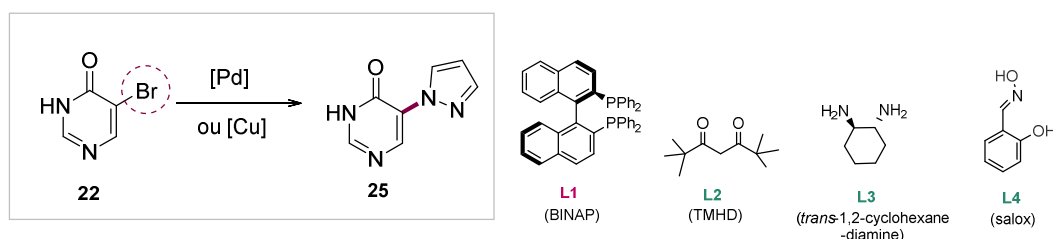
A notre connaissance, le couplage avec des amines ou azoles de la position C<sup>5</sup> des noyaux pyrimidinones n'a jamais été décrit. Le premier défi à relever dans cette partie est donc de mettre au point une méthode de couplage permettant d'accéder au 5-pyrazolopyrimidinone (**25**) à partir du pyrazole et de la pyrimidinone halogénée.

➤ *Synthèse de la 5-(pyrazolyl)pyrimidinone (25)*

En absence des données bibliographiques, nous avons réalisé une longue étude d'optimisation dans le but d'identifier les conditions opératoires propices à la réaction de couplage entre le pyrazole et la 4(3H)-pyrimidinone. Ainsi, nous avons fait varier les différents paramètres comme : la nature de l'halogène (brome ou iode), le système catalytique, la température et le mode de chauffage.

- Chauffage thermique à partir du dérivé bromé

Pour débiter l'optimisation, nous avons sélectionné quelques méthodes de couplages catalysées par le palladium et par le cuivre en se basant sur les données bibliographiques traitant de la *N*-arylation des azoles. Nous avons commencé par étudier la faisabilité de cette réaction à partir du dérivé bromé de la pyrimidinone (**22**) en respectant les proportions et les conditions opératoires de chaque publication existante sur des analogues azotés (*Tableau 3*).

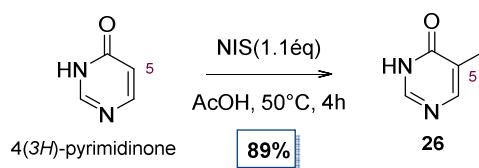
Tableau 3 : Synthèse du 5-(pyrazolyl)pyrimidinone (**25**).

Entrée	Solvant	Cat.	Ligand	base	T(C°)	Temps	Conversion	Réf
1	Toluène	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> (12mol%)	<b>L1</b> (6mol%)	tBuONa	80	28h	aucune	[ <sup>111</sup> ]
2	DMSO	CuI(100mol%)	<b>L2</b> (50mol%)	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	150	8h	aucune	[ <sup>112</sup> ]
3	DMF	CuI(20mol%)	/	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	82	32h	aucune	[ <sup>113</sup> ]
4	Dioxane	CuI(1mol%)	<b>L3</b> (10mol%)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	110	40h	aucune	[ <sup>114</sup> ]
5	ACN	Cu <sub>2</sub> O(5mol%)	<b>L4</b> (20mol%)	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	82	20h	aucune	[ <sup>92</sup> ]

Malheureusement, aucune de ces méthodes, catalysées au palladium ou au cuivre, avec ou sans ligand, n'ont abouti au composé souhaité. Dans tous les cas, seuls les produits de départ sont isolés. Dû à sa faible réactivité, le composé bromé (**22**) est remplacé par son analogue iodé, halogène largement utilisé dans les couplages d'Ullmann.

- Chauffage thermique à partir du dérivé iodé

Le dérivé iodé de départ a été préparé avec la même méthode utilisée que pour la préparation du 5-bromopyrimidinone (**22**) en utilisant cette fois le NIS comme agent d'iodation. Contrairement à l'exemple précédent, l'utilisation du NIS nécessite une légère hausse de température (50°C), mais le composé (**26**) est isolé après une conversion complète avec un rendement très satisfaisant en seulement 4 h (Schéma 18).

Schéma 18 : Synthèse du 5-iodopyrimidinol (**26**).

<sup>111</sup> Wolfe, J. & Buchwald, S. Scope and Limitations of the Pd/BINAP-Catalyzed Amination of Aryl Bromides, *J. Org. Chem.* **65** (4), 1144-1157 (2000).

<sup>112</sup> Fujiwara, H., Sato, K., Mizumoto, S., Sato, Y., Kurihara, H., Kubo, Y., Nakata, H., Baba, Y., Tamura, T., Kuniyoshi, H., Hagiwara, S. & Yamamoto, M. Preparation of nicotinamide derivatives as Syk inhibitors, (2012) WO 2012002577.

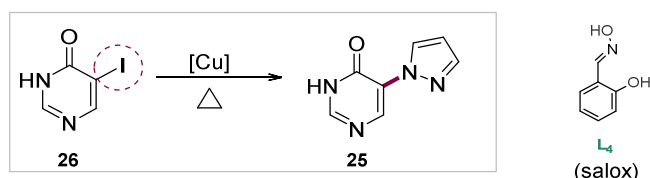
<sup>113</sup> Zhu, L. *et al.* Highly Functional Group Tolerance in Copper-Catalyzed *N*-Arylation of Nitrogen-Containing Heterocycles under Mild Conditions. *J. Org. Chem.* **74**, 2200–2202 (2009).

<sup>114</sup> Klapars, A, Antilla, J. C., Huang, X. & Buchwald, S. L. A General and Efficient Copper Catalyst for the Amidation of Aryl Halides and the *N*-Arylation of Nitrogen Heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 25, 7421-7428 (2001)



Concernant la méthode de couplage, nous avons choisi de tester en priorité le système :  $\text{Cu}_2\text{O}$ /salox ( $\text{L}_4$ ). Ce choix est basé sur les résultats d'une étude menée par Taillefer sur la performance de ces ligands face à la *N*-arylation des pyrazoles.<sup>37</sup> Les résultats de cette optimisation sont détaillés dans le *Tableau 4*.

**Tableau 4** : Synthèse du 5-(pyrazolyl)pyrimidinone (**25**).



Entrée	Solvant	Cat.	Ligand	base	T(C°)	Temps	Conversion (RMN)	$\eta$
1	ACN	$\text{Cu}_2\text{O}$ (5mol%)	$\text{L}_4$ (20mol%)	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	82	24h	aucune	/
2	DMF	$\text{Cu}_2\text{O}$ (5mol%)	$\text{L}_4$ (20mol%)	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	82	24h	30%	/
3	DMF	$\text{Cu}_2\text{O}$ (5mol%)	$\text{L}_4$ (20mol%)	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	82	50h	99% <sup>(a)</sup>	/
4	DMF	$\text{Cu}_2\text{O}$ (10mol%)	$\text{L}_4$ (40mol%)	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	82	50h	92%	/
5	DMF	$\text{Cu}_2\text{O}$ (10mol%)	$\text{L}_4$ (40mol%)	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	130	40h	100%	72%

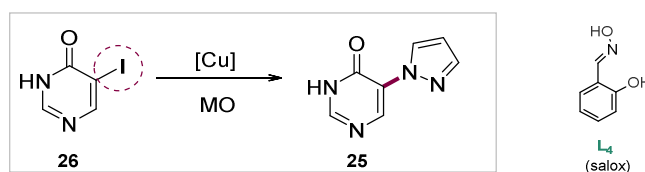
<sup>(a)</sup> avec traces du produit de départ (**26**).

Réalisée tout d'abord sans succès dans l'acétonitrile, la réaction a été effectuée dans le *N,N*-diméthylformamide qui a quant à lui permis l'obtention du composé (**25**), avec une conversion toutefois très modeste (*entrées 1* et *2*). Afin d'obtenir des meilleures conversions, nous avons fait varier le temps de réaction (*entrée 3*), la charge catalytique (*entrée 4*) ainsi que la température (*entrée 5*). Hormis le dernier essai où la conversion est de 100%, le rendement isolé en composé (**25**) n'a pas pu être déterminé car il a été impossible de séparer sur colonne de gel de silice le produit attendu de son dérivé iodé de départ (**26**), malgré plusieurs système d'éluants différents.

Finalement, après 40 h de réaction à 130°C, en doublant la charge catalytique de départ, le composé (**25**) est isolé avec un rendement convenable de 72%.

#### - Optimisation : Irradiation aux micro-ondes

A ce stade, compte tenu des temps de réactions très longs, il est apparu judicieux d'étudier l'effet de l'irradiation au micro-ondes. L'ensemble des essais est consigné dans le *Tableau 5*.

**Tableau 5 :** Synthèse du 5-(pyrazolyl)pyrimidinone (**25**) par irradiation micro-ondes

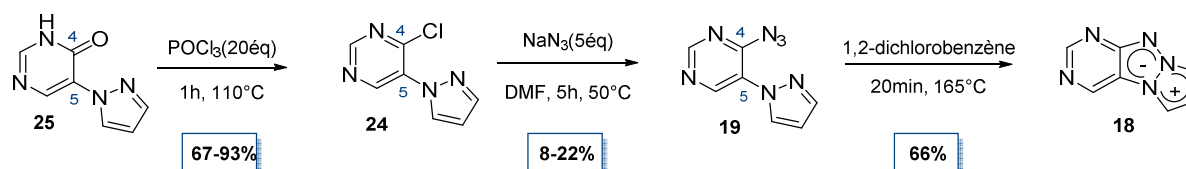
Entrée	Solvant	Cat.	Ligand	base	T(C°)	Temps	Conversion	$\eta$
1	DMF	$\text{Cu}_2\text{O}$ (10mol%)	$\text{L}_4$ (40%)	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	130	1h	totale	71%
2	DMF	$\text{Cu}_2\text{O}$ (5mol%)	$\text{L}_4$ (20%)	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	130	1h	$\leq 100\%$ <sup>(a)</sup>	/
3	DMF	$\text{Cu}_2\text{O}$ (5mol%)	$\text{L}_4$ (20%)	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	110	1h	aucune	/
4	DMF	$\text{Cu}_2\text{O}$ (5mol%)	$\text{L}_4$ (20%)	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	170	20 min	totale	72%
5 <sup>(b)</sup>	DMF	$\text{Cu}_2\text{O}$ (5mol%)	$\text{L}_4$ (20%)	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	170	1h	totale	61%
6 <sup>(c)</sup>	DMF	$\text{Cu}_2\text{O}$ (5mol%)	$\text{L}_4$ (20%)	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	170	1h	totale	95%

(a) Il reste des traces du produit de départ iodé. (b) Extraction avec DCM/iPrOH (9/1) suivie d'une colonne sur gel de silice. (c) Le milieu réactionnel est concentré et purifié directement sur gel de silice.

Comme précédemment nous avons fait varier la température, le temps de chauffage et la charge catalytique. Les résultats montrent que la température minimale requise pour observer une conversion est de 130°C. Cependant pour atteindre une conversion totale à cette température il est nécessaire d'augmenter la charge catalytique jusqu'à 10mol% de  $\text{Cu}_2\text{O}$  et 40mol% de ligand. En augmentant la température à 170°C, nous retrouvons un rendement convenable avec la charge catalytique initiale (*entrée* 4). Ces conditions ont été utilisées dans une réaction à plus grande échelle (>300 mg) avec un rendement semblable seule une augmentation du temps de chauffage a dû être nécessaire (*entrée* 5). Une dernière optimisation sur le traitement consistant à omettre l'étape d'extraction permet l'obtention du produit attendu avec un excellent rendement de 95% après seulement 1h de réaction au micro-ondes réalisée à grande échelle (> 300 mg, *entrée* 6).

#### ➤ Synthèse du pyrimido-1,3a,6a-triazapentalène (**18**)

Une fois l'optimisation de l'étape de couplage effectuée, nous avons continué la séquence réactionnelle (*Schéma* 19).

**Schéma 19 :** Synthèse du pyrimidotriazapentalène (**18**).

La 5-(pyrazolyl)pyrimidinone (**25**) est engagée dans l'étape de chloration conduisant à la synthèse de la pyrimidine chlorée (**24**). Un simple lavage permet d'éliminer le  $\text{POCl}_3$  en excès et

d'isoler le produit quasi-pur avec des rendements variant de bons à excellents. Cette variation observée est due à nouveau à une sensibilité du motif chloro-pyrimidine (**24**), qui reste toutefois moins prononcée que dans le cas de la 5-bromo-4-chloropyrimidine (**21**). Cette relative sensibilité de l'intermédiaire (**14**) nous a conduit à l'engager dans l'étape suivante immédiatement après le traitement.

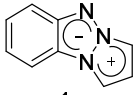
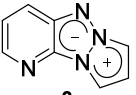
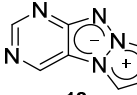
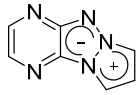
La méthode choisie pour obtenir l'azoture en position 4 est la substitution nucléophile aromatique en présence de l'azoture de sodium. En utilisant les conditions optimisées dans les parties précédentes, et après quelques essais, nous obtenons le produit (**19**) avec un rendement maximal de 22%. A ce stade de la synthèse notre objectif est d'obtenir le produit final, et l'optimisation de ces dernières étapes sera reconsidérée dans le cas où le composé (**18**) présente des propriétés de fluorescence intéressantes. La cyclisation intramoléculaire a été réalisée selon une thermolyse et l'analogue pyrimidinique du pyrimidotriazapentalène (**25**) a pu être isolé dans une quantité suffisante pour réaliser les analyses de fluorescence.

Finalement, après de nombreuses tentatives de synthèse nous avons pu accéder au pyrimidotriazapentalène (**25**) en seulement 5 étapes avec un rendement global de 11%, qui pourra être amélioré en optimisant les dernières étapes.

### 2.3. Analyses photophysiques des (hétéro)aryl-1,3a,6a-triazapentalènes

Ayant en possession les quatre premiers motifs tricycliques cibles (**1**, **3**, **14** et **18**) nous avons réalisé leur caractérisation photophysique complète afin de pouvoir identifier le motif présentant les meilleures propriétés de fluorescence. Nous avons aussi cherché à identifier une éventuelle corrélation entre la structure moléculaire soit la nature du cycle additionnel et les propriétés photophysiques du motif central. Pour commencer, nous avons choisi d'utiliser le DMSO comme solvant d'analyse et la *Coumarine 153* comme référence pour le calcul des rendements quantiques. L'ensemble de résultats obtenus sont résumés dans le *Tableau 6*.

**Tableau 6** : Propriétés photophysiques des (hétéro)aryl-1,3a,6a-triazapentalènes.

				
solvant	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
$\lambda_{ex}$ (nm)	370	387	399	418
$\lambda_{em}$ (nm)	397	446	447	516
$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	12 700	18 700	1200	15 500
$\Delta$ Stokes	27	59	48	98
$\phi^{(a)}$	< 0,001	0,018	0,15	0,15
Brillance	< 13	340	180	2300

<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « *Coumarine 153* » avec  $\lambda_{ex} = \lambda_{ex}$  des produits, et  $\Phi = 0.38$  dans l'EtOH ;

Une des premières évidences à s'imposer à travers ces résultats est l'effet bathochrome considérable engendré par la présence des azotes dans le cycle additionnel. De plus, il est intéressant de constater que l'envergure de ce déplacement vers les grandes longueurs d'ondes soit vers le rouge est dépendante du nombre et de la position des azotes. Ainsi, le composé qui se démarque, avec une longueur d'excitation plus importante est le composé **(14)**, avec un gain de 48nm par rapport à son analogue non-azoté **(1)** (Figure 91).

La présence d'azotes a aussi un impact sur la valeur du coefficient d'extinction molaire. Une amélioration importante de cette valeur est notée dans le cas du pyridotriazapentalène **(3)** et du pyrazinotriazapentalène **(14)**. En revanche, la valeur de l' $\epsilon$  de l'analogue pyrimidinique **(18)** est environ 10 fois inférieure à celle du benzotriazapentalène **(1)**.

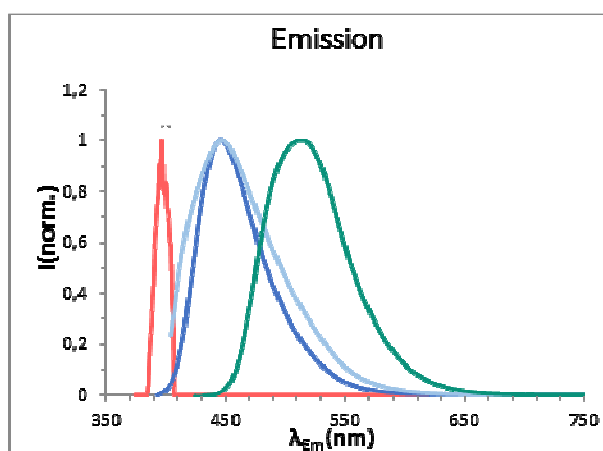


Figure 91 : Spectres d'émission de(hétéro)aryl-1,3a,6a-triazapentalènes : ((**1**) — ; (**3**) — ; (**18**) — ; (**14**) — ).

Le déplacement vers les grandes longueurs d'ondes est constaté aussi sur les spectres d'émission des composés polyazotés. Tandis que le benzotriazapentalène **(1)** présente un signal d'émission très faible avec un maxima situé à 397nm, ses trois analogues azotés affichent un caractère fluorescent plus prononcé, avec des bandes d'émission à plus basse énergie et des intensités de fluorescence bien meilleures (Figure 91). De même, la mesure des rendements quantiques confirme ce caractère très peu (voire non) fluorescent du benzotriazapentalène **(1)** ( $\phi_A < 0,001$ ), un résultat qui est en accord avec les données de la littérature.<sup>76</sup> Cette valeur est nettement améliorée en présence d'azotes, ainsi nous observons des rendements quantiques de 15% pour les composés ayant deux azotes supplémentaires **(14)** et **(18)**. En revanche, le composé pyridinique **(3)**, avec un sel azote, ne fluoresce qu'avec un rendement quantique de 2% (tableau 10). Enfin le meilleur composé **(14)** se démarque des autres avec une valeur de déplacement de Stokes d'environ 100 nm.

En résumé, les résultats de cette première étude ont permis d'élucider l'importance des hétéroatomes dans le noyau fusionné. Nous avons en effet pu mettre en évidence les propriétés de fluorescence de molécules azotées comparées au benzotriazapentalène **(1)** non fluorescent (Figure 92). Selon cette analyse, le composé pyrazinotriazapentalène **(14)** ressort comme notre molécule « hit » avec des propriétés de fluorescence très intéressantes et prometteuses pour une structure si compacte.

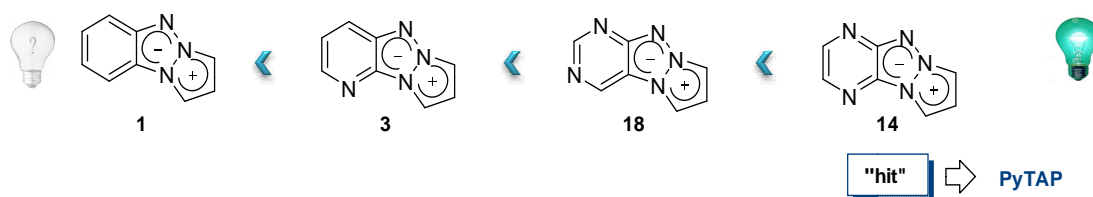



Figure 92 : Evolution des propriétés de fluorescence en fonction du nombre et de la position d'azotes.

Ayant en possession le composé « hit », le pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène, les prochaines modulations seront envisagées autour de cette conformation. Ainsi, pour faciliter l'écriture dans les prochaines parties le pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène sera appelé également **PyTAP**.

➤ *Comparaison entre le pyrazinotriazapentalène et le triazapentalène*

Il nous est apparu intéressant de comparer les propriétés photophysiques du 1,3a,6a-triazapentalène, synthétisé et caractérisé par l'équipe de Namba<sup>76</sup> et du composé (**14**). Les propriétés photophysiques du triazapentalène de Namba ayant été évaluées dans le dichlorométhane, nous avons utilisés les mêmes conditions d'analyse pour caractériser le dérivé tricyclique (**14**).

	<u>solvant:DCM</u> $\lambda_{\text{ex}}=288\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}}=389\text{nm}$ $\epsilon = ? \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $\Delta \text{ Stokes}=101\text{nm}$ $\phi_{\text{F}}=0.014$
1,3a,6a-triazapentalène <b>(TAP)</b>	

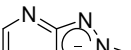
	<u>solvant:DCM</u> $\lambda_{\text{ex}}=415\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}}=494\text{nm}$ $\epsilon = 13000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $\Delta \text{ Stokes}=79\text{nm}$ $\phi_{\text{F}}=0.42$
<b>14</b> <b>(PyTAP)</b>	

Figure 93 : Triazapentalène (TAP) vs pyrazinotriazapentalène (PyTAP).

Le premier effet bénéfique apporté par le cycle pyrazine fusionné est l'effet bathochrome considérable, avec un déplacement des longueurs d'onde d'absorption et d'émission de plus de 100nm. L'autre point important est l'amélioration remarquable du rendement quantique de fluorescence, le composé tricyclique étant caractérisé par un rendement quantique de 42%, contre seulement 1 % pour le triazapentalène bicyclique.

Il aurait été intéressant de comparer les valeurs des coefficients d'extinction molaire. Cependant la valeur associée au motif bicyclique n'a malheureusement pas été reportée. Toutefois, la tendance basée sur quelques exemples des triazapentalènes bicycliques identifiés dans la littérature (*chapitre 2, partie A*) montrent qu'en général ces composés ont des  $\epsilon$  assez faibles (de l'ordre  $1000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Il a été d'ailleurs montré que pour améliorer ces valeurs il est nécessaire d'apporter des fonctionnalisations supplémentaires sur le bicyclic. Pour finir, le déplacement de Stokes est dans notre cas légèrement inférieur mais reste important. De plus, alors que le composé bicyclique est reporté comme étant peu stable, l'ajout d'une pyrazine permet d'améliorer la stabilité chimique de cette structure mésoionique.

En conclusion, nous avons montré que la fusion d'un cycle hétérotopique avec des azotes sur les positions C<sup>5</sup> et C<sup>8</sup> bien définies était cruciales pour obtenir de bonnes propriétés de fluorescence dans la série triazapentalènes.

### 3. Modulation de l'azole

Basés sur les résultats précédents, nous nous sommes interrogés sur l'effet qu'induirait la présence d'azotes supplémentaires dans la partie « azole » du composé de référence PyTAP (**14**). Pour cela nous nous sommes intéressés aux structures polyazotées représentées dans la Figure 94.

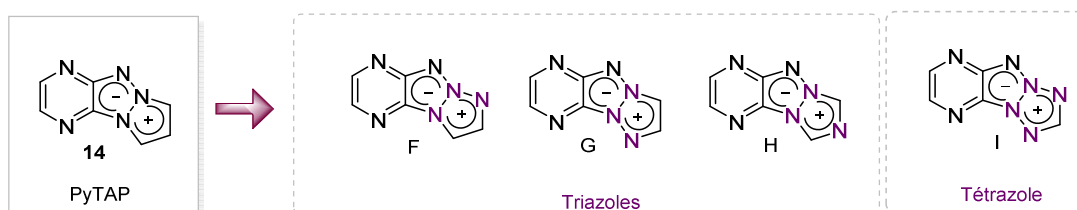


Figure 94 : Modulation de l'azole/structures visées.

Pour accéder à ce type de structures, nous avons suivi la voie rétrosynthétique permettant d'accéder au noyau pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène (**14**) (Schéma 20). Ainsi, les molécules d'intérêt seront obtenues en deux étapes, à partir du 2-azido-3-chloropyrazine (**16**) et de divers azoles commerciaux.

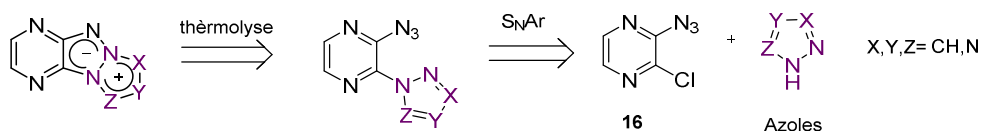


Schéma 20 : Voie rétrosynthétique des analogues azotés du PyTAP.

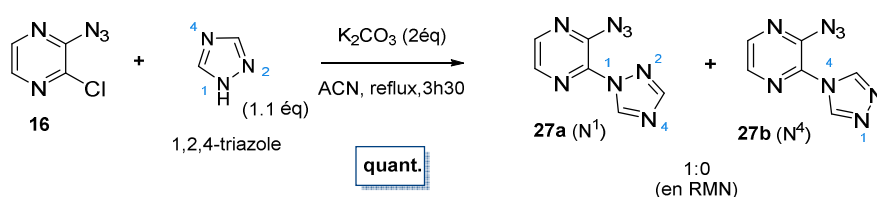
L'utilisation des azoles polyazotés comme nucléophiles, implique de considérer leur réactivité spécifique de chacun du fait de la présence de plusieurs tautomères. Dans le cas d'une S<sub>N</sub>Ar, ceci peut se traduire par la formation de plusieurs isomères dont la probabilité de formation est dépendante des constantes d'équilibre associées à chaque forme tautomère.

Un deuxième point important à prendre en compte, est lié aux propriétés potentiellement énergétiques de certains intermédiaires particulièrement polyazotés. Pour cela, quelques précautions de manipulation ont été adoptées avec ce type de substrats. Les réactions ont été engagées sur des quantités inférieures à 100 mg et les intermédiaire polyazotés sont conservés à froid et à l'abri de la lumière soit engagés directement dans l'étape de thermolyse en solution. L'intermédiaire azoturé n'est jamais chauffé à sec.

### 3.1. Le cas du 1,2,4-triazole

#### a) Substitution nucléophile aromatique

La réaction de substitution nucléophile aromatique a été réalisée dans un premier temps avec le 1,2,4-triazole dans les mêmes conditions que pour la synthèse du composé (**15**) soit dans l'acétonitrile au reflux en présence de carbonate de potassium. Selon la littérature, l'utilisation de cet azole peut conduire à la formation de deux isomères, issus de l'attaque de l'azote N<sup>1</sup> ou de l'azote N<sup>4</sup>.<sup>115</sup> Cependant, dans les conditions que nous employons, nous obtenons exclusivement la forme N<sup>1</sup> (*Schéma 21*), confirmée par la présence de deux singulets distincts sur le spectre RMN du proton du noyau azolique.

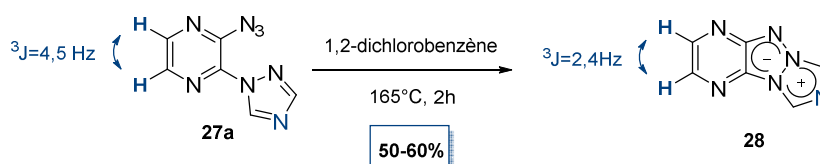


**Schéma 21** : S<sub>N</sub>Ar avec le 1,2,4-triazole.

Malgré la conversion totale observée au bout de 3h de reflux, les premières tentatives de purification du bicyclic (**27a**) sur gel de silice ont conduit à des rendements inférieurs à 50%. Ce rendement décevant est d'une part dû à une élution non uniforme causée par la polarité de ces bicyclics, et d'autre part à la dégradation du bicyclic (**27a**) sur silice par la coupure de la liaison C-N qui induit la libération du triazole. Il a été déjà rapporté que des azoles couplés à un hétérocycle peuvent agir comme des groupements partants sous l'action de nucléophiles.<sup>116</sup> C'est pourquoi nous avons opté pour une précipitation suivie d'une recristallisation (*cf.* partie expérimentale) permettant d'obtenir l'azoture (**27a**) souhaité avec un rendement quantitatif.

#### b) Thermolyse

L'intermédiaire (**27a**) est ensuite engagé dans la réaction de thermolyse (*Schéma 22*) qui conduit à la formation d'un composé bleu-vert fluorescent (suivi par CCM irradié à 365nm).



**Schéma 22** : Thermolyse du bicyclic (**27a**).

<sup>115</sup> Lyga, J.W., & Patera, R. M., N-difluoromethylation of phenylazoles, *Journal of Fluorine Chemistry*, **92** (2), 141–145 (1998)

<sup>116</sup> Tolshchina S.G., Rusinov G. L. & Charushin. 1,2,4,5-tetrazines and azolo[1,2,4,5]tetrazines: Synthesis and reactions with nucleophiles. *Tetrahedron*, **63**, 4199–4236, (2007)

La purification a été réalisée selon la méthode générale mise au point pour ces structures et a permis d'obtenir le composé tricyclique (**28**) avec un rendement moyen compris entre 50 et 60% (en fonction de la quantité du produit de départ). La constante de couplage de 2,4 Hz des protons pyraziniques confirme bien la formation du système tricyclique conjugué.

La différence entre le dérivé (**27a**) et le composé cyclisé (**28**) se révèle non seulement à travers l'analyse spectrométrique, à l'aspect visuel, et aussi par les propriétés physico chimiques observées. Il est en effet intéressant de constater que le bicyclic (**27a**) est peu soluble dans la plupart des solvants organiques contrairement à son analogue (**28**).

### 3.2. Le cas du 1,2,3-triazole

#### a) Substitution nucléophile aromatique

Contrairement au cas précédent, le traitement du 2-azido-chloropyrazine avec le 1,2,3-triazole engendre la formation de deux isomères, dont un majoritaire (Schéma 23).

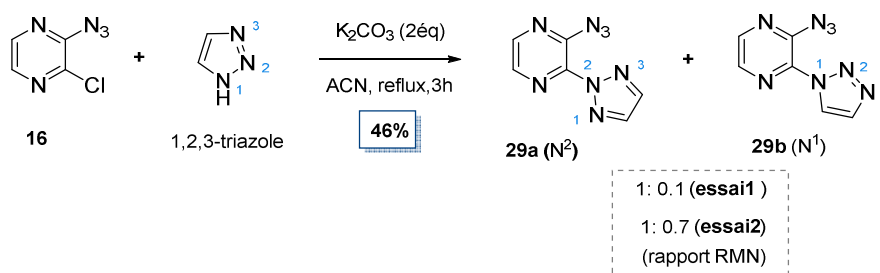


Schéma 23 : S<sub>N</sub>Ar avec le 1,2,3-triazole.

Pour différencier l'isomère N<sup>2</sup> (**29a**) qui est la forme majoritaire, de son analogue N<sup>1</sup> (**29b**), nous nous sommes basés sur les signaux caractéristiques des protons azoliques. Ces protons sortent sous forme d'un singulet dans le premier cas et sous la forme de deux doublets ( $J^3 = 1,4$  Hz) dans le second. Nous avons également constaté que la proportion (**29a**)/(**29b**) variait en fonction des essais et que ces isomères sont peu stables et inséparables sur gel de silice. Le rendement global reste cependant aux alentours de 46%.

#### b) Thermolyse

Face aux tentatives infructueuses de séparation, la thermolyse est réalisée à partir du mélange des deux isomères bicycliques (**29a**) et (**29b**).



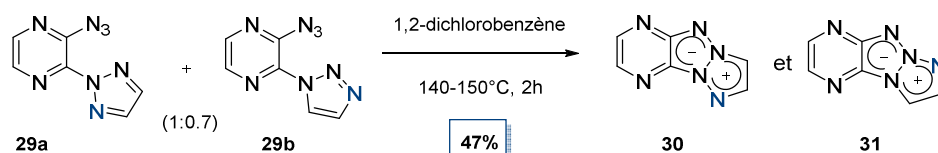


Schéma 24 : Thermolyse des bicycles (29a) et (29b).

Des essais préliminaires ont montré que le composé (29b) est moins stable que son analogue (29a), qui se décompose à 165°C. Nous avons donc baissé la température d'environ 20°C. A cette température le nitrène s'est tout de même formé et a induit la réaction de cyclisation intramoléculaire, permettant d'obtenir les deux isomères (30) et (31). Le rendement global de la thermolyse reste moyen à seulement 47%.

L'analogie structurale de deux isomères se traduit naturellement par une polarité très proche et donc par une forte coélution des deux composés. Leur séparation demande beaucoup d'attention et plusieurs colonnes chromatographiques successives avec des éluants peu polaires et des vitesses d'élutions très lentes ont été nécessaires. De surcroît, leurs signaux caractéristiques en RMN sont semblables. En effet la cyclisation du bicyclic (29a) conduit à la perte de la symétrie qui avait permis de distinguer les deux isomères avant la thermolyse. Afin de différencier les deux structures, nous nous sommes appuyés sur la différence des constantes de couplages des protons azoliques. En effet, le composé majoritaire (30) présente une constante de couplage de 1,1 Hz pour les protons azoliques alors que le composé minoritaire (31) est caractérisé par une constante de 1,9 Hz.

Pour confirmer cette hypothèse, une réaction test de cyclisation à partir d'une très faible fraction pure de l'isomère (29a) a été réalisée (Schéma 25). Comme espérée la constante de couplage est dans ce cas de 1,1 Hz.

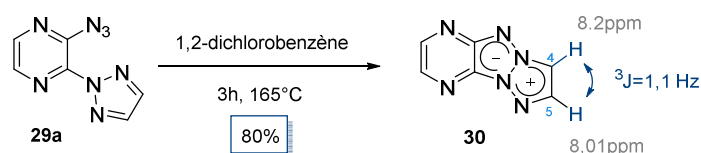
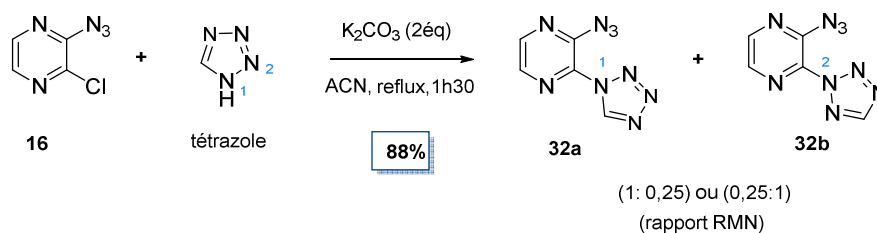


Schéma 25 : Thermolyse du bicyclic (29a).

### 3.3. Le cas du tétrazole

#### a) Substitution nucléophile aromatique

Le tétrazole génère, lui aussi, la formation de deux produits avec un rapport de 1 pour 0,25 (Schéma 26). Alors que dans les cas précédents nous nous sommes beaucoup appuyés sur l'analyse RMN pour distinguer les différents isomères, dans ce cas, cela a été impossible avec l'unique proton sur le tétrazole d'identifier les structures et ce malgré l'utilisation de l'expérience NOE.

Schéma 26 :  $S_NAr$  avec le 1,2,4-triazole.

De fait, comme précédemment, le mélange des deux isomères est engagé dans l'étape de thermolyse.

### b) Thermolyse

Contrairement aux cas précédents où le suivi CCM permettait de visualiser clairement la formation des produits fluorescents, ici, la réaction de thermolyse conduit à la formation d'une multitude de sous-produits non fluorescents, dont les structures n'ont pas pu être élucidées. L'analyse en spectrométrie de masse confirme l'absence de toutes structures ayant la masse des produits souhaités.

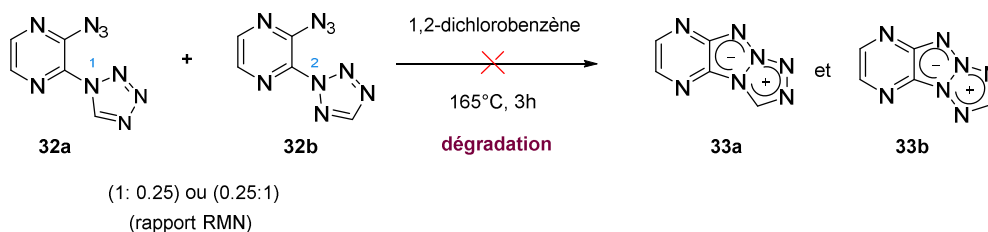
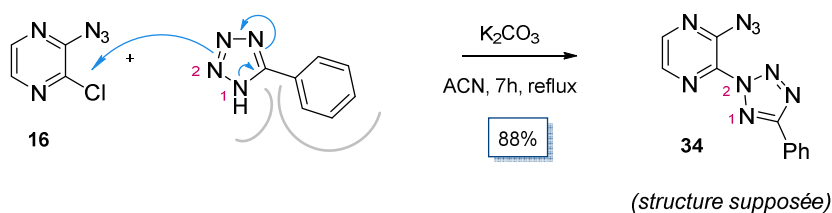


Schéma 27 : Thermolyse des bicycles (32a) et (32b).

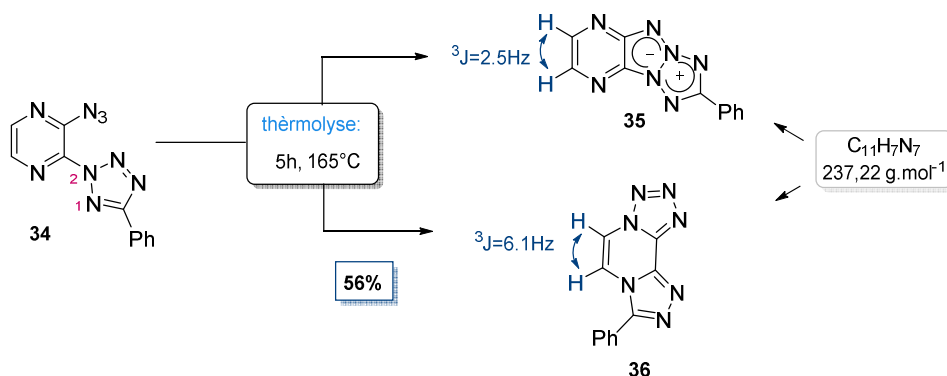
Ceci peut être dû à la sensibilité de la structure polyazotée à la température de réaction, lors de la thermolyse.

Une façon de surmonter ce problème de stabilité de cet analogue tétrazole serait d'utiliser un tétrazole fonctionnalisé, comme le 5-phényltétrazole. En théorie, la présence de ce groupement permettra d'une part d'améliorer la stabilité du noyau azoté. D'autre part, l'encombrement stérique du phényle pourrait permettre de contrôler la sélectivité de la  $S_NAr$  en favorisant l'attaque de l'azote  $N^2$ . En effet, le traitement du 5-phényl tétrazole avec le 2-azido-3-chloropyrazine conduit exclusivement à la formation d'un seul isomère, isolé avec un très bon rendement (Schéma 28).

Schéma 28 :  $S_NAr$  en présence du 5-phényl tétrazole.

L'intermédiaire bicyclique (**34**) supposé est ensuite engagé dans l'étape de thermolyse, réalisée comme précédemment dans le 1,2-dichlorobenzène à 165°C. Après 5 h de réaction, l'azoture est complètement consommé engendrant la formation d'un seul produit bleu fluorescent.

L'analyse spectrométrique de ce dernier confirme bien la formation d'un composé dont la formule brute correspond à celle attendue ( $C_{11}H_7N_7$ ). L'analyse RMN montre la présence des deux doublets correspondant aux protons de la pyrazine et des multiplets des protons du phényle. La seule incohérence concerne la constante de couplage des protons pyraziniques. Comme il a été mentionné précédemment la constante de couplage des protons de la pyrazine fusionnée à un triazapentalène est de 2,5Hz, alors qu'ici on trouve une valeur de 6,1Hz. La structure obtenue n'est donc pas le triazapentalène attendue.

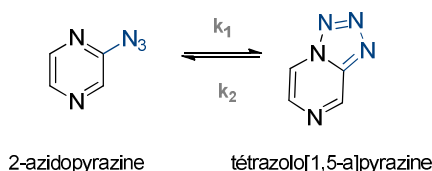
Schéma 29 : Thermolyse du bicyclic (**34**).

Une recherche bibliographique plus approfondie a permis de mettre en avant les travaux de Slepukhin *et coll.*<sup>117</sup> qui ont également essayé d'obtenir le composé (**34**) *via* une substitution nucléophile du 5-phényltétrazole sur le 2-azido-3-chloropyrazine. Cependant après 4 h de reflux dans le DMF en présence de  $Na_2CO_3$ , ils obtiennent un composé tricyclique avec les mêmes caractéristiques spectroscopiques que celles obtenues dans notre cas. Les analyses des diffractions de rayons X réalisées, montrent la formation de la structure tricyclique (**36**). Cette dernière est obtenue suite à une cyclisation intramoléculaire entre l'azote pyrazinique et le tétrazole avec dégagement de diazote. Quant au cycle tétrazole, sa formation est expliquée par un équilibre tautomérique avec la fonction azoture.

<sup>117</sup> Slepukhin, P. A., Rusinov, G. L., Dedeneva, S. S. & Charushin, V. N. Transformations of 8-substituted tetrazolo[1,5-a]pyrazines. *Russ. Chem. Bull.* **56**, 345–350 (2007).

c) *Equilibre azoture/tétrazole*

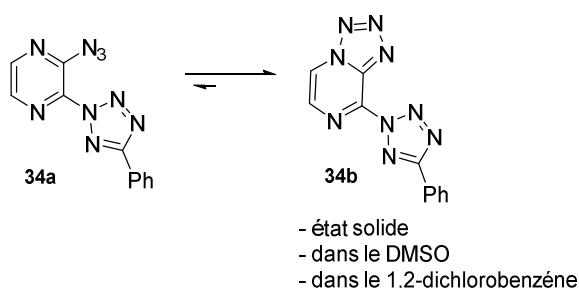
La tautomérie entre la forme azoture et tétrazole a été très étudiée pour la chimie des 2-azidoazines. Ce phénomène met en équilibre une forme cyclisée avec une forme ouverte, comme dans le cas de la 2-azidopyrazine en équilibre avec son isomère tétrazolo[1,5-*a*]pyrazine (*Figure 95*).



**Figure 95** : Tautomérie de l'azidopyrazine.

Wentrup par exemple, s'est intéressé aux facteurs susceptibles d'influencer cet équilibre sur divers azines en s'appuyant sur des techniques spectroscopiques comme l'IR, RMN et la spectroscopie de masse. Il conclut que le déplacement de l'équilibre est fortement dépendant de la nature de l'hétérocycle, de l'état du produit (solide : cristallin ou amorphe, ou en solution), de la nature du solvant, de l'encombrement stérique des substituants et aussi de leur caractère électro-donneur ou attracteur.<sup>118</sup> Les solvants protiques et les températures élevées semblent déplacer l'équilibre en faveur de la forme azoture, mais aucune règle générale ne permet de déterminer théoriquement et à l'avance la conformation que vont adopter ces structures.<sup>119</sup>

Le spectre IR du composé (**34**) à l'état solide ne présente aucune bande caractéristique de l'azoture normalement présent vers 2100 cm<sup>-1</sup>. Le même résultat est obtenu en solubilisant ce composé dans le DMSO et dans le solvant de la thermolyse (le 1,2-dichlorobenzène). La forme prédominante est donc la forme tétrazole (**34b**) (*Figure 96*).



**Figure 96** : Equilibre entre la forme azoture/tétrazole du composé (**34**).

Cet équilibre azoture-tétrazole étant présent sur tous nos intermédiaires azoturés, nos composés ne seront toutefois que représentés dans leur forme ouverte (azoture) afin de rendre ce manuscrit plus clair, rendant implicite l'équilibre avec la forme tétrazolique.

<sup>118</sup> Wentrup, C. Hetaryl nitrenes—II : Azido/tetrazoloazine tautomerisation, and evidence for nitrene formation in the gas-phase. *Tetrahedron*. **26**, 4969–4983 (1970).

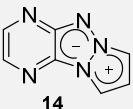
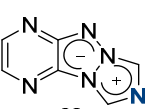
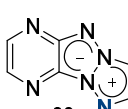
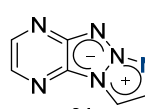
<sup>119</sup> Sato, N., Matsuura, T., Miwa N.; Studies on Pyrazines; Part 30:1 Synthesis of Aminopyrazines from Azidopyrazines; *Synthesis*. (**9**): 931-934, (2009)

En conclusion, malgré les problèmes de régiochimie de la  $S_NAr$  avec les azoles et les difficultés liées à la classe particulière des tétrazoles, nous avons réussi à synthétiser 3 nouvelles structures hétérocycliques (F, G, H) qui seront caractérisées photophysiquement par la suite.

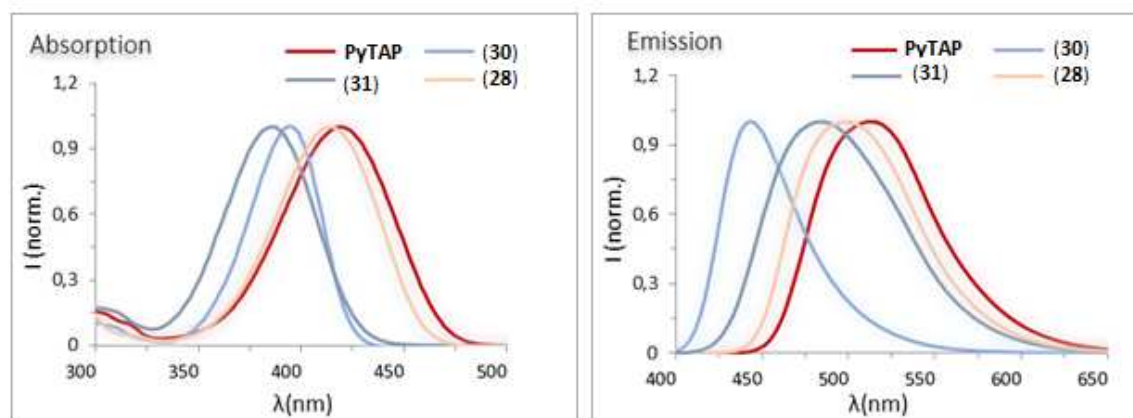
### 3.4. Analyse photophysiques des tricycles (28), (30) et (31)

L'analyse photophysique a été réalisée dans le DMSO avec la *Coumarine 153* comme référence pour le calcul du rendement quantique. L'ensemble des résultats est illustré dans le *Tableau 7*.

**Tableau 7** : Propriétés photophysiques des analogues azotés du PyTAP.

	 <b>14</b> (PyTAP)	 <b>28</b>	 <b>30</b>	 <b>31</b>
solvant	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
$\lambda_{ex}(nm)$	418	414	394	386
$\lambda_{em}(nm)$	516	499	444	483
$\epsilon(M^{-1}.cm^{-1})$	15500	5700	12000	4600
$\Delta$ Stokes	98	85	50	97
$\Phi^{(a)}$	0,15	0,45	0,072	0,074
Brillance	2330	2560	860	340

<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « *Coumarine 153* » avec  $\lambda_{ex}=\lambda_{ex}$  des produits, et  $\Phi=0.38$  dans l'EtOH ;



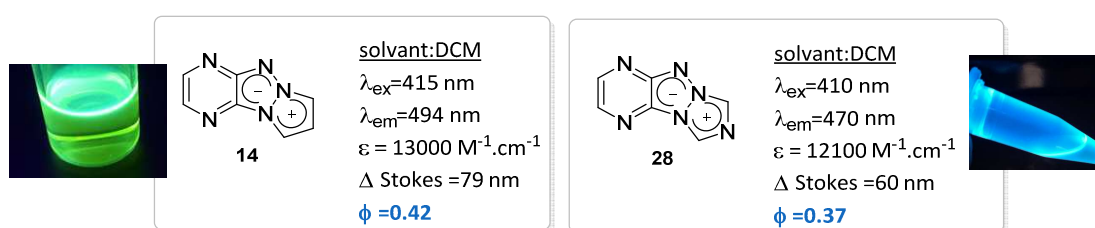
**Figure 97** : Spectres d'absorption et d'émission des analogues tricycliques.

Une première analyse montre que dans tous les cas l'ajout d'un azote supplémentaire sur le noyau azolique engendre un effet hypsochrome. Le même effet est également identifié sur les spectres d'émission, où l'ensemble des valeurs sont inférieures à 516nm ( $\lambda_{em}$  de la référence PyTAP (**14**)). La valeur du coefficient d'extinction molaire a été également minoré. Seul le composé (**30**),

possédant un azote sur la position C<sup>4</sup>, est caractérisé par un  $\epsilon$  assez élevé ( $12\,000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), mais connaît une baisse du déplacement de Stokes d'un facteur 2.

Ainsi, en termes de déplacement de Stokes et de coefficient d'extinction molaire, le composé de référence (**14**) reste le meilleur candidat. Cependant, le composé (**28**) sort aussi du lot avec un rendement quantique triplé par rapport au noyau de référence (**14**) et une meilleure brillance malgré un coefficient d'extinction molaire plus faible.

A ce stade, les études photophysiques font ressortir deux structures tricycliques intéressantes, les composés (**14**) et (**28**) (Figure 98). Ces deux composés se démarquent des autres par leurs propriétés photophysiques uniques obtenues dans des solvants polaires comme le DMSO (Tableau 7) et dans un solvant chloré comme le DCM (Figure 98).



**Figure 98** : Les deux « hits » tricycliques et leurs propriétés photophysiques dans le DCM; les images sont réalisées sur les échantillons solubilisés dans le DCM et irradiés à 365nm.

Il est intéressant de noter que ces deux structures présentent le grand avantage d'être solubles dans l'eau. Nous nous sommes donc intéressés par la suite à l'étude de leur caractère fluorescent dans un environnement aqueux.

#### a) La fluorescence dans l'eau

Cette étude a débuté avec l'analyse du composé (**14**) solubilisé dans l'eau déminéralisée (solubilité mesurée  $> 1\text{ mg/mL}$ ; valeurs calculées :  $\log P = 0,338$ ,  $\log S = 0,58$ ).<sup>120</sup> Les résultats photophysiques (Figure 99) montrent d'excellentes caractéristiques comme : une longueur d'onde d'émission supérieure à 530 nm, un déplacement de Stokes d'environ 120 nm et un coefficient d'extinction molaire supérieur à  $12\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Par rapport aux solvants organiques, la seule différence concerne la baisse du rendement quantique à 2%.

<sup>120</sup> Note : les valeurs de  $\log P$  et  $\log S$  sont calculées avec le logiciel MOE 2014.

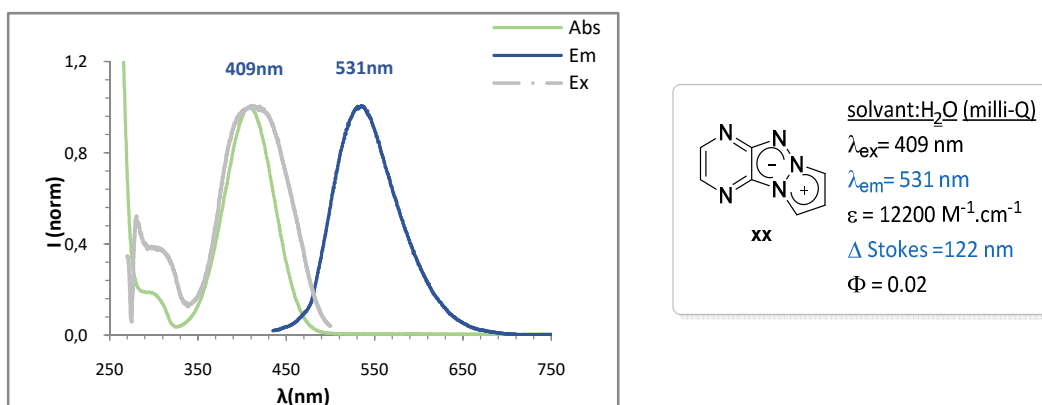


Figure 99 : Spectres d'absorption/excitation/émission dans l'eau du composé(14).

De même, dans le cas du tricycle (28), nous obtenons une longueur d'onde d'émission déplacée vers le rouge et un déplacement de Stokes supérieur à 100 nm (Figure100). Comme précédemment le rendement quantique est de 2%.

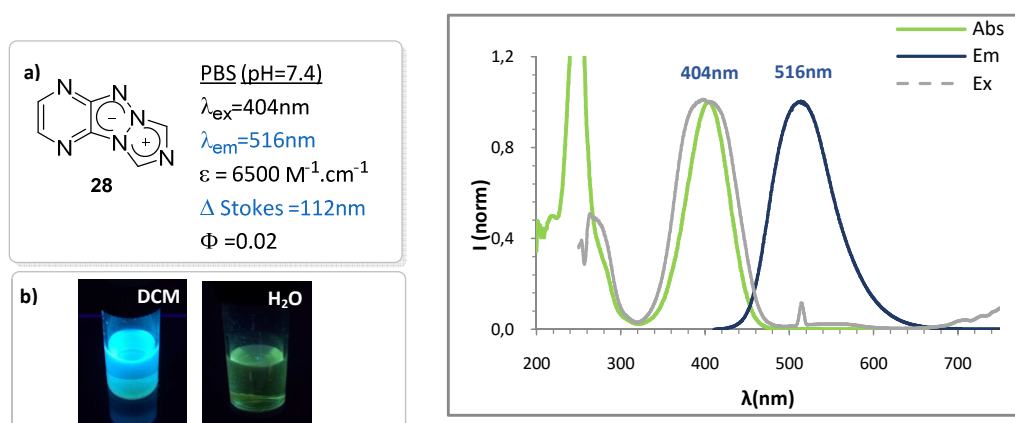


Figure 100 : a) Propriétés photophysiques dans le tampon PBS à pH=7.4 dégazé à l'argon ; le rendement quantique est calculé en utilisant la *Coumarine 153* ( $\lambda_{ex}$  = 404 nm, dans EtOH) ; b) Irradiation à la lampe UV à 365nm ; c) Spectres d'absorption/excitation/émission du composé (28).

Même si ces deux motifs tricycliques (14 et 28) ne présentent pas un caractère fluorescent très marqué dans l'eau, le caractère hydrophile peut être un avantage majeur lors des tests cellulaires. En effet, le caractère amphiphile de ces structures pourrait faciliter le transport de ces marqueurs à travers la membrane cellulaire qui est hydrophobe et à travers le cytoplasme qui est plus hydrophile.

#### d) L'étude du solvatochromisme

Nous avons également étudié la dépendance des propriétés photophysiques de ces chromophores tricycliques face à des facteurs environnementaux. Nous nous sommes intéressés avant tout à l'étude du solvatochromisme, qui consiste à déterminer l'effet induit par le changement de polarité ou la capacité de formation de liaisons hydrogènes sur les processus d'absorption et (ou) d'émission. Les composés fluorescents solvatochromiques sont utilisés dans de nombreuses applications comme par exemple la détermination de polarités locales d'un macrosystème (ex :

membranes cellulaires), l'observation de la fixation des principes actifs aux protéines,<sup>121</sup> ou bien encore la détection des explosifs.<sup>122</sup>

Pour cette étude, nous avons sélectionné une série de solvants (polaires, protiques et aprotiques) et tracé les spectres d'absorption et d'émission du composé (**28**) à la même concentration (Tableau 8, Figure 101). Nous constatons que l'intensité d'absorption mais aussi d'émission est dépendante du solvant. Ainsi dans les solvants protiques (H<sub>2</sub>O et MeOH) la capacité d'absorption du composé est la plus intense, alors que l'intensité d'émission dans ces solvants baisse fortement. La meilleure intensité de fluorescence est obtenue dans les deux solvants aprotiques polaire chlorés testés (DCM et CHCl<sub>3</sub>).

Tableau 8 : Déplacements des longueurs d'onde en fonction des solvants.

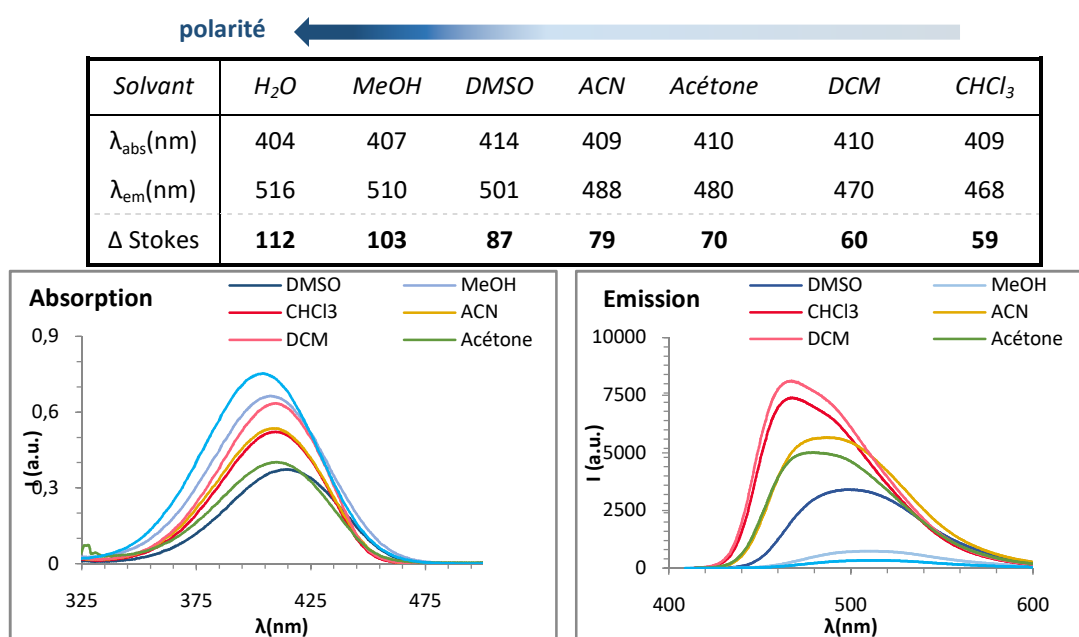


Figure 101 : Spectres d'absorption et d'émission en fonction de la nature du solvant.

De plus, les solvants protiques provoquent un effet hypsochrome sur les longueurs d'onde absorption et un effet inverse sur les spectres d'émission. Cet effet se traduit par des valeurs de déplacement de Stokes importantes dans les environnements protiques, qui diminuent d'un facteur deux lorsque le produit est mis dans un milieu aprotique. Ainsi, dans le cas du composé (**28**), il s'agit d'un solvatochromisme positif.<sup>123</sup> Cette particularité peut être utilisée dans des applications biologiques qui seront menées dans le cadre de ce projet.

<sup>121</sup> Marini, A., Muñoz-Losa, A., Biancardi, A. & Mennucci, B. What is Solvatochromism, *J. Phys. Chem. B*. **114**, 17128–17135 (2010).

<sup>122</sup> Heller, D. A. *et al.* Peptide secondary structure modulates single-walled carbon nanotube fluorescence as a chaperone sensor for nitroaromatics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 8544–9 (2011).

<sup>123</sup> (a) Saito, Y., Suzuki, A., Imai, K., Nemoto, N. & Saito, I. Synthesis of novel push–pull-type solvatochromic 2'-deoxyguanosine derivatives with longer wavelength emission. *Tetrahedron Letters*. **51**, 19, 2606–2609 (2010). (b) Chen, J., Tang, R., Luo, Z. & Yang, C. Solvatofluorochromism of N-[2-(2-hydroxyethylamino)-ethyl]-1,8-naphthalimide in protic solvent. *J. Mol. Struct.* **917**, 170–175 (2009). (c) Itami, K., Yamazaki, D., & Yoshida, J. Pyrimidine-Core Extended  $\pi$ -Systems: General Synthesis and Interesting Fluorescent Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 47, 15396–15397, (2004) (d) Yamaguchi, S., Shirasaka, T., & Tamao, K. Tridurylboranes Extended by Three Arylethynyl Groups as a New Family of Boron-Based  $\pi$ -Electron Systems. *Org. Lett.* **2**, 26, 4129–4132, (2000)



## e) L'effet du pH

Après l'étude du solvatochromisme, nous nous sommes intéressés au comportement et à la stabilité du composé (**28**) en fonction du pH. Pour ce test, le composé a été solubilisé dans 3 tampons de pH 4, 7 et 10 avec une même concentration. Le test consiste à suivre *via* des analyses UV les changements sur les spectres d'absorption du composé dans le temps (Figure 102).

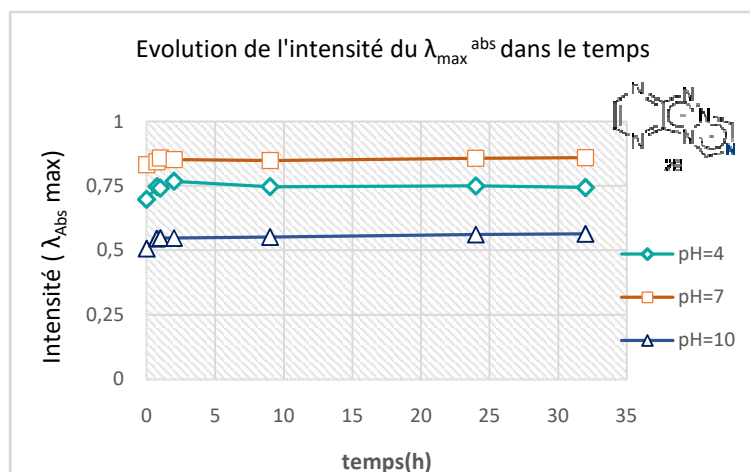


Figure 102 : Stabilité du composé (**28**) à divers pH (4, 7, 10).

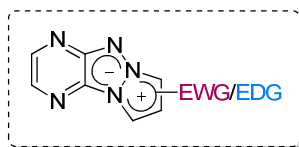
Une première constatation est que les capacités d'absorption du fluorophore tricyclique sont meilleures à pH neutre. La deuxième constatation des plus importantes, est que même après plus d'un jour solubilisé dans les tampons, les spectres d'absorption sont parfaitement superposables, et ceci est valable pour les trois pH, ce qui dénote d'une grande stabilité de ces structures dans une large gamme de pH et sur un temps prolongé.



## Chapitre 3: Etude de réactivité et fonctionnalisation du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène

### 1. Effet donneur-accepteur : Synthèse de molécules modèles

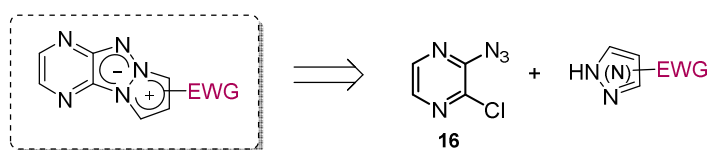
Dans l'état de l'art décrit précédemment, nous avons présenté divers travaux qui traitent des triazapentalènes. L'ensemble de ces publications propose la synthèse de quelques structures bi-, tri- et tétracycliques par construction du motif triazapentalène mais très peu proposent une post-fonctionnalisation. Pour cette raison, la réactivité et l'effet induit sur la fluorescence des composés tricycliques par l'introduction de groupements sont complètement inconnus. Dans cette partie, nous nous sommes donc intéressés à la synthèse de divers triazapentalènes comportant des groupements donneurs ou accepteurs sur le côté azolique, afin d'évaluer la réactivité du tricycle et aussi leur influence sur les propriétés de fluorescence (*Figure 103*).



**Figure 103** : Objectif synthétique global.

#### 1.1. Fonctionnalisation avec des groupements accepteurs(EWG)

L'objectif de cette première partie est d'identifier l'effet d'un groupement attracteur sur le noyau triazapentalène. A ce stade, pour des raisons de facilité de synthèse compte tenu du schéma rétrosynthétique, les positions susceptibles d'accepter des modulations chimiques sont celles de l'hétérocycle pyrazolique (*Schéma 30*).



**Schéma 30** : Fonctionnalisation avec des groupements accepteurs.

Le choix du groupement à introduire s'est porté sur le nitro, en se basant sur son caractère fortement attracteur, permettant un bon effet push-pull, mais aussi sur la facilité de synthèse.

## a) Synthèse de pyrazoles nitrés

Basés sur des méthodes décrites dans la littérature, les deux analogues nitrés 3-nitropyrazole<sup>124</sup> et 4-nitropyrazole<sup>125</sup> ont été synthétisés (Schéma 31).

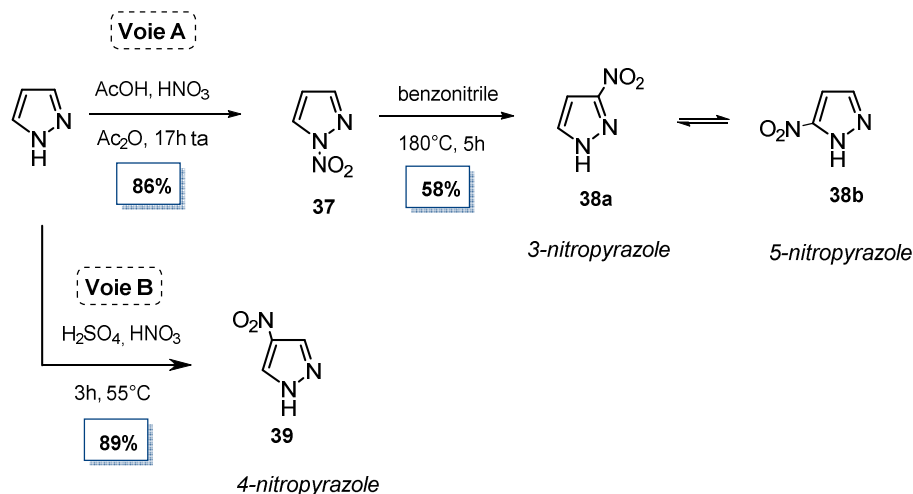


Schéma 31 : Préparation des syntons de base.

Pour nitrer ces positions respectives, la réaction se déroule en présence de  $\text{HNO}_3$ . En fonction du co-acide utilisé ( $\text{AcOH}$  ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), ainsi que de la température exercée durant la réaction ( $180^\circ\text{C}$  ou  $55^\circ\text{C}$ ), il est possible de favoriser une position par rapport à l'autre. La première synthèse (Voie A) est une méthode réalisée en deux étapes permettant d'accéder aux 3/5-nitropyrazoles. La première étape est une nitration de l'azote  $\text{N}^1$  en présence de l'anhydride acétique, une migration du groupement nitro sur une des positions adjacentes aux azotes ( $\text{C}^3$  ou  $\text{C}^5$ ) est alors effectuée à haute température. Dans le second cas (Voie B), la position 4 est nitrée en présence d'un acide très fort, ici l'acide sulfurique, en maintenant un chauffage constant à  $55^\circ\text{C}$ .

b) Synthèse des bicycles nitrés :  $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$ 

Ces pyrazoles nitrés synthétisés ou commerciaux, comme le 3-nitro-1,2,4-triazole, ont ensuite été engagés dans la réaction de  $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$  avec la chloropyrazine (16).

<sup>124</sup> Janssen, J. W. A. M., Koeners, H. J., Kruse, C. G. & Habrakern, C. L. Pyrazoles. XII. Preparation of 3(5)-nitropyrazoles by thermal rearrangement of N-nitropyrazoles. *J. Org. Chem.* **38**, 1777–1782 (1973).

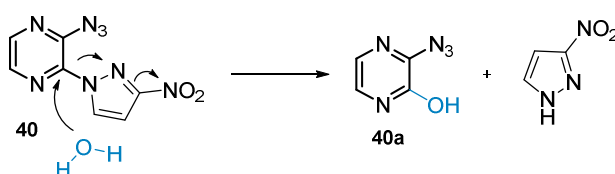
<sup>125</sup> Ek, S. & Latypov, N. V. Four Syntheses of 4-Amino-3,5-dinitropyrazole. *J. Heterocycl. Chem.* **51**, 1621–1627 (2014).

Tableau 9 : S<sub>N</sub>Ar avec divers azoles nitrés.

Entrée	azole	temps	$\eta$	Produits (structures supposées)
1		3h	27-44%	
2		4h	Quant.	
3		1h30	93-95%	

Tout d'abord, notons qu'étant donné que la capacité des structures bicycliques obtenues à posséder des propriétés énergétiques importantes, les trois synthèses sont donc réalisées à de petites échelles (masse de produit inférieure à 100 mg). Dans les trois cas, la formation d'un seul isomère est observée, les structures proposées correspondent aux isomères les plus probables et sont le résultat d'une attaque nucléophile de l'azote N<sup>1</sup>.

Les rendements obtenus sont très variables et fonction du nitroazole de départ. Cette variation peut s'expliquer par le clivage de la partie nitroazole sur silice. Ce phénomène est d'autant plus marqué lors de la purification du composé (**40**), qui malgré une très bonne conversion, n'a été obtenu après chaque purification qu'avec de faibles rendements variant de 27 à 44% (*figure 139*).

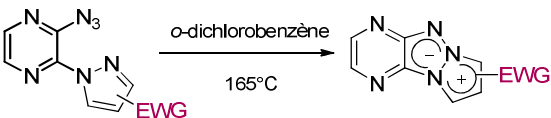
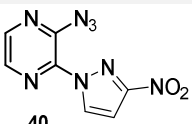
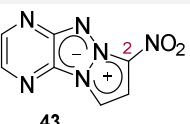
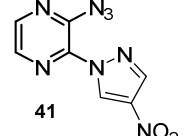
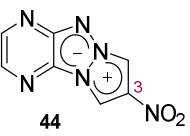
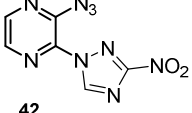
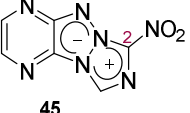
Schéma 32 : Dégradation du composé (**40**).

Le composé (**40a**) est le résultat de cette réaction indésirable, qui se traduit expérimentalement par un produit polaire bloqué sur la phase stationnaire. Il a donc été nécessaire de réaliser cette manipulation sous conditions strictement anhydres pour le bon déroulement de la réaction et de favoriser les purifications par précipitation.

## c) Thermolyse : synthèse des tricycles nitrés

Les composés bicycliques obtenus sont ensuite engagés dans la réaction de thermolyse (tableau 10).

Tableau 10 : Cyclisation par thermolyse.

Entrée	azole	temps	$\eta$	Produit
				
1 <sup>(a)</sup>	 40	1h	93%	 43
2 <sup>(a)</sup>	 41	4h	69%	 44
3 <sup>(a)</sup>	 42	3h	14%	 45

Dans le cas des nitro-pyrazoles (entrées 1 et 2), nous obtenons les triazapentalènes tricycliques souhaités avec de bons rendements. Ainsi, le 2-nitro-PyTAP (**43**) est isolé avec un rendement de 93%, tandis que son analogue 3-nitro-PyTAP (**44**) est obtenu avec un rendement de 69%. La seule exception concerne la thermolyse du composé (**42**) comportant le triazole nitré, qui bien qu'obtenu avec un excellent rendement lors de l'étape de  $S_NAr$ , s'avère dans ce cas très sensible à haute température. Expérimentalement, sa sensibilité se traduit par des résidus noirs insolubles se formant lors de la thermolyse. Cette dégradation n'est pas observée pour les exemples précédents, elle a par conséquent limité le rendement à 14%. La dégradation de ce composé formé et purifié a également été observée au cours du temps, aussi bien à température ambiante qu'en le conservant sous argon au congélateur.

## 1.2. Fonctionnalisation avec des donneurs

Dans cette partie nous nous sommes concentrés sur la synthèse de triazapentalènes comportant les groupements donneurs soit des groupements aminés, soit de type méthoxy sur le noyau azolique afin que ceux-ci puissent potentiellement stabiliser la charge positive. Les amino-triazapentalènes seraient obtenus par réduction de leurs analogues nitrés (**63**, **64** et **65**) obtenus précédemment (voie a, Schéma 33). Pour accéder aux dérivés porteurs de la fonction méthoxy, nous allons employer une méthode classique consistant à insérer les méthoxy pyrazoles sur la pyrazine chlorée (**16**) avant d'effectuer la thermolyse (voie b, Schéma 33).

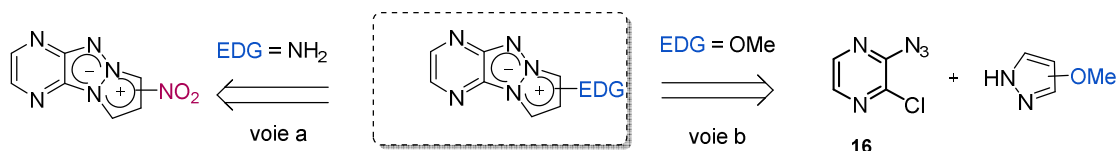


Schéma 33 : Synthèse de pyrazinotriazapentalènes avec groupements donneurs.

## a) Voie a : réduction des pyrazino-1,3a,6a-triazapentalènes nitrés

## ➤ Réduction du 2-nitro-PyTAP (43)

Les méthodes usuellement employées pour réduire un groupement nitro en amine sont l'hydrogénation catalytique, l'utilisation d'hydrures et de métaux comme le fer en milieu acide ou bien le chlorure d'étain dans l'éthanol.

Les premiers essais de réduction ont été réalisés à partir du composé (43) avec l'utilisation des agents de transfert d'électrons comme les chlorures d'étain hydratés ( $\text{SnCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ). Cependant, en présence de ces réactifs le substrat de départ se dégrade entièrement sans que l'on puisse observer le produit réduit. Par conséquent nous nous sommes tournés vers une réduction par hydrogénation (Schéma 34).

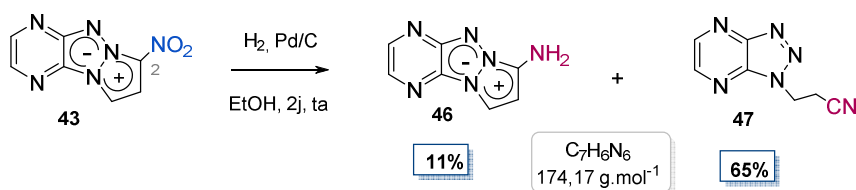


Schéma 34 : Hydrogénation catalytique.

La réduction sous atmosphère d'hydrogène, catalysée par le palladium supporté sur charbon, s'avère plus efficace et permet d'accéder au produit aminé souhaité (46). Cependant, malgré la consommation quasi complète du substrat nitré après 2 jours de réaction, le composé (46) n'a pu être obtenu qu'avec un rendement modeste de 11%. En effet, l'analyse RMN du mélange réactionnel montre la présence du produit souhaité avec le signal caractéristique de l'amine, mais également la présence d'autres sous-produits en quantité non négligeable. Parmi ces signaux, un produit majoritaire se démarque que nous avons identifié comme étant le composé (47) issu d'un réarrangement du composé (66) selon le mécanisme proposé ci-dessous (Schéma 35).

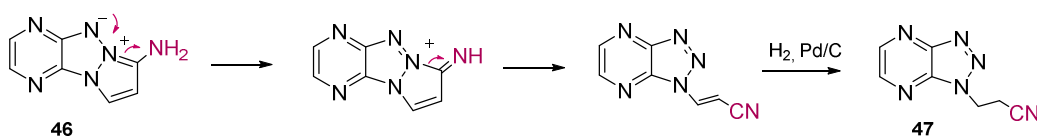


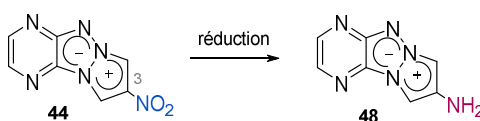
Schéma 35 : Réarrangement du 2-amino-triazapentalène (46).

Le suivi de l'hydrogénation par CCM montre la présence de ce sous-produit dès la première heure de réaction. Il est important de noter que ce réarrangement n'est possible que pendant la réaction d'hydrogénation. Le composé **(46)** isolé n'évolue pas vers le pyrazino-triazole **(47)**.

➤ Réduction du 3-nitro-PyTAP(**44**)

Comme précédemment, la réduction de la fonction nitro, située cette fois dans la position C<sup>3</sup> du 3-nitro-PyTAP (**44**), s'est avérée délicate car la majorité des conditions conduisent à la dégradation du composé (*Tableau 11*).

**Tableau 11** : Réduction du composé (**44**).



Entrée	Agent réducteur	Conditions	solvant	T(C°)	Temps	Conversion	η
1	H <sub>2</sub>	Pd/C	EtOH	ta	16h	aucune	/
2	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DCM /H <sub>2</sub> O (TBAHS)	ta	1h	Traces +dégradation	/
3	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	MeOH /H <sub>2</sub> O	ta	2h	dégradation	/
4	Zn	HCl (1N)	MeOH /AcOH	ta	30min	dégradation	/
5	H <sub>2</sub>	Ni-Raney	MeOH	ta	30min	totale	18%

Les conditions d'hydrogénation utilisées auparavant n'ont pas permis d'aboutir au produit réduit (*entrée 1*). L'analyse du mélange réactionnel après 16 h de réaction indique seulement la présence du produit de départ, sans aucune trace du produit aminé.

L'utilisation de dithionite de sodium (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), avec ou sans agent de transfert de phases (TBAHS), engendre la dégradation du produit de départ (*entrées 2 et 3*). Le même résultat est obtenu en utilisant le zinc en milieu acide (*entrée 4*). Lors du dernier essai nous avons réessayé l'emploi d'hydrogène en utilisant le catalyseur de Nickel de Raney. Cette réaction aboutit au produit réduit (**48**), qui est isolé avec un rendement de 18%. Ce résultat s'explique par la présence d'autres sous-produits non isolés.

➤ Réduction du composé (**45**)

Dans le cas du composé (**45**), nous avons choisi de commencer les tests de réduction par l'hydrogénation en présence du palladium sur charbon, la méthode qui s'est avérée la plus douce avec nos structures tricycliques chargées (*Schéma 36*).



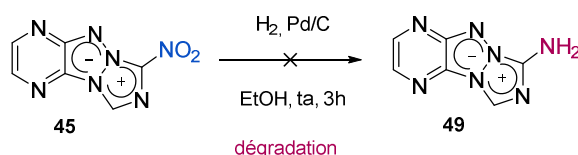


Schéma 36 : Echec de l'hydrogénation catalysée au palladium sur charbon.

Durant cette réaction, le suivi par chromatographie sur couches minces montre la formation d'un produit orange plus polaire accompagné d'un grand nombre de sous-produits. Durant les tentatives de purification, il s'avère que le composé (49) n'est pas stable sur silice. Par conséquent ce dernier n'a pas pu être isolé pur sur silice traitée. A la vue de cette faible stabilité, nous n'avons pas poursuivi l'optimisation des conditions sur ce substrat.

### 1.3. Voie b : Synthèse de méthoxy-PyTAP

Notre deuxième objectif est de synthétiser des méthoxy-PyTAP à partir de méthoxypyrazoles selon la méthode schématisée ci-dessous (Schéma 37).

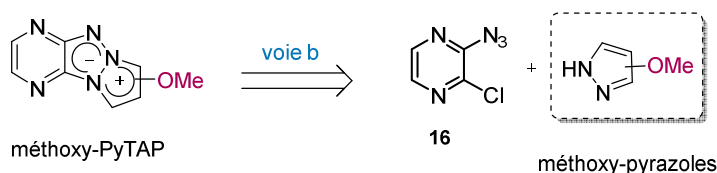


Schéma 37 : Structures générales visées.

Nous nous sommes ainsi intéressés aux 3- et 4-méthoxypyrazoles de départ. Malgré leurs structures simples, ces deux azoles sont très chers et souvent réalisés à façon (Figure 112). Par conséquent nous avons envisagé leur synthèse.

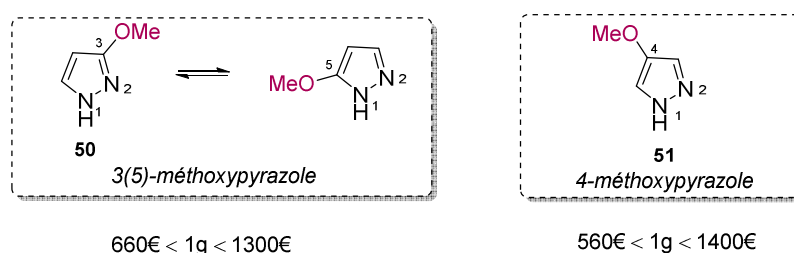


Figure 104 : Précurseurs commerciaux.

#### a) Synthèse du 3-méthoxypyrazole

Pour obtenir le 3-méthoxypyrazole (50), nous nous sommes basés sur des conditions expérimentales décrites dans un brevet.<sup>126</sup> La méthode consiste à obtenir le pyrazole souhaité à partir du 3-méthoxyacrylate de méthyle, un produit de départ accessible et peu onéreux (Schéma 38).

<sup>126</sup> Janin, Y., Guillou, S., New alkoxy pyrazoles. (2010) WO2010015656 (A2).

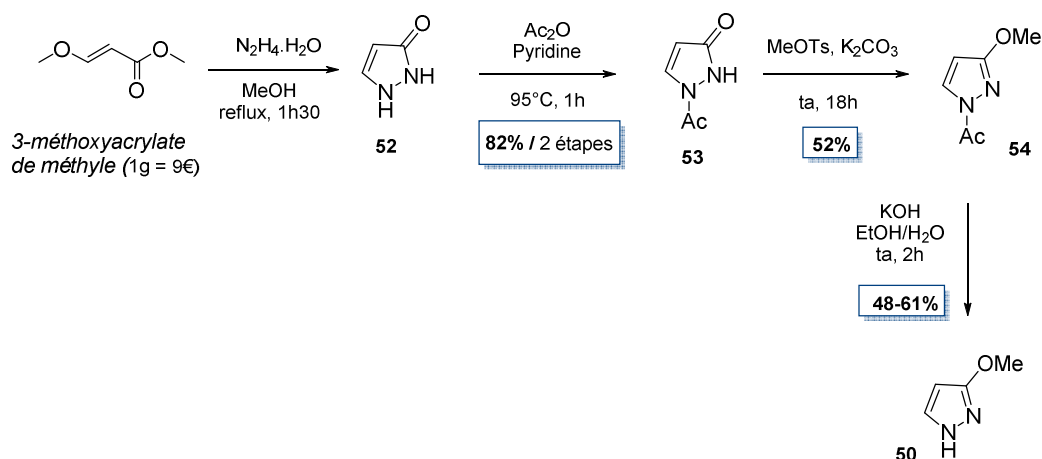


Schéma 38 : Synthèse du 3-méthoxypyrazole (50).

La première étape est réalisée en présence d'hydrazine monohydrate. La formation de l'amide suivie d'une addition de Michael intramoléculaire avec libération de deux molécules de méthanol permettent d'accéder au premier intermédiaire 1H-pyrazol-3(2H)-one (52). Ce dernier est engagé directement dans une étape d'acétylation pour obtenir le composé (53) isolé avec un rendement de 82% sur les deux étapes. Le motif pyrazole est obtenu par une méthylation du groupement carbamide en présence du *p*-toluènesulfonate de méthyle. L'acétyle obtenu est alors déprotégé en milieu basique dans un mélange  $H_2O$ /EtOH. Le rendement de cette dernière étape varie entre 48 et 61% selon la quantité de produit mis en réaction.

#### b) Synthèse du 4-méthoxypyrazole

L'azole comportant le -OMe sur la position 4 a été synthétisé selon la méthode décrite dans un brevet.<sup>127</sup> La méthode consiste à oxyder un dérivé de bore puis à alkyler l'alcool formé, pour obtenir l'éther correspondant (Schéma 39).

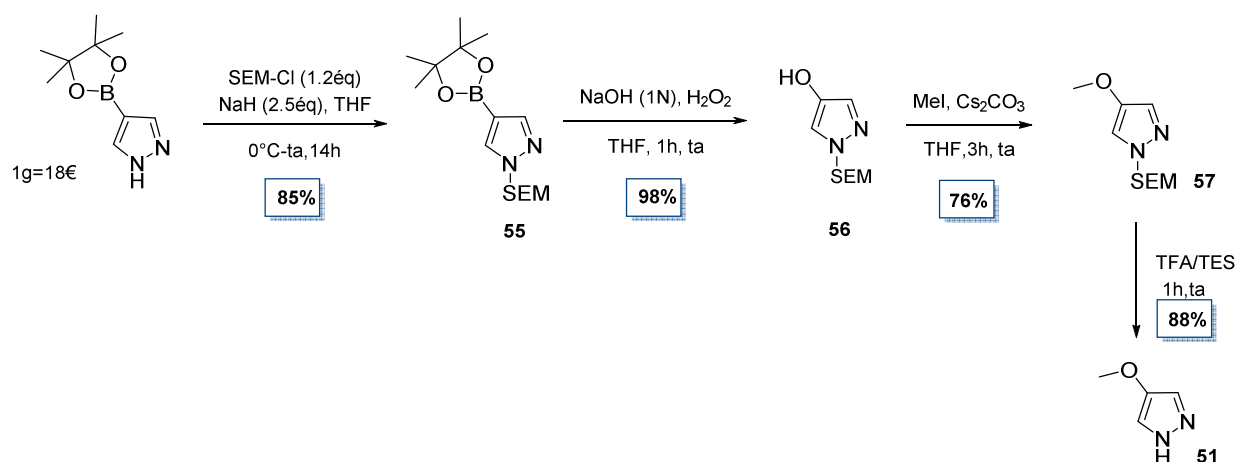


Schéma 39 : Synthèse du 4-méthoxypyrazole.

<sup>127</sup> Oslob, J. D. et al. Heterocyclic modulators of lipid synthesis. (2014) WO2014008197 (A1).

Pour obtenir l'azole (**55**), nous sommes parti du 4-(1*H*)pyrazole pinacole ester, un composé accessible et peu cher. L'azote N<sup>1</sup> est protégé avec le groupement *SEM* afin d'éviter l'alkylation lors des étapes ultérieures. L'alcool (**56**) est obtenu par oxydation en milieu basique en présence d'eau oxygénée. Après seulement 1h de réaction, ce composé est isolé avec un rendement de 98%. L'alkylation de l'alcool en présence d'iodométhane permet d'accéder au groupement méthoxy désiré. L'étape finale est une déprotection du groupement SEM en milieu acide en présence de triéthylsilane (TES). Le 4-méthoxypyrazole (**51**) est finalement isolé après purification sur colonne de silice avec un rendement de 88% sur la dernière étape soit un rendement global de 56% sur les quatres étapes.

### c) Synthèse des méthoxy-PyTAPs

Une fois les pyrazoles (**50**) et (**51**) obtenus, nous avons poursuivi avec la synthèse des triazapentalènes correspondants (**82**) et (**80**).

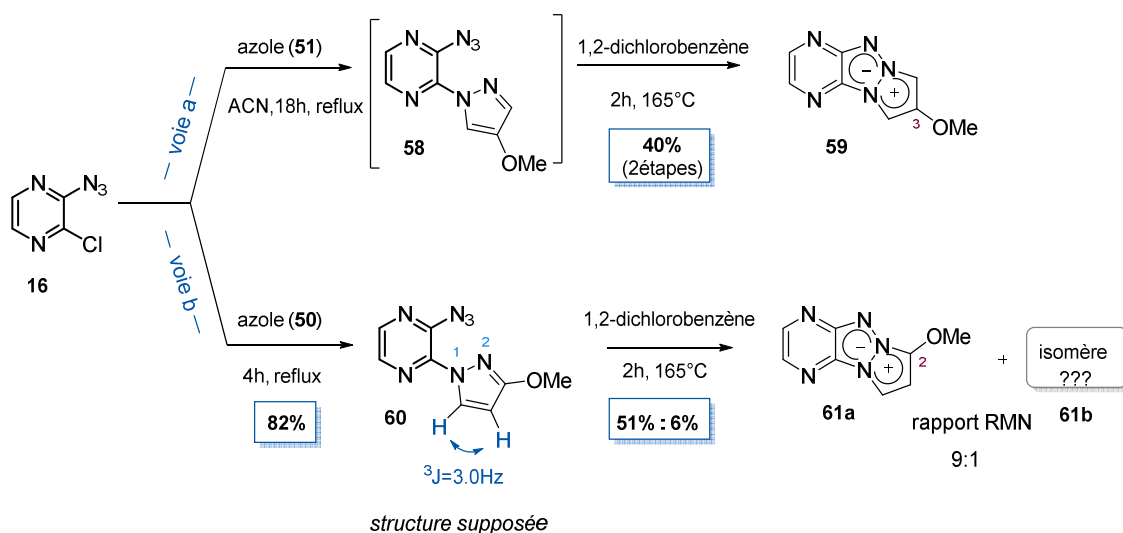


Schéma 40 : Formation des méthoxy-PyTAPs (**59**) et (**61a**).

Les conditions employées pour obtenir le triazapentalène (**59**) contenant le groupement donneur sur la position C<sup>3</sup> sont représentées dans la Schéma 40 (voie a). Il a fallu 18h au reflux de l'acetonitrile pour réaliser la S<sub>N</sub>Ar du 4-méthoxypyrazole (**51**) sur le 2-azido-3-chloropyrazole (**16**). La cyclisation intramoléculaire de l'intermédiaire (**58**) a été achevée après 2h de thermolyse dans le 1,2-dichlorobenzène. Le tricycle souhaité jaune foncé est obtenu avec un rendement correct de 40%.

En parallèle, le traitement du 2-azido-3-chloropyrazole (**16**) avec le 4-méthoxypyrazole (**50**) (voie b, Schéma 40) a permis d'obtenir le bicyclic (**60**) sous la forme d'un seul isomère confirmé par RMN du proton. Pour vérifier que dans ce cas le chlore a été substitué par l'attaque de l'azote N<sup>1</sup>, comme précédemment nous nous sommes basés sur le principe de l'encombrement stérique qui empêche le N<sup>2</sup> de réagir. De plus les protons du pyrazole après la substitution sont caractérisés par une constante de couplage de 3 Hz, alors que nous attendons des constantes plus petites (d'environ

1Hz) pour l'isomère N<sup>2</sup>. Basés sur ces faits, nous avons poursuivi avec la thermolyse, qui contrairement au cas précédent engendre la formation de deux produits avec un rapport estimé par RMN de 9 pour 1. La difficulté qui se présente ici réside dans les caractéristiques similaires de deux structures obtenues. L'analyse en HRMS dévoile des masses moléculaires et des formules brutes identiques et les deux composés comportent le même nombre de signaux en RMN du proton avec 4 doublets et un singulet chacun (*figure 116*).

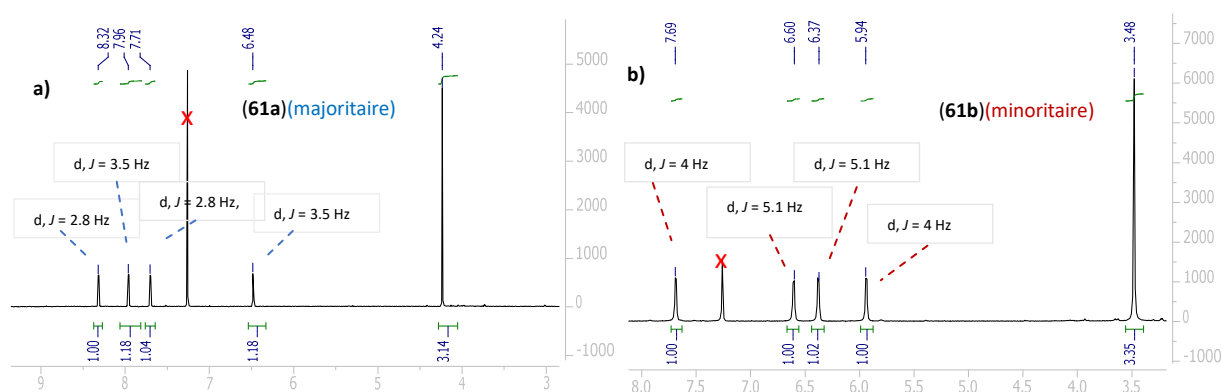


Figure 105 : Comparaison des spectres RMN du proton du (61a) et (61b).

Pour pouvoir identifier le composé tricyclique mésoionique, nous nous sommes basés sur la signature RMN des triazapentalènes. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les protons de la pyrazine sur une structure tricyclique sont caractérisés par une constante de couplage comprise entre 2,5 et 2,8Hz et d'environ 4,5Hz sur la pyrazine avant sa cyclisation. Or dans ce cas, nous distinguons clairement les doublets à 2,8 Hz, caractéristiques des triazapentalènes de la série pyrazine dans la *Figure 105a*, correspondant au composé majoritaire isolé après la thermolyse. Dans le deuxième cas il ne s'agit pas d'un composé mésoionique car les constantes de couplages sont trop importantes. Il ne s'agit pas non plus d'un système totalement aromatique car les déplacements chimiques autour de 6ppm ne sont pas caractéristiques ni des pyrazines ni des azoles. Il s'agit certainement d'un réarrangement réalisé avec la libération d'une molécule de diazote. Malheureusement, cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée car les corrélations à longue distance se sont montrées inefficaces, et le produit n'a pas pu être cristallisé. Il a été observé qu'un chauffage de 4h favorise la formation de ce composé, dans un rapport 50 : 50 avec le composé tricyclique (61a).

#### 1.4. Analyse photophysique : Effet donneur-accepteur

##### a) Effet accepteur

L'ensemble des données représentées dans le *tableau 12* montre clairement que la présence du groupement nitro inhibe la fluorescence du motif central. Ces résultats sont en accord avec l'état de l'art, dans laquelle il est reporté le potentiel du groupement nitro, qui peut réagir comme un

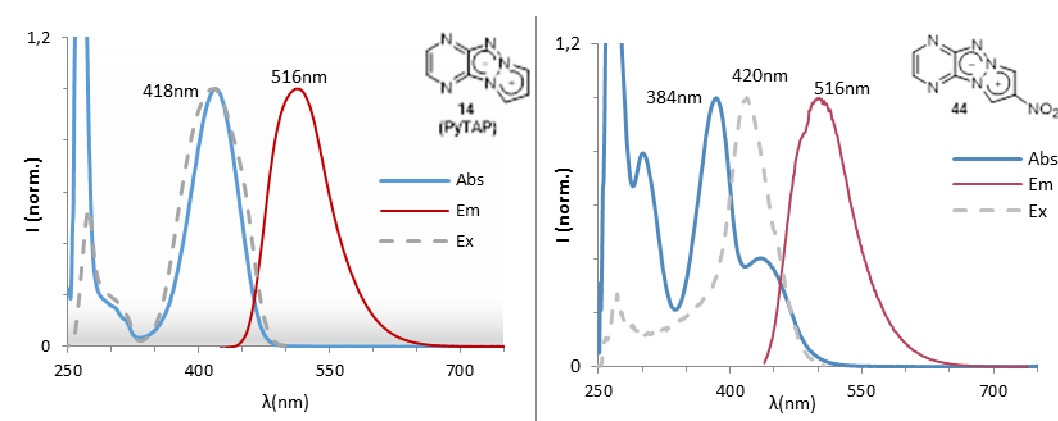
« quencheur » de la fluorescence.<sup>128</sup> Les rendements quantiques correspondants aux trois analogues nitrés sont ainsi inférieurs à 0,1%.

**Tableau 12 :** Propriétés photophysiques de (nitro)-pyrazinotriazapentalènes.

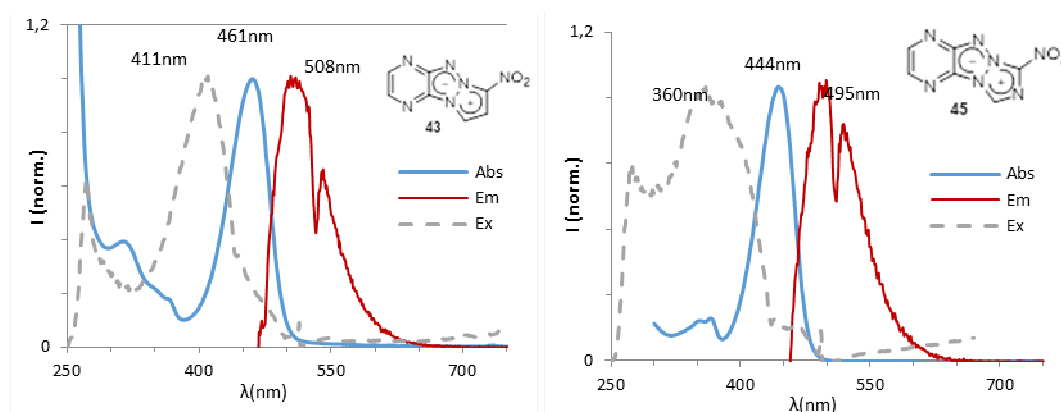
solvant	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
$\lambda_{\text{abs}}(\text{nm})$	418	461	384	414	445
$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	418	411	420	414	360
$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	516	508	516	499	494
$\epsilon(\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$	15500	2400	4300	5700	30000
$\Delta \text{ Stokes}$	98	97	132	85	134
$\phi^{(a)}$	0.15	<0,001	<0,001	0,45	<0,001

<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « *Coumarine 153* » avec  $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{ex}}$  des produits, et  $\Phi = 0.38$  dans l'EtOH;

Malgré la perte de la fluorescence, le groupement nitro a toutefois quelques effets positifs, dont l'augmentation du déplacement de Stokes. Excepté le composé (**43**) qui a le même déplacement que la molécule de référence (**14**), les deux autres connaissent une augmentation d'environ 34-36nm. De plus, le composé (**45**) présente une valeur du coefficient d'extinction molaire qui est cinq fois supérieure à son analogue non fonctionnalisé (**28**).



<sup>128</sup> Ueno, T., Urano, Y., Kojima, H. and Nagano, T.; Mechanism-Based Molecular Design of Highly Selective Fluorescence Probes for Nitritative Stress; *J. Am. Chem. Soc.* **128** (33), 10640–10641, (2006).



**Figure 106** : Spectres d'absorption/excitation/émission des triazapentalènes portant un groupement nitro.

Un autre détail intéressant réside dans la différence entre les longueurs d'ondes d'excitations et d'absorption relevées sur les trois dérivés. Ce résultat peut sembler surprenant, puisque dans le cas du composé non substitué, la longueur d'onde d'absorption correspond à celle d'excitation (Figure 106).

Malgré l'absence de propriétés photophysiques prometteuses, ces produits pourraient avoir un intérêt dans le cas où la transformation du groupement nitro, *via* sa réduction en amine ou autre, pourrait déclencher ces propriétés de fluorescence. Ce phénomène pourrait induire un signal « off-on ». Sous l'effet d'un facteur extérieur en restituant la fluorescence du noyau triazapentalène. Ces produits pourraient être utilisés dans des applications telles que la détection des tissus déficients en oxygène qui peuvent être caractéristiques de tissus cancérigènes.

#### b) Effet donneur

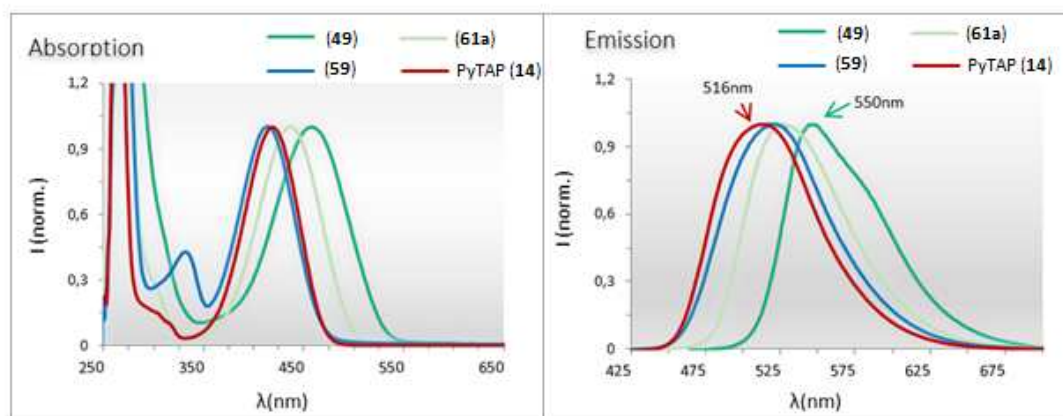
L'introduction de groupements donneurs sur la partie pyrazolique du tricycle produit un effet plus puissant que celui exercé par le groupement nitro.

**Tableau 13** : Propriétés photophysiques des (amino) et (méthoxy)-PyTAP.

solvant	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	418	458	437	415
$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	516	550	526	521
$\epsilon(\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$	15500	9300	13200	13700
$\Delta$ Stokes	98	108	89	106
$\Phi^{(a)}$	0,15	0,006	0,04	0,03

<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « Coumarine 153 » avec  $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{ex}}$  des produits, et  $\Phi = 0,38$  dans l'EtOH.

Un des effets positifs constants est observé sur l'effet bathochrome induit, notamment dans le cas du composé **(49)** qui connaît une augmentation de 40 nm par rapport à la molécule **(14)** de référence. Le déplacement vers des longueurs d'ondes plus grandes est aussi observé sur les spectres d'émission des trois composés, tous étant caractérisés par une longueur d'onde d'émission supérieure à 516 nm ( $\lambda_{em}$  du composé **(14)**). Le composé qui se démarque avec une hausse de 34 nm en  $\lambda_{em}$  par rapport à la molécule de référence est à nouveau le tricycle aminé **(49)**. Même si ces structures montrent des caractéristiques plutôt intéressantes, leurs rendements quantiques restent en revanche assez bas.

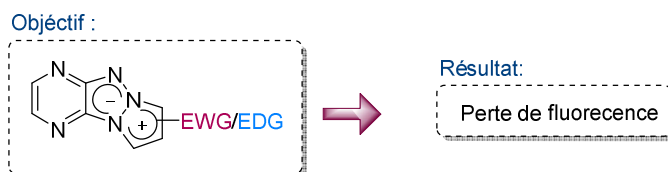


**Figure 107 :** Spectres d'absorption et d'émission normalisés des composés avec des groupements EDG **(14)**, **(49)**, **(59)**, **(61a)**.

### Conclusion

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la synthèse de divers triazapentalènes comportant des groupements électrodonneurs et électroattracteurs sur le côté azolique. Nos objectifs étaient de développer des méthodes de synthèse permettant l'accès à ce type de structures et d'évaluer la corrélation entre les propriétés photophysiques du noyau triazapentalénique et la nature du groupement porté par le noyau azolique (EWG et EDG).

Notre premier objectif a été atteint car nous avons pu obtenir divers noyaux tricycliques analogues du PyTAP avec des groupements électroattracteurs et électrodonneurs. En revanche, les analyses photophysiques ont montré que les deux familles de groupements ont un effet négatif sur la fluorescence du triazapentalène. Cet effet est d'autant plus renforcé dans le cas des groupements fortement attracteur comme les nitro qui conduisent à un « quenching » complet de la fluorescence.



**Figure 108 :** Effet des groupements EWG/EDG.

## 2. Synthèse de nouveaux dérivés du PyTAP

La présence de groupements électrodonneurs et électroattracteurs directement liés au noyau pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène n'ayant conduit à aucune amélioration de la fluorescence, nous avons envisagé des synthèses de nouveaux analogues du PyTAP liés à un système conjugué, avec l'espoir que cette conjugaison permette d'obtenir de meilleurs résultats en terme de fluorescence. Pour ce faire, le noyau pyrazole introduit par  $S_NAr$  pourrait être fonctionnalisé avec un halogène ou un boronate, qui permettra l'introduction d'une large diversité de composés (hétéro)aromatiques porteurs des groupements EDG ou EWG par un couplage organométallique (Schéma 41).

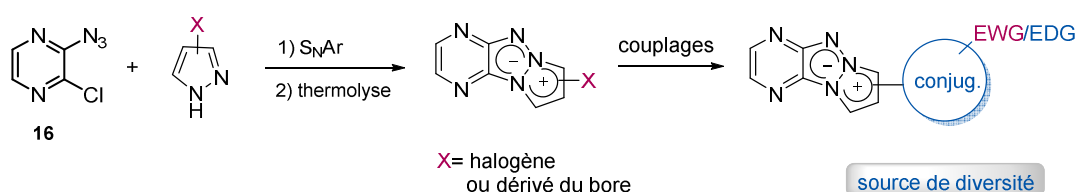


Schéma 41 : Diversification structurale des triazapentalènes tricycliques.

### 2.1. Synthèse de dérivés halogénés et des dérivés du bore

#### a) Synthèse séquentielle

Pour atteindre l'objectif des composés tricycliques porteurs d'un halogène ou d'un dérivé du bore, nous sommes partis de pyrazoles judicieusement fonctionnalisés en 4. Ainsi, quel que soit l'azote du pyrazole réagissant lors de la  $S_NAr$ , un seul composé est formé. L'ensemble des produits obtenus est représenté ci-dessous :

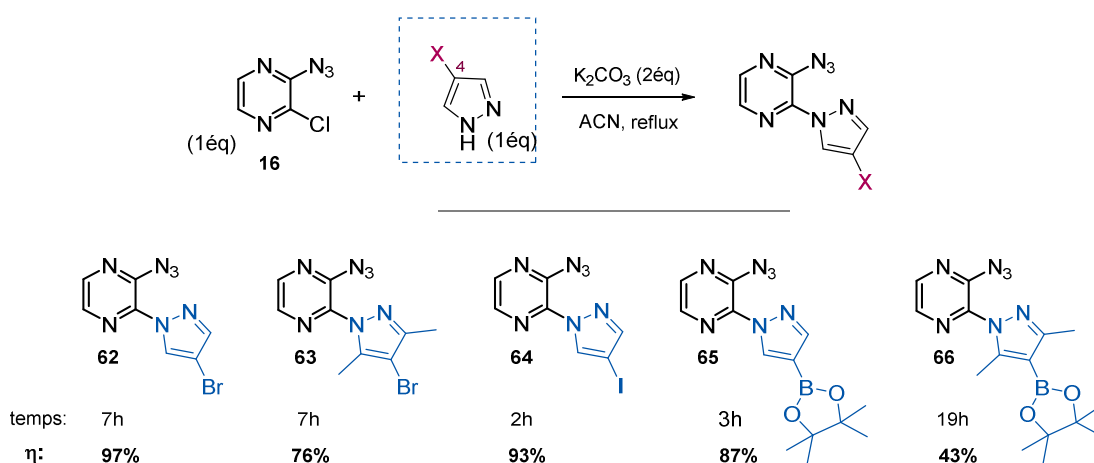


Schéma 42 :  $S_NAr$  avec des pyrazoles halogénés ou comportant des boronates.



L'ensemble des réactions de  $S_NAr$ , à l'exception de celle conduisant au composé (**66**) conduit aux produits bicycliques avec de très bons, voire d'excellents rendements et avec des temps de réaction relativement courts, entre 2 et 7h. La difficulté de l'étape de substitution réside essentiellement dans la purification et le traitement des produits bicycliques, chacun ayant nécessité un traitement spécifique. Les meilleures conditions opératoires identifiées (précipitation, recristallisation, colonne) sont détaillées dans la partie expérimentale.

Une fois les azotures (**62-66**) correctement purifiés, nous avons poursuivi avec la réaction de thermolyse dans les conditions générales précédemment décrites. Ceci nous a permis d'obtenir avec de très bons résultats cinq nouveaux dérivés du pyrazinotriazapentalène fonctionnalisés en C<sup>3</sup> (Schéma 43).

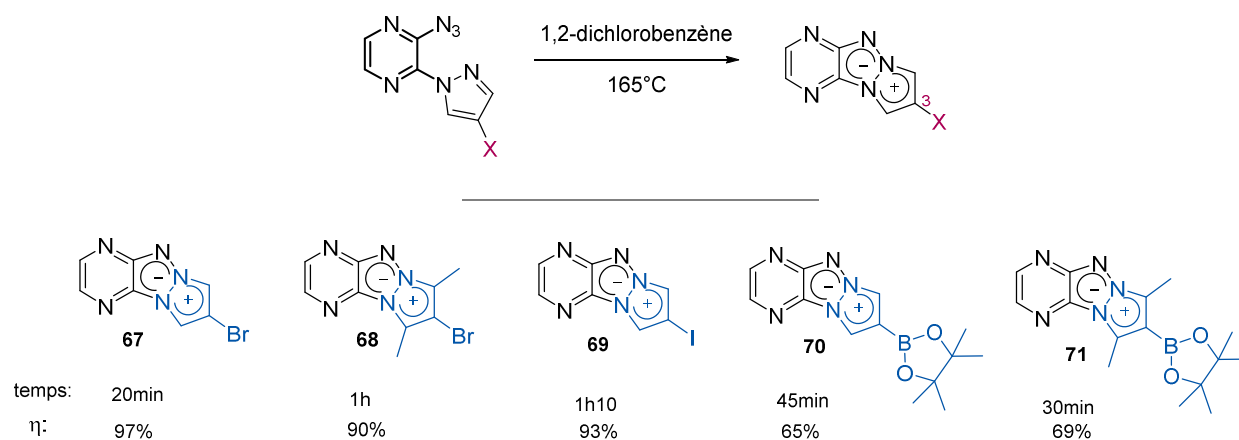


Schéma 43 : Synthèse de dérivés halogénés et boroniques du PyTAP.

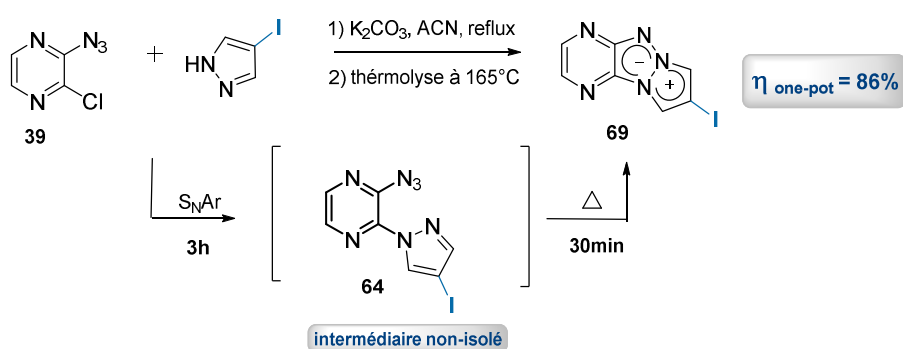
Les dérivés halogénés (**67-71**) se sont montrés des composés très stables à l'air, à température ambiante et lors de leur purification sur gel de silice. Les ester pinacoliques (**70** et **71**) sont tout aussi stables et ne nécessitent aucune précaution particulière. Mieux encore, ces deux structures sont solubles dans la plupart des solvants organiques, polaires et apolaires, en revanche, contrairement aux dérivés halogénés, ces deux composés restent fixés à la colonne quel que soit la phase stationnaire (silice, alumine ou C<sub>18</sub>) ou la phase mobile utilisée pour leur purification. De fait, l'élimination du solvant de thermolyse s'effectue sous pression réduite à l'aide d'une pompe à palette

#### b) Synthèse « one-pot »

Dans les parties précédentes, il a été remarqué que très souvent les intermédiaire bicycliques issus de la réaction de  $S_NAr$  des azoles avec la pyrazine chlorée sont peu solubles, chimiquement sensibles, ou encore potentiellement explosifs (cas des intermédiaires nitrés). Pour remédier à ces différents problèmes, nous sommes intéressés à la réaction « one-pot » en combinant les étapes de  $S_NAr$  et de thermolyse sans isoler l'intermédiaire bicyclique.

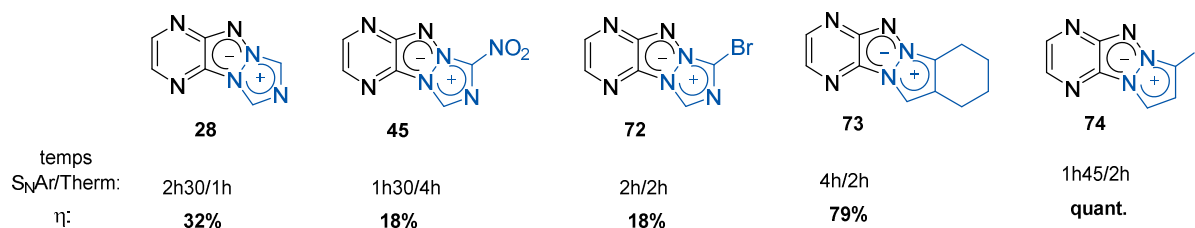
Pour commencer, nous avons voulu réaliser les deux étapes dans le même solvant. Cependant, il s'avère que la substitution nucléophile ne fonctionne pas dans le 1,2-dichlorobenzène. Alternativement, l'acétonitrile n'est pas un solvant à point d'ébullition suffisamment élevé pour réaliser la réaction de thermolyse. Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque la substitution nucléophile est réalisée dans l'acétonitrile en présence du carbonate de potassium. Une fois cette étape finie, le solvant est évaporé complètement (ou partiellement dans le cas des intermédiaires énergétiques) et est remplacé par le 1,2-dichlorobenzène.

Un exemple est présenté dans la *Schéma 44*. Il s'agit de la synthèse du dérivé iodé (**69**) qui a été obtenu précédemment qui est obtenu avec un rendement global de 86% en passant par la purification du bicyclic (**64**). En s'affranchissant de cette étape, nous avons obtenu le composé final avec le même rendement confirmant le caractère superflu de cette purification intermédiaire.



**Schéma 44** : Synthèse du composé (**69**) en « one-pot ».

Cette méthode a été testée sur d'autres produits obtenus précédemment comme le composé (**28**) et son analogue nitré (**65**) et les rendements sont similaires quel que soit la méthode. Nous l'avons ensuite également appliqué à de nouveaux azoles qui ont conduit à la formation de nouvelles structures (**72,73,74**) avec des rendements globaux variant de 18% à 100% (*schéma 45*).



**Schéma 45** : Structures proposées de composés fluorescents obtenus *via* la réaction « one-pot ».

Il est important de constater que dans tous les cas, l'étape de  $S_NAr$  conduit à la formation d'un seul isomère. Si la nature de ces isomères n'a pas pu être confirmée avec certitude par l'analyse RMN, il est toutefois probable que ces composés soient formés par la réaction de l'azote N<sup>1</sup> (N<sup>2</sup> pour le composé (**74**)) des pyrazoles du fait de sa plus grande accessibilité. Des analyses supplémentaires

par RMN de l'azote N<sup>15</sup> ou des essais de cristallisation sont envisagés pour confirmer cette hypothèse.

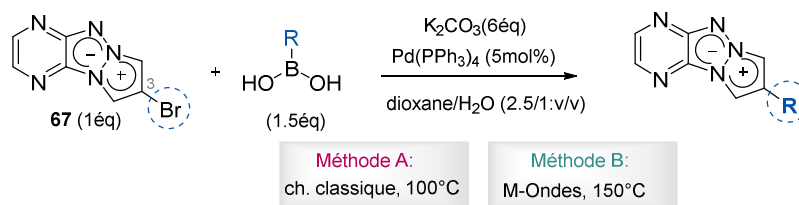
## 2.2. Fonctionnalisation de triazapentalènes via les réactions de couplage

Ayant en main plusieurs triazapentalènes fonctionnalisés avec des halogènes et des esters boroniques, nous avons poursuivi notre étude avec la mise au point des méthodes de couplage permettant de diversifier ces structures.

### a) Couplage de Suzuki-Miyaura : fonctionnalisation de la position C<sup>3</sup> du PyTAP

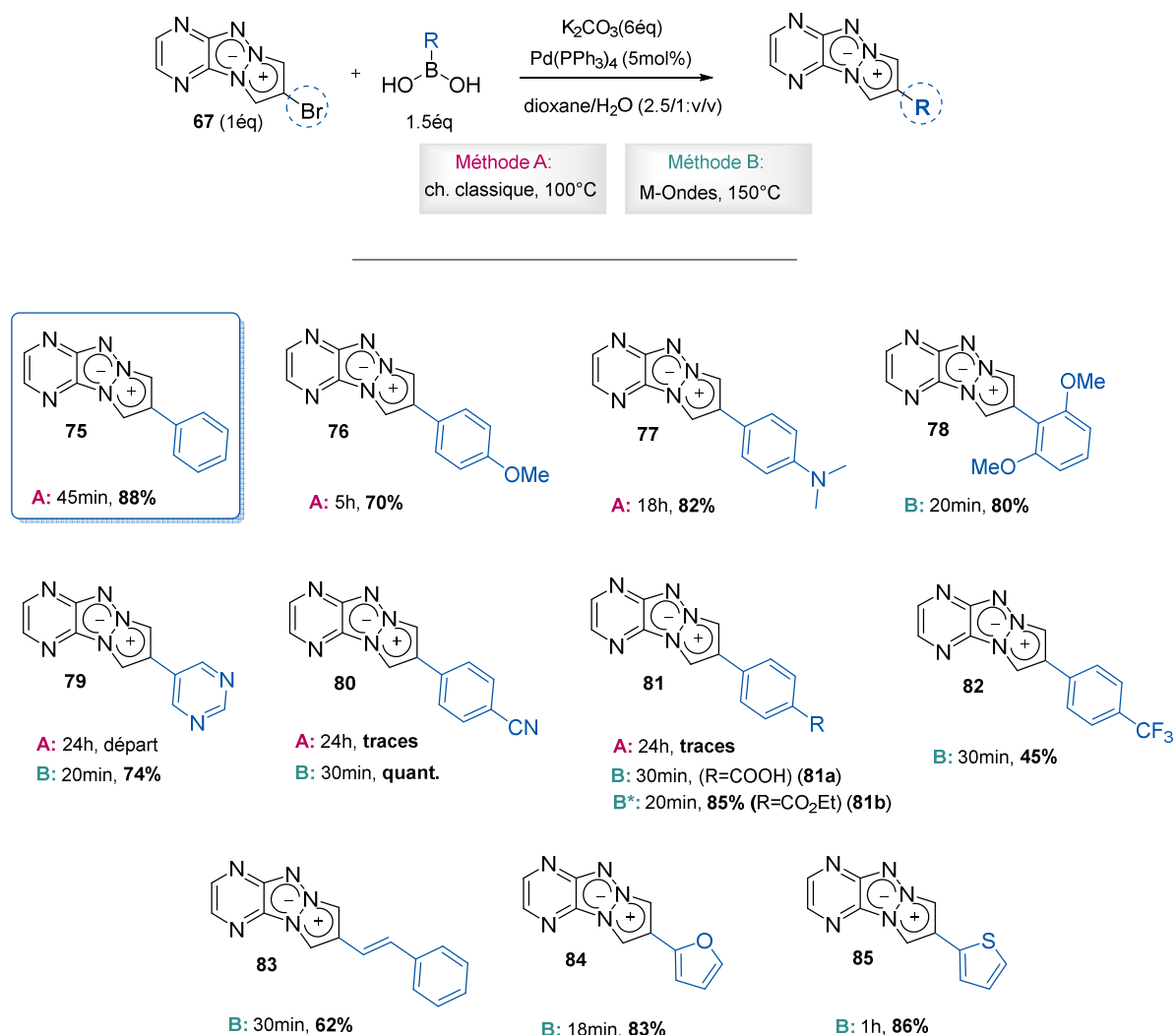
Pour débiter notre investigation sur la réactivité des triazapentalènes tricycliques, nous nous sommes intéressés à un des couplages les plus habituellement utilisés en chimie hétérocyclique, le couplage de Suzuki-Miyaura. Ce type de réaction peut être envisagé au départ des 3-halogéno-PyTAP (**67** et **69**) et aussi des triazapentalènes porteurs de fonctions esters boroniques.

Pour choisir le substrat le plus adapté nous nous sommes appuyés sur la littérature, dans laquelle la prévalence de composés bromés est très marquée. L'utilisation de ces composés permettrait de surcroît de minimiser les réactions de déhalogénéation, particulièrement observée sur les produits iodés. Les conditions appliquées sont celles classiquement utilisées dans ce couplage palladié, à savoir une catalyse avec le tétrakis(triphénylphosphine)palladium, en présence d'un excès de base inorganique dans un mélange 1,4-dioxane/eau (*Schéma 46*).



**Schéma 46** : Conditions générales du couplage de Suzuki-Miyaura.

La température et le mode de chauffage ont été adaptés à la réactivité de nos substrats. Suite aux optimisations, deux méthodes ont été retenues. La première consiste à chauffer le mélange réactionnel au reflux par un chauffage thermique. La deuxième méthode passe par une irradiation aux micro-ondes à 150°C et elle est employée dans le cas où la première méthode reste inefficace. Les acides boroniques sont choisis de telle sorte à amener une grande diversité structurale. Nous avons donc utilisé des espèces (hétéro)aromatiques comportant différents groupements électrodonneurs et électroattracteurs avec l'espoir d'observer une amélioration des propriétés photophysiques (*Schéma 47*).



**Schéma 47 :** Triazapentalènes obtenus par couplage de Suzuki-Miyaura (\*): méthode B avec dioxane/EtOH (2.5/1, v/v) comme solvant.

Avec l'acide phénylboronique, nous avons été surpris de constater une conversion totale après seulement 45min de reflux du solvant et le produit attendu a été isolé avec un excellent rendement de 88%. Satisfaits de ces premiers résultats, nous avons employé divers acides boroniques contenant des groupements donneurs en *para*, comme par exemple avec un groupement méthoxy (**76**) ou un groupement diméthyle amino (**77**). Dans les deux cas le rendement reste correct. En revanche cette fonctionnalisation a un impact sur le temps de réaction qui est plus long. Dans le cas de l'acide (diméthoxy)phénylboronique (**78**), une irradiation aux micro-ondes et une température plus importante ont été nécessaires pour favoriser le couplage.

Des acides boroniques avec des noyaux aromatiques déficients en électrons ont aussi été introduits (exemples de **79** à **82**). Dans les quatre cas, aucune conversion n'est constatée en utilisant un chauffage thermique. Nous avons dû avoir recours à la *Méthode B*. Ainsi, les rendements vont de très bons à excellents, avec comme seul contre-exemple le composé (**82**) dont le résultat s'explique par des difficultés de purification (*cf.* partie expérimentale). Avec la deuxième méthode il est possible

d'introduire aisément des groupements de type styrène (**83**), ou des hétérocycles à 5 chaînons comme les furanes et les thiophènes (exemples **84** et **85**). Il est intéressant de noter qu'avec les conditions aqueuses l'utilisation du 4-(éthoxycarbonyl)phénylboronique conduit à la formation du produit hydrolysé (**81a**). Il a été nécessaire de remplacer l'eau par l'éthanol pour obtenir le composé (**81b**) souhaité.

Ayant parmi nos molécules synthétisées un dérivé du triazapentalène halogéné sur la position C<sup>2</sup> (**74**), nous avons réalisé un exemple de couplage de Suzuki-Miyaura à partir de ce précurseur, sous irradiation micro-ondes, avec l'acide phénylboronique (Schéma 48).

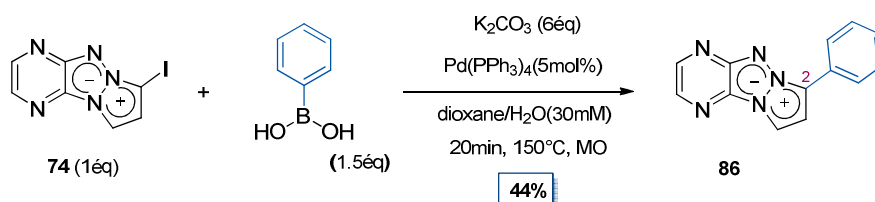


Schéma 48 : Couplage de Suzuki-Miyaura sur la position C<sup>2</sup> du PyTAP.

La réaction est rapide et le produit de couplage est isolé avec un rendement de 44%. Ce rendement modeste s'explique par la présence importante du composé de déhalogénéation qui s'avère, de plus, difficile à éliminer. Pour minimiser la perte de l'halogène il serait intéressant de réaliser la réaction en utilisant le dérivé bromé ce qui n'a pas pu être fait faute de temps.

- Quelques limitations du couplage de Suzuki-Miyaura

Malgré la grande diversité de dérivés boroniques compatibles avec la méthode mise au point, nous avons dû faire face à quelques limitations (Figure 109).

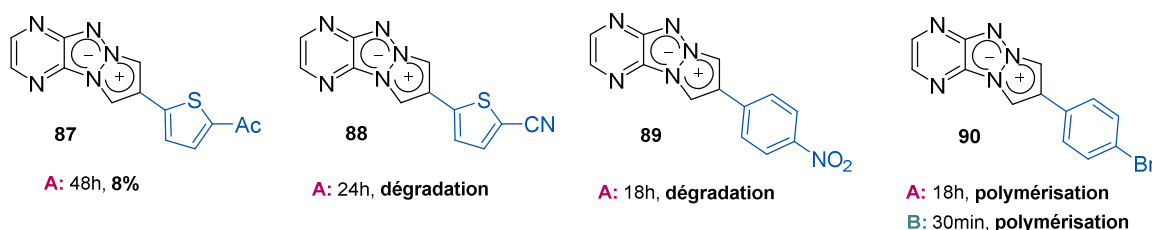
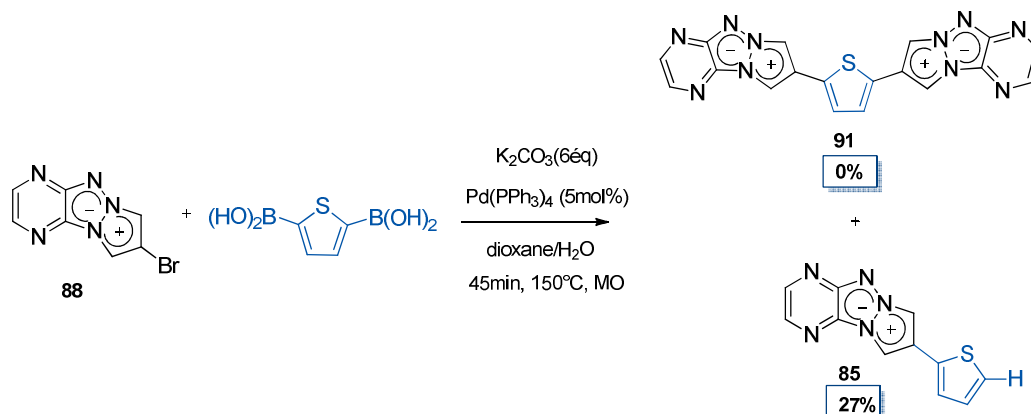


Figure 109 : Limitations du couplage de Suzuki.

Dans un premier temps, il a été difficile d'introduire des thiophènes fonctionnalisés par un groupement acétylé (**87**) ou cyano (**88**), car dans ces conditions l'acide boronique n'est pas stable. Un autre problème a été rencontré lors des tentatives de formation du 3-nitrophényl-PyTAP (**89**). Les divers essais réalisés montrent une consommation du dérivé bromé, conduisant à un dérivé insoluble qui n'a pu être analysé. Enfin, avec l'acide 4-bromophénylboronique, nous observons avec l'une ou l'autre des deux méthodes, la polymérisation du triazapentalène d'intérêt.

Une autre limitation concerne le couplage entre le 3-bromo-PyTAP (**88**) avec l'acide 2,5-thiophene diboronique commercial, qui a également échoué (*Schéma 49*).

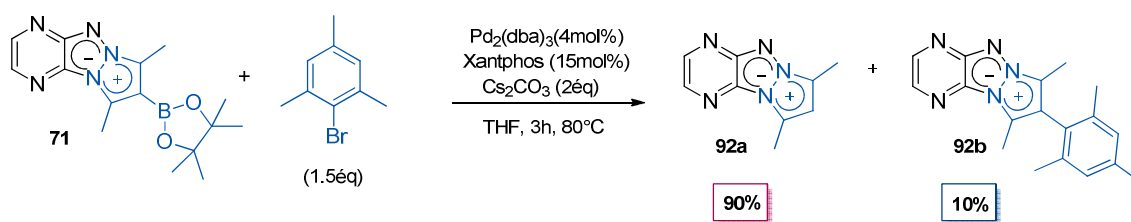


**Schéma 49** : Couplage et protodéborylation.

Le produit majoritaire isolé après purification correspond au composé (**85**), obtenu avec un rendement de 27%. Comme précédemment, ce résultat est dû à une instabilité du dérivé boronique, qui à haute température se protodéboryle.

- *La réactivité de triazapentalènes avec un ester boronique*

Un essai de couplage a été réalisé au départ de l'ester boronique porté par le pyrazinotriazapentalène (composé **71**), malgré différentes conditions opératoires testées nous avons essentiellement récupéré le produit de déborylation (**92a**). Seul le produit (**92b**) issu du couplage entre le dérivé (**71**) et le 2-bromomésitylène a pu être isolé avec 10% de rendement (*Schéma 50*).

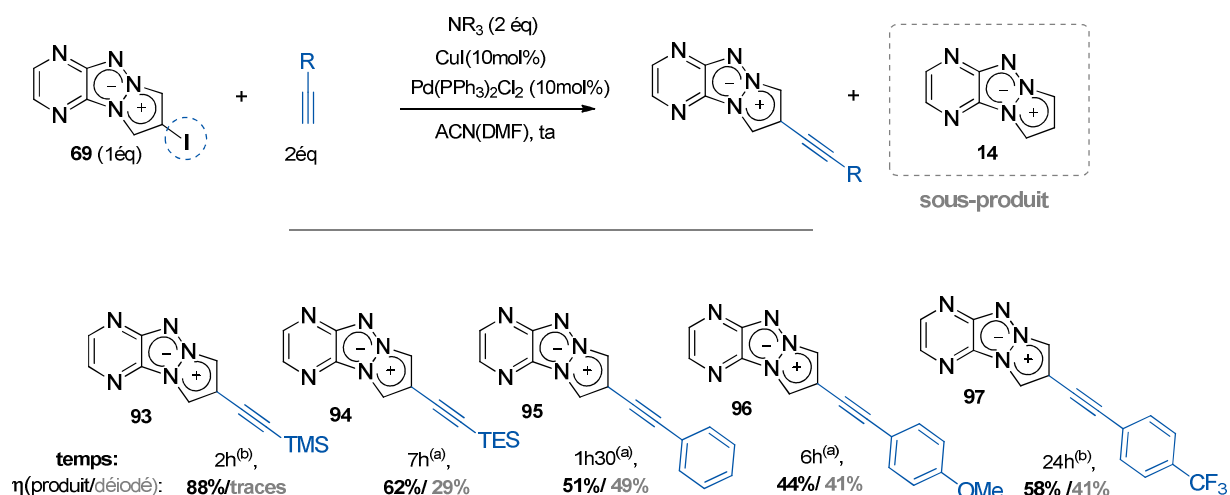


**Schéma 50** : Couplage de Suzuki-Miyaura à partir de l'ester boronique encombré (**71**).

En conclusion, nous avons montré que les pyrazinotriazapentalènes halogénés faisaient preuve d'une excellente stabilité et d'une réactivité intéressante dans les couplages de type Suzuki-Miyaura. A l'inverse les analogues tricycliques borés sont beaucoup plus sujet à la protodéborylation et sont donc des partenaires moins efficaces.

### 2.3. Couplage de Sonogashira

Dans un second temps, notre attention s'est tournée vers les couplages de type Sonogashira. Cette méthode pourrait nous permettre d'accéder à de nouvelles structures avec une conjugaison étendue grâce au système  $\pi$  de la triple liaison. La réaction a été effectuée à température ambiante, avec des temps de réactions allant de 1h30 à 24h. Nous avons aussi choisi d'utiliser des alcynes aromatiques et silylés dans le but d'obtenir des alcynes vrais. L'ensemble des produits obtenus est présenté dans le *Schéma 51*.



**Schéma 51** : Triazapentalènes couplés à des alcynes ; a) Et<sub>3</sub>N (2 éq), ACN/DMF (4/1). b) DIPEA (3 éq), ACN.

Une observation concernant l'ensemble de ces réactions porte sur la formation systématique de deux sous-produits, le diyne symétrique (couplage de Glaser) et le sous-produit déhalogéné (**14**). Alors que le premier sous-produit issu de la réaction d'homocouplage est présent en quantités négligeables, le deuxième est obtenu en quantité considérable. Ces résultats pourraient s'expliquer par la taille du substituant de l'acétylène qui semble se corrélérer avec la quantité de composé déiodé (**14**). Par conséquent les produits d'intérêt sont obtenus avec des rendements de 44% à 88%.

Notre prochaine étape est d'utiliser les dérivés silylés pour accéder aux triazapentalènes comportant un alcyne vrai. Ayant le choix entre deux groupements silylés (TMS et TES, composés **93** et **94**), nous avons choisi de déprotéger le groupement TMS, car ce produit peut être obtenu avec un meilleur rendement et la déprotection du triméthylsilyl est plus aisée du fait de sa labilité. Contrairement à nos attentes, le groupement silylé du composé (**93**) est très stable et n'impose pas de conditions de conservations particulières. Cette stabilité a été constatée lors du premier essai de déprotection en présence du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans l'éthanol. Alors que cette méthode permet de déprotéger les alcynes très rapidement,<sup>129</sup> ici la conversion est très lente et incomplète après 18h de réaction (*Schéma 52*). Pour accélérer la réaction, nous avons utilisé des conditions plus basiques avec une solution d'ammoniac 7N dans le méthanol, ce qui a permis d'obtenir une conversion totale après 45

<sup>129</sup> Wuts, P. G. M. & Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*. (John Wiley & Sons, Inc., 2006).

min de réaction, et d'isoler le composé (**98**) avec un excellent rendement de 88%. Notons au passage que le noyau PyTAP a très bien résisté dans ces conditions agressives.

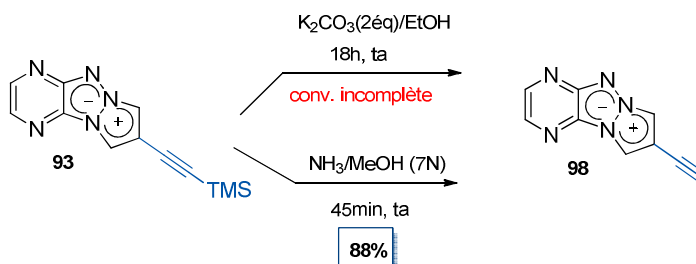


Schéma 52 : Obtention de l'alcyne vrai (**98**).

Pour tester la réactivité de cet alcyne nous avons réalisé le couplage de celui-ci avec l'iodure de phényle en employant des conditions mises au point précédemment (Schéma 53).

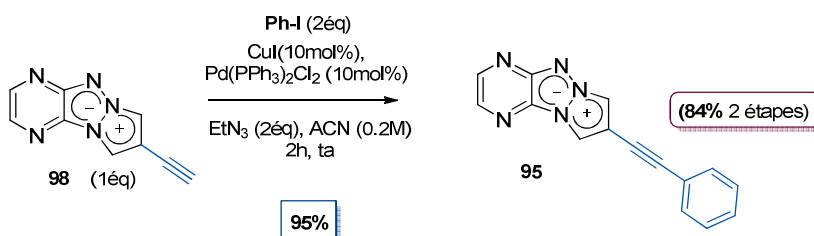


Schéma 53 : Fonctionnalisation de l'alcyne.

En utilisant l'alcyne (**98**) comme réactif limitant nous avons pu obtenir le produit issu du couplage de Sonogashira en seulement 2h à température ambiante avec un rendement de 95%.

Cet excellent résultat ouvre des portes vers d'autres voies de synthèse et d'autres produits. Ainsi, nous pouvons contourner les problèmes de déhalogénéation rencontrés précédemment, notamment lors des couplages de Sonogashira. Un des autres avantages est de pouvoir accéder aux triazapentalènes fonctionnalisés avec des acétylènes, plus accessibles que les analogues acétyléniques.

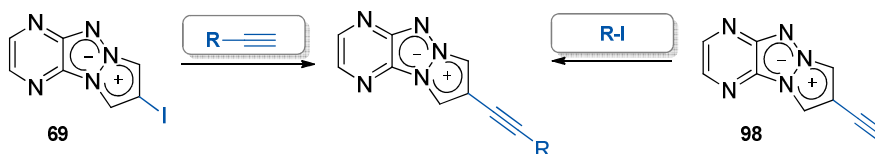
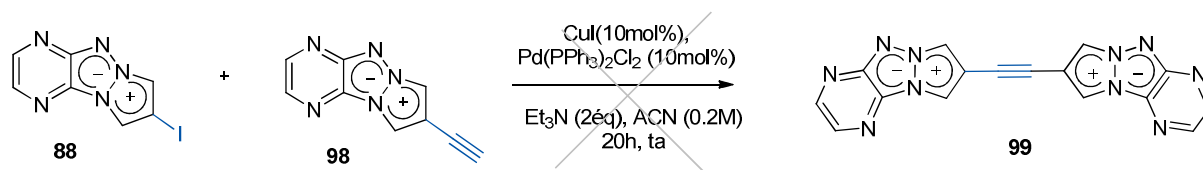


Schéma 54 : Méthodes pour l'obtention des éthynyl-PyTAPs.

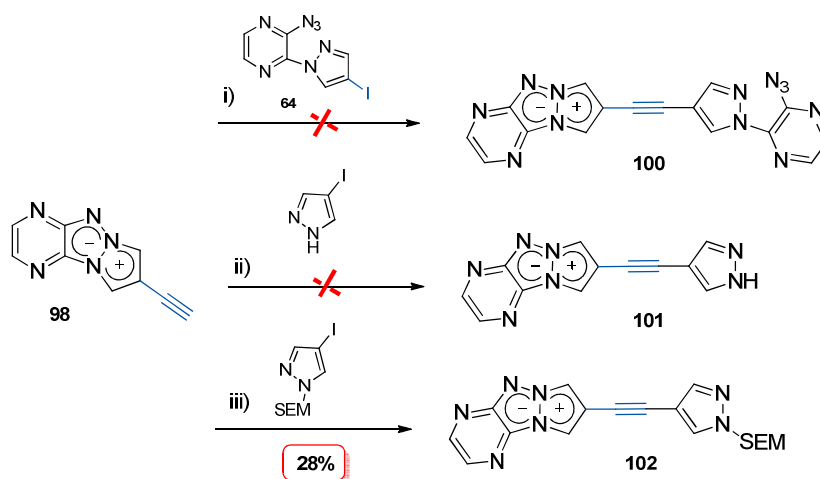


Nous nous sommes ensuite concentrés sur la synthèse d'un motif di-triazapentalénique séparé par une triple liaison (*Schéma 55*). Par conséquent, le couplage pallado-catalysé a été réalisé à partir du dérivé iodé du triazapentalène (**88**) et du fluorophores comportant l'alcyne (**115**).



**Schéma 55** : Couplage de Sonogashira avec deux motifs triazapentaléniques.

Les premières conditions essayées sont celles développées précédemment, à base de CuI et de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le suivi de la réaction montre la consommation de l'alcyne après 2 h de réaction, mais aucune trace de nouveau produit fluorescent n'est observé. De plus, le dérivé iodé reste intact. Plusieurs conditions testées ont mené aux mêmes observations. Après 20 h de réaction à température ambiante, aucune trace du produit souhaité n'est détectée. Ce résultat reste étonnant, car les deux substrats se sont montrés assez réactifs lors des réactions de couplage avec iodobenzène ou avec le motif phénylacétylène. Cette absence de réactivité n'a pas pu être expliquée à ce jour.



**Schéma 56** : Couplages de Sonogashira avec le composé (**98**).

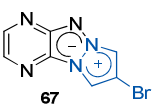
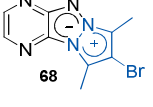
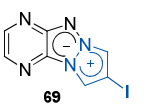
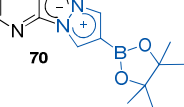
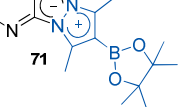



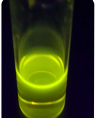
Cette incapacité à coupler directement les deux noyaux triazapentalènes nous a amené à tenter la liaison entre un triazapentalène et le bicycle azoturé (**64**), sans d'avantage de succès. Le couplage a également été un échec avec le pyrazole iodé. En revanche, une fois ce dernier protégé par un groupement SEM, le produit final (**102**) a été isolé avec un rendement modeste de 28%. Compte tenu de toutes ces difficultés, l'idée d'obtenir le produit d'homocouplage a finalement été abandonnée.

## 2.4. Analyses photophysiques des produits obtenus via les couplages

### a) Dérivés halogénés / boronates

Contre toutes attentes, il s'avère que les triazapentalènes tricycliques fonctionnalisés avec des halogènes et des esters boroniques présentent des propriétés de fluorescence apparentes. Pour cette raison, il nous a paru intéressant de réaliser leur caractérisation photophysique.

**Tableau 14.** Propriétés optiques des triazapentalènes halogénés/boronates

										
solvant	DMSO	DCM	DMSO	DCM	DMSO	DCM	DMSO	DCM	DMSO	DCM
$\lambda_{ex}(nm)$	416	412	424		419	413	422	420	432	431
$\lambda_{em}(nm)$	503	487	525		509	484	508	495	526	526
$\epsilon(M^{-1}.cm^{-1})$	15500	19300	11500		7520	16640	15900	9300	5730	13700
$\phi^{(a)}$	0,25	0,27	0,06		0,13	0,27	0,19	0,51	0,05	0,08
Brillance	3900	5300	650		940	4500	3000	4700	300	1100
Couleur <sup>(b)</sup>										

<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « *Coumarine 153* » avec  $\lambda_{ex}=\lambda_{ex}$  des produits, et  $\Phi=0,38$  dans l'EtOH; <sup>(b)</sup> les images sont réalisées avec les échantillons solubilisés dans le DCM et irradiés à 365nm.

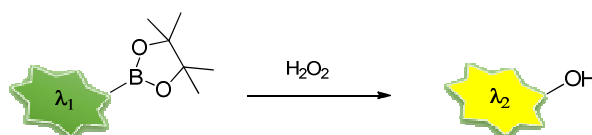
Dans le cas du dérivé bromé (**67**), la différence de polarité entre les deux solvants a peu d'impact sur la fluorescence, car les rendements quantiques sont du même ordre de grandeur. Une légère différence est constatée au niveau du coefficient d'extinction molaire (plus grand dans le DCM) et des longueurs d'onde d'émission avec un effet hypsochrome dans le DCM, ce qui confirme le caractère solvatochromique des PyTAPs. Il est en revanche curieux de constater que son analogue diméthylé (**68**) connaît une perte de fluorescence avec une baisse du rendement quantique à 6%.

Contrairement au composé (**67**), le rendement quantique de son analogue iodé (**69**) diffère en fonction du solvant et diminue d'un facteur 2 lorsque l'analyse est réalisée dans le DMSO.

Pour le dérivé du bore (**70**), on note également un effet solvatochromique et une variation de la valeur du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique en fonction du solvant. Comme précédemment il s'avère que les deux méthyles en C<sup>2</sup> et C<sup>4</sup> induisent une perte de fluorescence (8% vs 51% dans le DCM).

En résumé, excepté les deux composés tri-substitués (**68** et **71**), les PyTAPs comportant un seul substituant en C<sup>3</sup> montrent des propriétés de fluorescence très intéressantes. Dans le DMSO, les dérivés monosubstitués ont un meilleur rendement quantique que celui du PyTAP non-fonctionnalisé de référence (**14**). Les dérivés halogénés ont un impact positif notable quel que soit l'environnement (DCM ou DMSO). En revanche, l'ester boronique (**70**) présente de meilleures propriétés uniquement dans un solvant moins polaire.

Les deux esters boroniques présentent un intérêt particulier car ils peuvent être utilisés comme des sondes pour la détection des espèces réactives d'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) responsables d'un grand nombre de pathologies comme le cancer ou Alzheimer.<sup>130</sup> Les esters boroniques sont des fonctions très sensibles et facilement oxydables en présence de peroxyde d'oxygène avec pour conséquence une modification des propriétés spectroscopiques du fluorophore qui les porte (Figure 110).



**Figure 110** : Utilisation des esters boroniques pour la détection des réactifs oxygénés.

L'étude du potentiel des triazapentalènes dans la détection de ces espèces réactives est envisagée au laboratoire.

<sup>130</sup> (a) Chang, M. C. Y., Pralle, A., Isacoff, E. Y. & Chang, C. J. A selective, cell-permeable optical probe for hydrogen peroxide in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15392–15393 (2004) ; (b) Chan, J., Dodani, S. C. & Chang, C. J. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging. *Nat. Chem.* **4**, 973–84 (2012).

## b) Aryl-PyTAPs : effet électrodonneur et électroattracteur

## - Effet électrodonneur

Les premiers composés analysés sont les fluorophores fonctionnalisés en C<sup>3</sup> avec des noyaux aromatiques non substitués et avec des phényles comportant des groupements électrodonneurs (Tableau 15).

Tableau 15 : Propriétés optiques des composés issus des couplages de Suzuki-Miyaura.

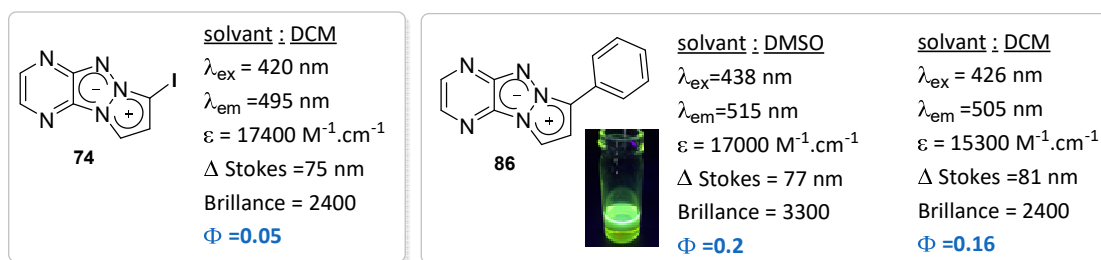
solvant	DCM	DCM	DCM	DCM	DCM	DCM
$\lambda_{ex}(nm)$	415	418	417	417	420	404
$\lambda_{em}(nm)$	494	500	498	497	512	515
$\epsilon(M^{-1}.cm^{-1})$	13000	14000	18200	16500	14000	16200
$\Delta Stokes (nm)$	79	82	81	80	92	111
$\phi^{(a)}$	0,42	0,45	0,29	0,29	0,16	0,04
Brillance	5500	6200	5300	4800	2200	650
Couleur <sup>(b)</sup>						

<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « *Coumarine 153* » avec  $\lambda_{ex}=\lambda_{ex} \text{ des produits}$ , et  $\Phi=0,38$  dans l'EtOH; <sup>(b)</sup> les images sont réalisées avec les échantillons solubilisés dans le DCM et irradiés à 365nm.

Les données spectroscopiques issues du composé (**75**) (3-phényl-PyTAP) montre une légère amélioration de propriétés photophysiques comparées au composé de référence (**14**). Ainsi, cet analogue se démarque par un meilleur rendement quantique, mais aussi par une brillance plus importante. Hormis cet exemple, les rendements quantiques des autres composés sont inférieurs à celui de la référence, tout comme leurs brillances. Les résultats montrent également une légère augmentation des longueurs d'onde d'émission, mais aucun effet auxochrome n'est constaté.

En revanche, la fonctionnalisation avec des phényles riches en électrons permet d'améliorer d'une part les valeurs des coefficients d'extinctions molaires et d'autre part les valeurs des déplacements de Stokes. Le dérivé comportant une amine diméthylée sur la position *para* est celui qui présente la plus grande valeur de déplacement de Stokes, mais qui malheureusement, est peu fluorescente.

Un résultat semblable est obtenu lorsque le PyTAP est fonctionnalisé en C<sup>2</sup> avec un halogène (**74**) ou un phényle (**86**) (Figure 111).



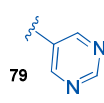
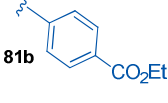
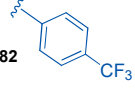
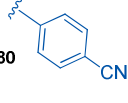
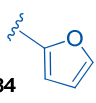
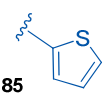






**Figure 111** : Propriétés photophysiques du 2-iodo- et 2-phényl-PyTAP.

Les deux composés sont fluorescents, mais des meilleurs résultats sont obtenus lorsque le triazapentalène comporte un phényle. Comparé avec l'analogue 3-phényl-PyTAP (**75**), le composé (**86**) est caractérisé par un rendement quantique plus bas, mais avec une longueur d'onde d'émission plus importante avec une émission dans le jaune.

- *Groupe électroattracteurs et les hétérocycles*

La fonctionnalisation du noyau tricyclique PyTAP avec des aryles comportant des groupements électroattracteurs se révèle bénéfique, car l'ensemble de produits présentés dans le tableau ci-dessous manifestent un fort caractère fluorescent.

**Tableau 16** : Propriétés optiques des composés issus des couplages de Suzuki-Miyaura

						
<b>79</b>	<b>81b</b>	<b>82</b>	<b>80</b>	<b>84</b>	<b>85</b>	
<b>solvant</b>	DCM	DCM	DCM	DMSO	DCM	DCM
$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	418	419	418	425	415	417
$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	477	485	487	506	495	494
$\epsilon(\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	11500	14200	14700	4300	16500	15000
$\Delta \text{ Stokes (nm)}$	59	66	69	81	80	77
$\phi^{(a)}$	0,51	0,48	0,52	0,26	0,34	0,38
Brillance	5800	6800	7700	1100	5600	5700
Couleur <sup>(b)</sup>						

<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « *Coumarine 153* » avec  $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{ex}}$  des produits, et  $\Phi = 0,38$  dans l'EtOH; <sup>(b)</sup> les images sont réalisées avec les échantillons solubilisés dans le DCM et irradiés à 365nm.

Comme précédemment l'ensemble des analyses a été réalisé dans le dichlorométhane à l'exception du composé (**80**) très polaire, qui a par conséquent été analysé dans le DMSO.

Une première observation est le faible impact de ces modifications sur les longueurs d'onde d'absorption et d'émission, qui restent très similaires avec celles du tricycle non fonctionnalisé PyTAP

(14). Néanmoins, une amélioration non négligeable apparaît au niveau des rendements quantiques des composés comportant un cycle déficient en électrons en position para. C'est notamment le cas de l'analogue pyrimidinique (79), des aryles portant un ester (81b) et un trifluorométhyle (82). Les trois fluorophores cités ont des rendements quantiques de l'ordre de 50% et des brillances élevées, le dérivé le plus performant portant le motif trifluorométhane en *para* du phényle (82).

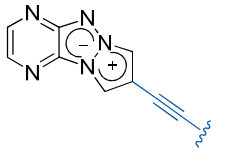
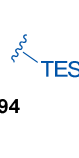
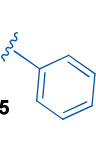
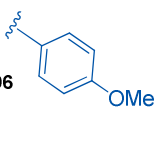
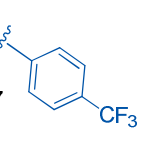



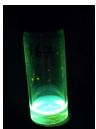

Le dernier résultat concerne l'effet des hétérocycles à 5 chaînons de type thiophène ou furane qui de part leur richesse en électrons cause une légère baisse du rendement quantique. En revanche, ces fluorophores respectifs (84 et 85) se distinguent avec des coefficients d'extinction molaires le plus élevé.

*c) Ethynyl-PyTAPs : effet électrodonneur et électroattracteur*

Globalement, la fonction alcyne fonctionnalisée ou non a un effet bénéfique sur les propriétés de fluorescence. Comme précédemment, les longueurs d'onde d'absorption et d'émission restent inchangées, mais en revanche, les valeurs des rendements quantiques se situent dans tous les cas au-dessus de 50%.

De plus, l'ensemble de ces produits présente de bien meilleurs coefficients d'extinction molaire et donc de bien meilleures brillances par rapport au produit de référence (14).

**Tableau 17 : Propriétés optiques des composés issus de couplages de Sonogashira**

					
	98	94	95	96	97
solvant	DCM	DCM	DCM	DCM	DCM
$\lambda_{ex}(nm)$	415	417	417	416	417
$\lambda_{em}(nm)$	481	483	485	485	479
$\epsilon(M^{-1}.cm^{-1})$	17700	16600	16800	16000	15000
$\Delta$ Stokes (nm)	66	66	68	69	62
$\phi^{(a)}$	0,53	0,52	0,58	0,51	0,58
Brillance	9300	8600	9700	8200	8600
Couleur <sup>(b)</sup>					

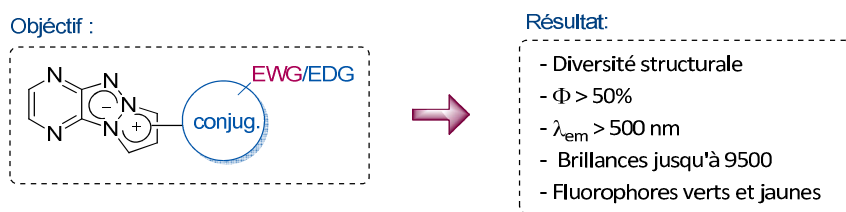
<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « Coumarine 153 » avec  $\lambda_{ex} = \lambda_{ex}$  des produits, et  $\Phi = 0.38$  dans l'EtOH; <sup>(b)</sup> Les images sont réalisées avec les échantillons solubilisés dans le DCM et irradiés à 365nm.

Il est par ailleurs intéressant de comparer le composé (83) (3-styryl-PyTAP) et le composé (95) où le phényle est séparé par une triple liaison. L'importance induite par la présence de l'alcyne

est soulignée par une brillance et un rendement quantique deux fois plus important du composé (95). Cependant, en comparant les propriétés du composé présentant un alcyne vrai (98) à celles ayant des alcynes fonctionnalisés, il apparaît que l'ajout d'un groupement silylé ou d'un phényle n'a pas un impact important sur les propriétés de fluorescence. Il en est de même quant à la présence d'un groupement donneur (composé 96) ou attracteur (composé 97) sur le phényle car caractère fluorescent des composés ne change quasiment pas.

### Conclusion

L'objectif de cette partie était de synthétiser d'analogues du PyTAP en introduisant un nouveau système conjugué, pour obtenir une diversité moléculaire élargie, mais aussi pour obtenir de meilleurs fluorophores. Pour ce faire, nous avons tout d'abord synthétisé des triazapentalènes fonctionnalisés avec des halogènes ou des esters boroniques qui ont ensuite été engagés dans des réactions de couplage de type Suzuki-Miyaura ou Sonogashira. Ainsi nous avons eu accès à divers triazapentalènes conjugués à des systèmes aromatiques enrichis ou déficients d'électrons (*Figure 112*).



**Figure 112 :** Propriétés générales des PyTAPs conjugués.

Les résultats photophysiques montrent que non seulement les produits de couplages sont fluorescents, leurs précurseurs halogénés et les boronates présentent également des propriétés photophysiques intéressantes avec des rendements quantiques de 13% à 51%.

Toutefois les meilleurs résultats photophysiques sont obtenus avec les noyaux tricycliques du PyTAP liés à un noyau aromatique ou à un alcyne. Dans le cas des aryl-PyTAPs, les propriétés spectroscopiques sont fonction de la nature des aryles greffés sur la position C<sup>3</sup> du PyTAP, avec des rendements quantiques qui varient de 16 à 52%. Des résultats plus linéaires avec des meilleures brillances et de rendements quantiques variant entre 51 et 58 % sont obtenus pour les dérivés avec des motifs alcynes. Ainsi, à travers cette partie nous avons montré que la fonctionnalisation du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène avec une extension de la conjugaison est bénéfique pour les propriétés de fluorescence.



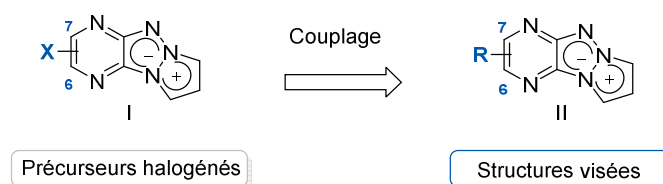


## Chapitre 4: Fonctionnalisation du PyTAP en C<sup>6</sup> et C<sup>7</sup>

Après avoir étudié les effets des diverses fonctionnalisations du noyau azolique du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation du noyau pyrazinique.

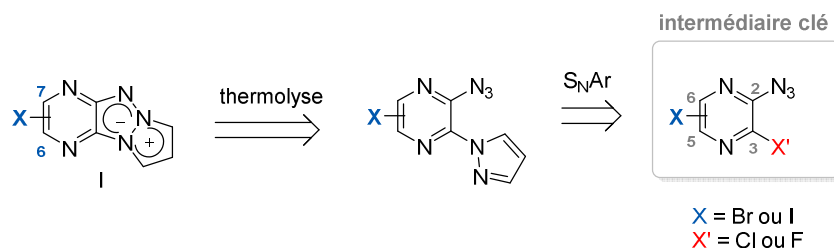
### 1. Structures visées

La stratégie retenue vise à obtenir des pyrazinotriazapentalènes substitués par divers groupements sur les positions C<sup>6</sup> ou C<sup>7</sup> (structure II) à partir de précurseurs halogénés (structure I) *via* des réactions de couplage (Figure 113).



**Figure 113** : Stratégie générale pour fonctionnaliser les positions C<sup>6</sup> et C<sup>7</sup> du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène.

L'objectif initial est donc de synthétiser les pyrazino-1,3a,6a-triazapentalènes halogénés sur les positions C<sup>6</sup> et C<sup>7</sup> (structure I). Comme précédemment la voie rétrosynthétique fait intervenir une étape de thermolyse après une étape de S<sub>N</sub>Ar (Schéma 57).



**Schéma 57** : Voie rétrosynthétique générale pour la synthèse des structures de type (I).

Le nouveau défi associé à cette voie rétrosynthétique est d'accéder aux pyrazines trifonctionnalisées, notre intermédiaire clé, avec un azoture ou son précurseur en C<sup>2</sup>, un chlore ou un fluor en C<sup>3</sup> qui sont plus propices à la S<sub>N</sub>Ar, et un brome ou un iode C<sup>5</sup>/C<sup>6</sup> plus efficaces dans les réactions de couplage.

#### 1.1. Etat de l'art : halogénéation des pyrazines

Lors de l'étude bibliographique, nous nous sommes principalement concentrés sur des méthodes d'halogénéation d'halopyrazines. Ces recherches se sont avérées peu fructueuses, car seul

les bromations/chlorations des pyrazines en *para* de fonctions amines sont décrites.<sup>131</sup> Comme le dérivé (**103'**) est commercialement disponible, nos premiers essais ont été réalisés sur ce composé, mais l'obtention de la forme azoture (**104**) n'a pas pu être réalisée (Schéma 58).

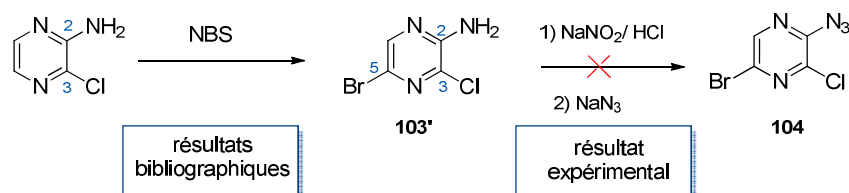


Schéma 58 : Obtention d'une pyrazine dihalogénée *via* la diazotisation de l'amine.

Un brevet a toutefois attiré notre attention, car il propose une méthode alternative consistant à réaliser la bromation d'une pyrazine comportant une hydrazine protégée par un trifluoroacétate (Schéma 59).<sup>132</sup> La bromation sélective de la position C<sup>5</sup> de la pyrazine est réalisée avec l'utilisation du *N*-bromosuccinimide, puis une déprotection du groupement trifluoroacétate permet de générer l'hydrazine hétérocyclique (**c**).

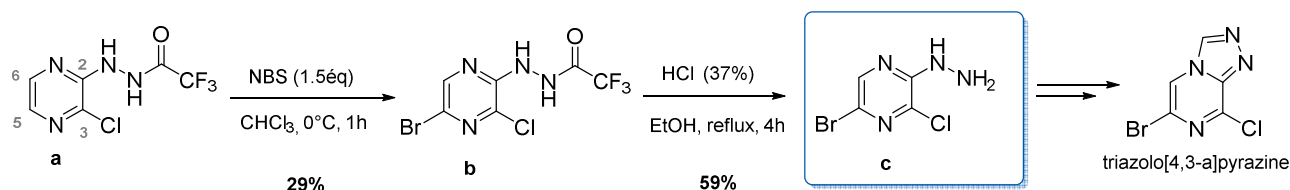


Schéma 59 : Synthèse de la 5-bromo-3-chloro-2-hydrazinylpyrazine (**c**) par la méthode de Borchard *et coll.*

Dans notre cas, l'intermédiaire (**c**) offre deux stratégies pour la synthèse des produits souhaités : (**107**) et (**110**) (Schéma 60). La première voie de synthèse (voie a) utilise l'hydrazine comme précurseur de l'azoture par une réaction de diazotisation, la séquence réactionnelle se poursuit par une substitution sélective du chlore par le pyrazole et enfin par l'étape de thermolyse.

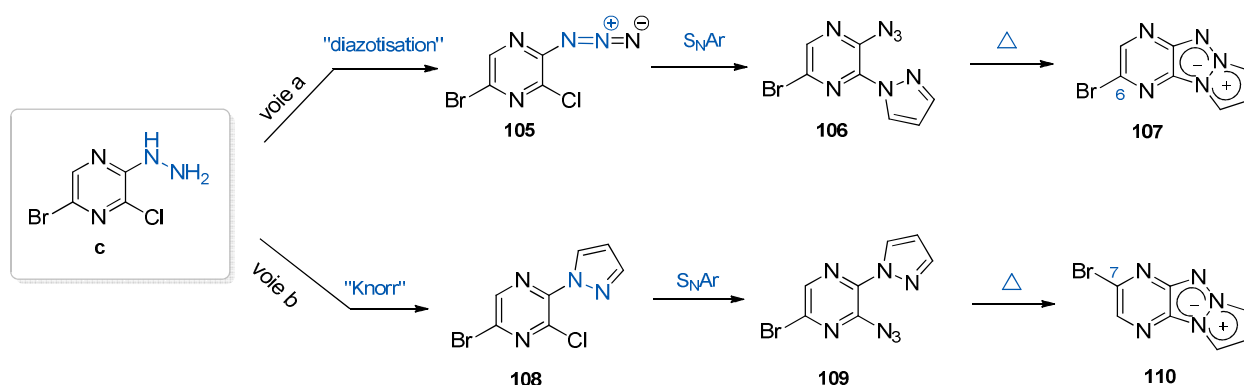


Schéma 60 : Deux stratégies de synthèse pour accéder aux composés (**107**) et (**110**).

<sup>131</sup> Caldwell, J. J., Veillard, N. & Collins, I., Design and synthesis of 2(1H)-pyrazinones as inhibitors of protein kinases, *Tetrahedron*, **68**, 47, 9713-9728, (2012)

<sup>132</sup> Borchardt, A.; Davis R., Noble S., Aheterocyclic inhibitors of histamine receptors for the treatment of diseases. (2011) WO2011112766

Dans la deuxième voie de synthèse (voie b), l'hydrazine serait impliquée dans une réaction de Knorr permettant de former directement le noyau pyrazole. Ce changement nous permettra d'accéder à la structure (**109**), qui après thermolyse conduit au 7-bromo-PyTAP (**110**).

## 2. Résultats et Discussions

### 2.1. Synthèse du 6-bromo-PyTAP (**107**)

Par manque de temps nous nous sommes concentrés essentiellement sur la synthèse du composé (**107**), la voie menant au composé (**110**) est actuellement en cours de développement.

#### a) Synthèse du 5-bromo-3-chloro-2-hydrazinylpyrazine (**113**)

La séquence décrite dans le brevet commence par la protection de la pyrazinohydrazine (**17**). Pour cela un léger excès d'anhydride trifluoroacétique (TFAA) est utilisé pour obtenir après seulement 2 h de réaction le composé (**111**) avec un rendement de 89%. Si cette première étape est facile et réalisable à grande échelle, l'étape suivante de bromation décrite en présence de NBS pendant 1 h à 0°C n'atteint jamais une conversion complète et ce même après 24h de réaction à température ambiante (Schéma 61).

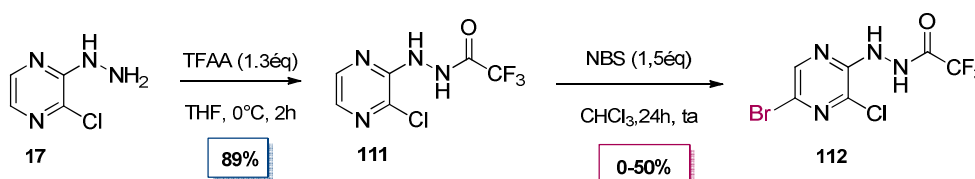


Schéma 61 : Synthèse de l'intermédiaire(**112**).

De plus, cette réaction est non reproductible, les rendements isolés varient entre 0 et 50%, les moins bons rendements étant obtenus à plus grande échelle (>300 mg). Une longue étude ayant pour but d'optimiser cette réaction a été menée en modulant le temps de réaction, la température, le nombre d'équivalent de NBS, le solvant ainsi que de la nature de l'agent de bromation sans succès.

Ayant quelques doutes sur la stabilité du groupement trifluoroacétate, la réaction de bromation a été engagée sur le substrat déprotégé (**17**). Les différents essais de bromation sur la pyrazine (**17**) n'ont malheureusement pas abouti (Schéma 62), le composé (**113**) n'a jamais été observé.

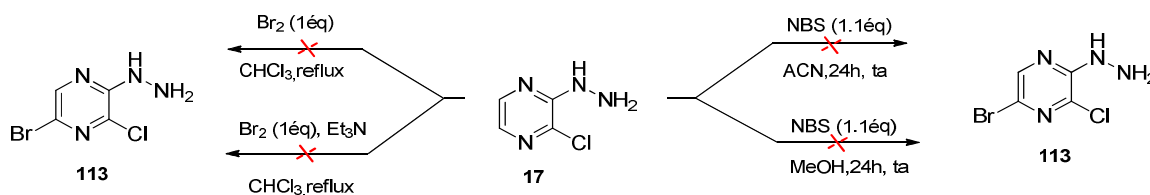
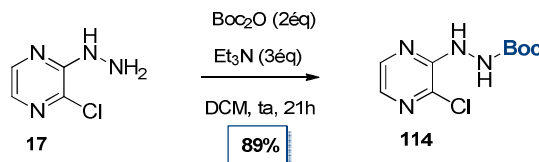


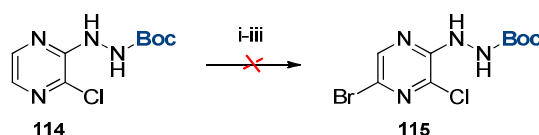
Schéma 62 : Essais de bromation du composé (**17**).

Il a donc été choisi de remplacer le trifluoroacétate par un autre groupement protecteur. Nous avons choisi le groupement Boc, facile d'accès et plus stable. La protection de l'hydrazine est réalisée dans des conditions classiques, en présence de dicarbonate de di-*tert*-butyle et de triéthylamine (*Schéma 63*).<sup>133</sup>



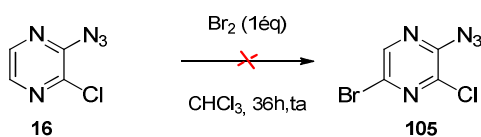
**Schéma 63** : Protection de l'hydrazine avec le Boc.

Une fois l'intermédiaire (**114**) isolé, il est engagé dans l'étape de bromation. Malheureusement les diverses tentatives d'halogénéation ont également échoué, malgré une modulation du solvant et de l'agent de bromation (*Schéma 64*).



**Schéma 64** : Essais d'halogénéation : (i) NBS (1,5 éq), ACN, 24h, ta. (ii) Br<sub>2</sub> (1.5 éq), ACN, ta, 24h. (iii) Br<sub>2</sub> (1.5 éq), CHCl<sub>3</sub>, 24h, ta.

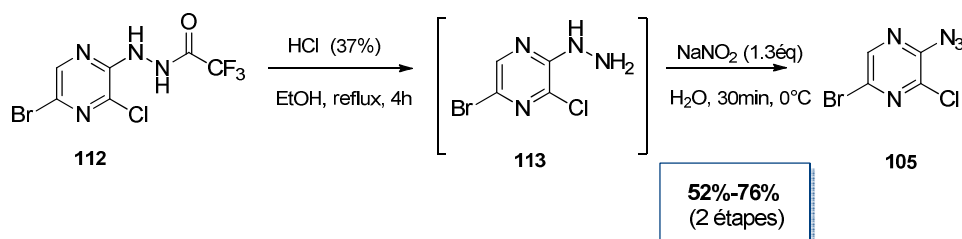
Ces tentatives n'ont mené qu'à la dégradation partielle du produit de départ ainsi qu'à la formation d'impuretés, la pyrazine de départ restant toutefois le produit majoritaire. Enfin, une ultime tentative de bromation a été réalisée sur l'hétérocycle azoturé (**16**) (*Schéma 65*). Cependant, comme précédemment, seul le produit de départ a été isolé.



**Schéma 65** : Bromation de la 2-azido-3-chloropyrazine (**16**).

Face à ces échecs, nous nous sommes contentés des résultats obtenus avec le groupement trifluoroacétate pour poursuivre la voie de synthèse. Ainsi, la déprotection de l'hydrazine a été réalisée en suivant les conditions décrites par Borchardt *et coll.* Après 4h au reflux de l'éthanol en présence d'HCl concentré, la déprotection est complète.

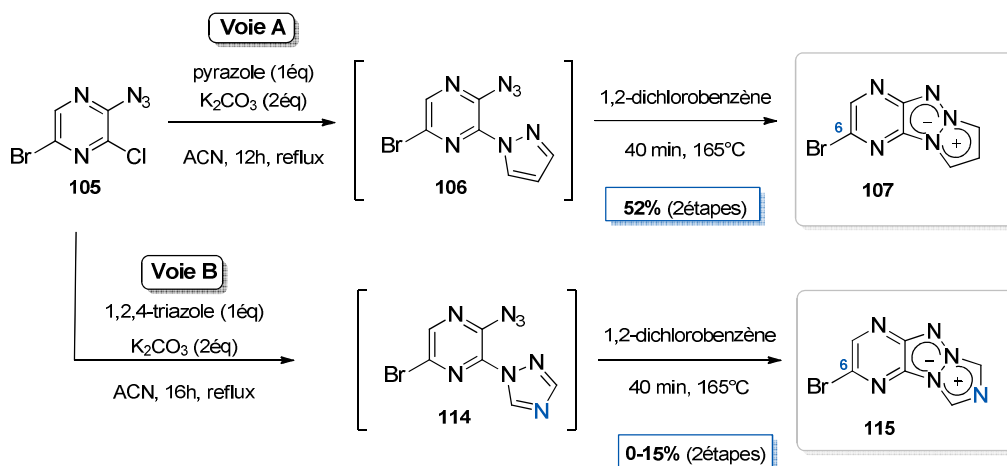
<sup>133</sup> Baloglu, E., Shechter, S., Shacham, S., Mccauley, D., Senapedis, W., Golan, G. & Kalid, O., Substituted 2,3-dihydro-benzofuranyl compounds and uses thereof. (2010) WO2014085607 (A1).

Schéma 66 : Synthèse « one-pot » du composé (**105**).

Comme cette étape est réalisée en milieu acide (condition obligatoire pour réaliser l'azotation) nous avons choisi de réaliser l'azoturation sans purification intermédiaire (Schéma 66). Ainsi, une fois le milieu refroidi à 0°C, une solution aqueuse de nitrite de sodium a été ajoutée. Après 30min d'agitation à froid, le composé (**105**) est isolé avec un rendement variant entre 52% et 76% sur les deux étapes.

#### b) Synthèse du 6-bromo-PyTAP

L'azoture trifonctionnalisé (**105**) est engagé dans l'étape de substitution nucléophile. A ce stade, nous avons utilisé deux azoles différents : le pyrazole afin d'obtenir le composé (**107**), et le 1,2,4-triazole pour obtenir l'analogue azoté (**115**).

Schéma 67 : Synthèses de 6-bromo-PyTAP (**107**) et (**115**).

Dans les deux exemples, le principe de l'approche « one-pot » a été appliqué. Ainsi, dans le premier cas, la substitution sélective du chlore donne accès à l'azoture intermédiaire (**106**) dont l'obtention est confirmée en masse et en RMN du proton. Il est ensuite engagé directement dans l'étape de thermolyse pour conduire au 6-bromo-PyTAP (**107**) avec un rendement satisfaisant de 52% (Schéma 67, voie A).

Dans le cas du 1,2,4-triazole, le composé intermédiaire est bien formé (confirmation en masse et en RMN proton) cependant après l'étape de thermolyse, le produit fluorescent n'est isolé

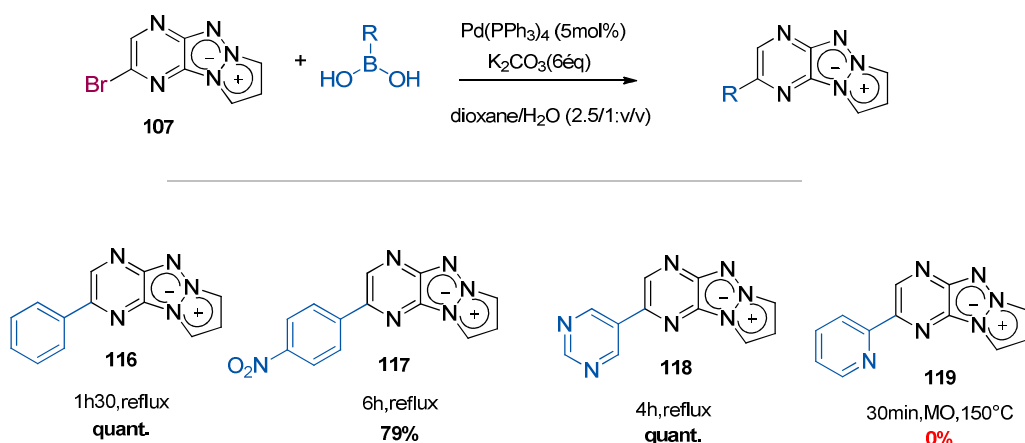
qu'avec des faibles rendements compris entre 0 et 15% (*Schéma 67*, voie B). Il s'avère que l'étape de  $S_NAr$  engendre la formation de nombreuses impuretés. Cependant par manque de temps nous n'avons pas pu optimiser cette deuxième synthèse.

## 2.2. Réactions de couplages à partir du 6-bromo-PyTAP

Le but de cette partie est d'évaluer la réactivité du composé bromé (**107**) vis-à-vis de divers couplages et d'étudier l'impact de quelques groupements aromatiques déficients ou riches en électrons en C<sup>6</sup> du noyau PyTAP sur les propriétés spectrales.

### a) Couplage de Suzuki-Miyaura

Pour réaliser les couplages de type Suzuki-Miyaura, nous avons repris la méthode développée précédemment qui utilise du palladium tétrakis triphénylphosphine comme catalyseur dans un mélange dioxane/eau. Quelques acides boroniques aromatiques ont été sélectionnés et engagés dans la réaction du couplage avec le dérivé (**107**), aboutissant à la formation des produits escomptés et représentés dans le *Schéma 68*.



**Schéma 68** : Couplage de Suzuki-Miyaura avec le composé (**107**).

Dans l'ensemble des cas, nous obtenons d'excellents rendements (de 79% à 100%) avec des temps de chauffage relativement courts. Seules les tentatives d'obtention du 6-pyridinyl-PyTAP (**119**) ont fait apparaître essentiellement des produits de dégradation. Pour remédier à ce problème, un essai dans les conditions de Cashman a été entrepris.<sup>134</sup> C'est une méthode plus douce utilisée pour coupler l'acide 2-pyridinylboronique avec de hétérocycles halogénés (*Schéma 69*).

<sup>134</sup> Cashman, J. Synthetic compounds and derivatives as modulators of smoking or nicotine ingestion and lung cancer, (2005) WO2005066162 (A1).

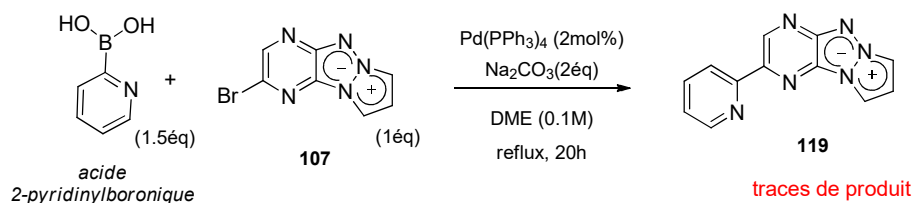


Schéma 69 : Couplage de Suzuki-Miyaura selon les conditions de Cashman.

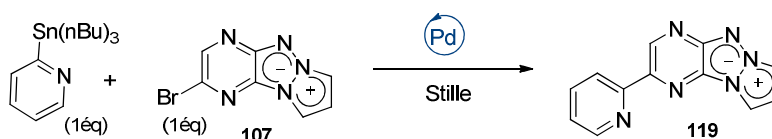
Dans ce cas, la consommation partielle du composé (**107**) est également constatée, mais conduit essentiellement à la formation du composé débromé. Ainsi, après 20h au reflux du diméthoxyéthane, le milieu réactionnel ne contient que des traces du produit souhaité (confirmation en masse), le reste étant du produit de départ et de la dégradation.

Ces résultats pourraient être dus à la facile protodéborylation observée de l'acide 2-pyrimidinylboronique. Nous nous sommes donc tournés vers le couplage de Stille, alternative très exploitée dans la littérature pour coupler des groupements de type 2-pyridinyl à un hétérocycle halogéné.

#### b) Couplage de Stille

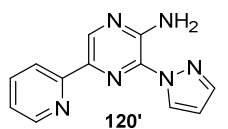
S'appuyant sur les méthodes décrites dans la littérature pour le couplage de substrats hétérocycliques halogénés avec le tributyl(2-pyridyl)stannane, deux conditions ont été testées. La première utilise le  $\text{Pd(PPh}_3)_4$  avec charge catalytique de 10mol% dans le toluène (*entrée 1, Tableau 18*).<sup>135</sup> Après 48h de réaction, la conversion n'est pas totale. La formation du produit (**119**) est visuellement constatée par chromatographie sur couche mince par une tache orange fluorescente plus polaire mais également avec une série de sous-produits, dont un produit bleu fluorescent identifié comme le produit de réduction (**120'**).

Tableau 18 : Couplage de Stille avec le tributyl(2-pyridyl)stannane.



Entrée	Solvant	Cat.	T(C°)	Temps	Conversion	$\eta$
1	toluène	$\text{Pd(PPh}_3)_4$ (10mol%)	reflux	48h	partielle	57%
2	toluène	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (10mol%)	reflux	30h	totale	87%
3	DMF	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (10mol%)	110°C	2h	totale	31%

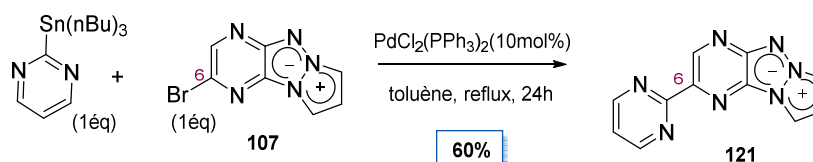
<sup>135</sup> Wang, B., Zhang, Y., Chen, J., Zhang, W., Song, J., Ughetta, B., Brown, L. & Miller, G., Cytoprotective compounds, pharmaceutical and cosmetic formulations and methods, (2003) WO2003009807 (A2).



produit de réduction

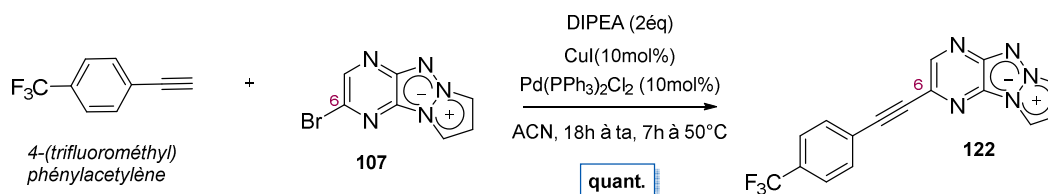
Le changement du catalyseur par le chlorure de bis(triphénylphosphine)palladium ( $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ) permet dans les mêmes conditions réactionnelles à aboutir au produit final avec un excellent rendement de 87%. En remplaçant le toluène par le DMF (*entrée 3*), le temps de la réaction est réduit considérablement. Malheureusement, le produit réduit (**120'**) est formé à une hauteur de 30% et limite donc la formation du produit souhaité, isolé avec un faible rendement de 31%.

Finalement, la catalyse au  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  au reflux du toluène est ici la méthode privilégiée pour réaliser les couplages de Stille sur des triazapentalènes. Cette méthode a été appliquée sur l'analogue pyrimidinique stannylé pour former le composé souhaité (**121**) (*Schéma 70*). Après 24h de reflux, la conversion est quasi-complète et le produit est isolé avec un rendement satisfaisant de 60%.

**Schéma 70** : Couplage de Stille avec le tributyl(2-pyridinyl)stannane.

### c) Couplage de Sonogashira

Dans le cas du couplage de Sonogashira, la méthode développée dans le chapitre précédent a été appliquée au 4-(trifluorométhyl)phénylacétylène avec le dérivé halogéné (**107**) (*Schéma 71*).

**Schéma 71** : Couplage de Sonogashira en C<sup>6</sup> du PyTAP.

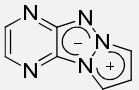

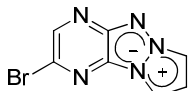
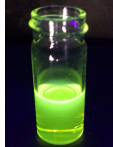
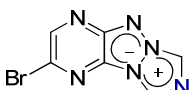

Après 18h de réaction à température ambiante, seul 41% du dérivé bromé a été converti (suivi RMN). Un chauffage à 50°C a permis d'accélérer considérablement la cinétique de la réaction et de consommer la totalité de l'hétérocycle halogéné après 7 h de réaction. De plus, contrairement aux couplages de Sonogashira en position C<sup>3</sup> du PyTAP, ici aucune trace de produit débromé n'est observé, le produit d'intérêt étant isolé avec un rendement quantitatif. La méthode est validée et pourra être exploitée au sein du laboratoire.



### 2.3. Analyses photophysiques : effet des groupements en C6 du PyTAP

L'analyse photophysique des dérivés tricycliques bromés est réalisée dans un premier temps. La présence du brome dans le composé (**107**) réduit considérablement son caractère fluorescent avec une chute drastique du rendement quantique de 15 à 2% (calculé dans le DMSO). A l'inverse, le dérivé halogéné (**117**) comportant un azote supplémentaire sur le noyau azolique, connaît une hausse importante du rendement quantique dans le DMSO tout comme dans le DCM. Avec un rendement quantique remarquable (de 64% dans le DCM) et une très bonne brillance, ce composé est très prometteur, et il sera intéressant d'exploiter ce potentiel par diverses modulations structurales ultérieures.

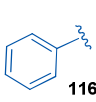
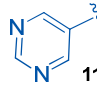
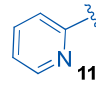
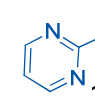

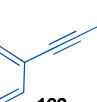




**Tableau 19** : Effet de l'halogène en C<sup>6</sup> du PyTAP.

	solvant	$\lambda_{\text{ex}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	$\Delta$ Stokes (nm)	$\Phi^{(a)}$	Brillance	Couleur <sup>(b)</sup>
 <b>14</b> (PyTAP)	DMSO	418	516	15500	98	0,15	2300	
 <b>107</b>	DMSO	437	527	11200	90	0,02	220	
 <b>110</b>	DMSO	433	523	17400	90	0,25	4300	
	DCM	428	493	10500	65	0,64	6700	

<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « *Coumarine 153* » avec  $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{ex}}$  des produits, et  $\Phi = 0,38$  dans l'EtOH; <sup>(b)</sup> les images sont réalisées avec les échantillons solubilisés dans le DCM et irradiés à 365nm.

Les composés issus des réactions de couplage, hormis le composé (**117**) comportant le nitrophényle en C<sup>6</sup>, montrent des propriétés spectroscopiques très positives. Dans le dichlorométhane, les composés présentent des rendements quantiques allant jusqu'à 58%, avec des coefficients d'extinction molaire élevés (jusqu'à 26200 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) et des déplacements de Stokes corrects (de 52 à 60 nm : cette valeur est majorée dans les solvants plus polaires comme le DMSO).

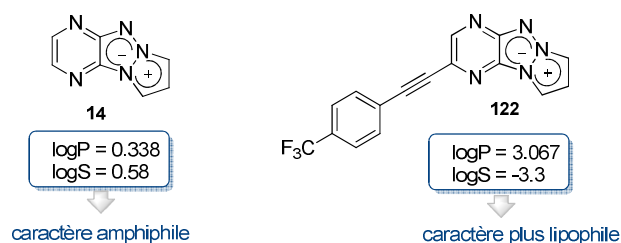
Tableau 20 : Propriétés optiques de triazapentalènes substitués en C<sup>6</sup>.

						
solvant	DCM	DCM	DCM	DCM	DCM	DMSO
$\lambda_{ex}(nm)$	438	440	438	437	446	468
$\lambda_{em}(nm)$	498	502	493	498	503	510
$\epsilon(M^{-1}.cm^{-1})$	14000	15400	18000	10000	22000	26200
$\Delta$ Stokes (nm)	60	62	55	59	57	52
$\phi^{(a)}$	0.48	0.58	0.45	0.38	0.49	0.001
Brillance	6700	8900	8000	3600	11000	26
Couleur <sup>(b)</sup>						

<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « *Coumarine 153* » avec  $\lambda_{ex}=\lambda_{ex}$  des produits, et  $\Phi=0.38$  dans l'EtOH; <sup>(b)</sup> les images sont réalisées avec les échantillons solubilisés dans le DCM et irradiés à 365nm.

Le dérivé nitré (**117**), malgré une valeur très importante du coefficient d'extinction molaire de 26 200 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, connaît une perte totale de fluorescence. Il serait intéressant de tester l'effet sur la fluorescence en insérant le groupement nitro sur les positions *ortho* ou *méta* et surtout en *ortho* du phényle. Le composé qui se démarque ici est le produit (**122**), seule structure dont le groupement phényle est séparé du noyau central par une triple liaison. Ce fluorophore est caractérisé par un très bon rendement quantique de 49%, allié à une très bonne valeur du coefficient d'extinction molaire (22 000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

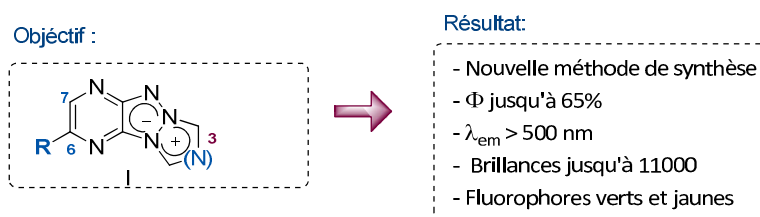
Pour résumer, sur l'ensemble des composés tricycliques fluorescents obtenus durant ce travail de thèse, le composé (**122**) est le fluorophore qui possède la meilleure brillance. De plus, fort de son caractère plus lipophile (*Figure 114*) renforcé par la présence du trifluorométhyle, ce produit est un excellent candidat pour les tests *in cellulo*.

Figure 114 : Composés amphiphile et lipophile.<sup>136</sup>

<sup>136</sup> Note : les valeurs de logP et logS sont calculées avec le logiciel MOE 2014.

### Conclusion et Perspectives :

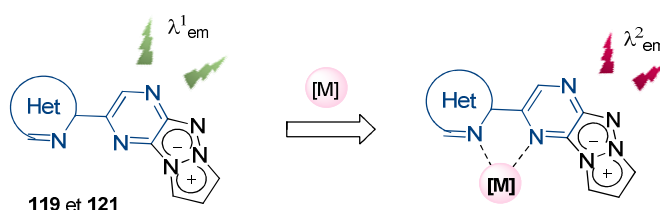
Dans cette partie notre ambition était de synthétiser de nouvelles structures tricycliques analogues du PyTAP fonctionnalisés en C<sup>6</sup> ou C<sup>7</sup>. Finalement, nous avons réussi à développer une nouvelle méthode de synthèse permettant d'obtenir avec de bons rendements des dérivés halogénés en position C<sup>6</sup>. L'utilisation de ces derniers dans divers types de couplage comme les réactions de Suzuki-Miyaura, de Sonogashira et de Stille nous a permis de générer une petite librairie de molécules originales présentant des propriétés photophysiques intéressantes (*Figure 115*).



**Figure 115 :** Objectif général et résultats obtenus.

Ces composés sont caractérisés par des émissions allant jusqu'à 527 nm et des rendements quantiques moyens à bons. Nous avons également montré le potentiel des structures tricycliques liées aux alcynes aromatiques (composé **122**), générant des fluorophores avec une brillance d'environ 11 000. Une autre structure potentiellement intéressante pour d'éventuelles investigations supplémentaires est le triazapentalène difonctionnalisé comportant un azote en C<sup>3</sup> et un autre groupement en C<sup>6</sup>.

Par ailleurs, parmi les composés obtenus dans la série de PyTAP fonctionnalisés en C<sup>6</sup>, deux composés, à savoir les fluorophores (**119**) et (**121**), sont des candidats potentiels comme ligand complexant des métaux. En effet, dans ces deux molécules on retrouve un enchaînement -N=C-C=N- analogue au système 2,2'-bipyridine décrit comme propice à la complexation des métaux.<sup>137</sup>



**Figure 116 :** Synthèse de complexes métalliques fluorescents.

Il serait donc intéressant d'évaluer la capacité ces deux molécules à se lier à des espèces métalliques, pour ensuite étudier l'effet induit sur leurs propriétés photophysiques (*Figure 116*).

<sup>137</sup> Kaes, C., Katz, A. & Hosseini, M. W.; Bipyridine: The Most Widely Used Ligand. A Review of Molecules Comprising at Least Two 2,2'-Bipyridine Units. *Chem. Rev.*, **100**, 3553–3590, (2000).



## Chapitre 5 : Etudes théoriques, prédiction et synthèse des modèles théoriques

Dans les chapitres précédents, nous avons montré le potentiel fluorescent prometteur du noyau pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène (**14**). Nous avons également noté que la fonctionnalisation de ce noyau avec des groupements conjugués de type aryles ou alcynes, permet d'obtenir de meilleurs rendements quantiques et d'augmenter la brillance, tandis que l'ajout des groupements de type -NO<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, et -OMe inhibent la fluorescence du noyau central. Ces observations s'appuient essentiellement sur les analyses photophysiques que nous avons réalisé après la synthèse de chaque composé.

Le premier objectif de cette partie était d'utiliser les calculs théoriques pour essayer d'expliquer le mécanisme de fluorescence des triazapentalènes tricycliques, non-étudié auparavant. Dans un deuxième temps, nous nous sommes basés sur des algorithmes permettant de prédire certaines propriétés photophysiques comme les longueurs d'onde d'émission ou d'excitation. Ainsi, nous avons utilisé des méthodes informatiques dans le but de prédire les propriétés de fluorescence nous permettant d'accéder à des modèles théoriques avec des propriétés spectroscopiques encore plus performantes.

L'ensemble des études théoriques présentées dans ce chapitre ont été menées par l'équipe du Pr. Pascal BONNET à l'ICOA.

### 1. Etude théorique

#### 1.1. Méthode

Pour définir les méthodes de calculs nous nous sommes basés sur les travaux de Namba<sup>75c</sup> et Cheng.<sup>48</sup> Ainsi, pour la prédiction des propriétés optiques, les calculs sont réalisés par la méthode TD-DFT (Time Dependent-Density Functional Theory) qui prend en compte la dépendance temporelle au système. Pour ce faire, deux logiciels ont été utilisés : le logiciel *Gaussian*<sup>138</sup> pour effectuer les calculs des énergies des états fondamentaux (EF) et des états excités (EE), et *Gabedit*<sup>139</sup> pour visualiser les orbitales moléculaires.

La stratégie de cette étude consiste à utiliser ces outils pour pouvoir obtenir des informations comme les charges partielles, les coefficients orbitales mais aussi les longueurs d'onde d'absorption et d'émission à partir des fichiers d'entrées qui seront les structures moléculaires introduites par l'opérateur (*figure 117*).

<sup>138</sup> Gaussian 09, Revision E.01 ; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

<sup>139</sup> Allouche, A.-R. Gabedit - A graphical user interface for computational chemistry softwares. *J. Comput. Chem.* **32**, 174–182 (2011).



Figure 117 : Calculs théoriques et prédiction de la fluorescence.

Les résultats présentés ci-après sont donnés en utilisant CAM-B3LYP, méthode de choix pour le traitement des systèmes de type TCI (Transfert de Charges Intramoléculaire).<sup>140</sup> Les simulations ont été réalisées tout d'abord en absence des solvants (ou en milieu gazeux), puis dans le DMSO. La validation des méthodes a été réalisée tout d'abord sur des molécules décrites dans la littérature comme l'acétaldéhyde et le 1,3a,6a-triazapentalène bicyclique. Les résultats de ces études de vérifications non-présentés ici, montrent de très bonnes corrélations avec les données de la littérature ce qui nous a permis de valider l'algorithme et de passer à l'étape suivante sur nos molécules.

## 1.2. Calculs des charges partielles et analyses orbitales

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à déterminer la distribution des charges partielles de ces noyaux tricycliques. Les charges partielles (en u.a.) ont été relevées à l'état fondamental (EF) et à l'état excité (EE). Quelle que soit la molécule étudiée, le nombre de positions ayant une charge négative est supérieur à celles positives. Par exemple, dans le cas du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène (**14**) (Figure 118), à l'état fondamental et à l'état excité le nombre des atomes chargés négativement est supérieur, dû à la forte charge impliquée par les atomes d'azote.

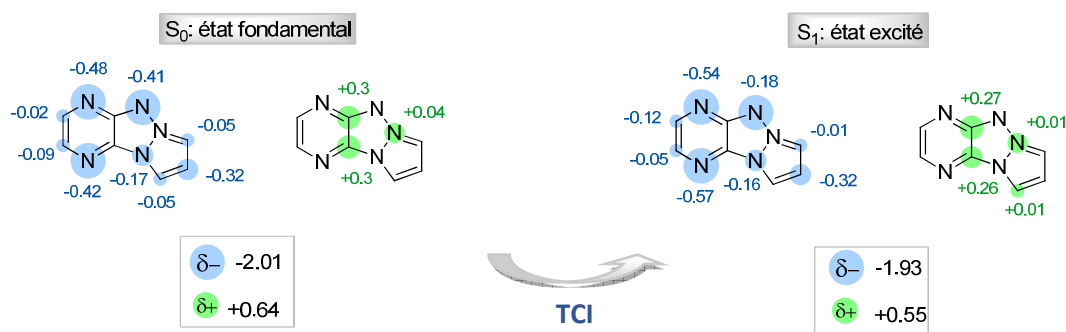
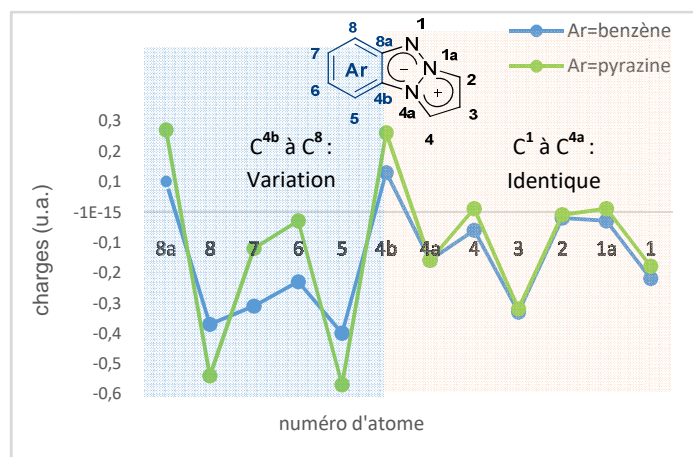


Figure 118 : Distribution des charges atomiques du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène (**14**) à l'état fondamental ( $S_0$ ) et à l'état excité ( $S_1$ ).

Même si la somme des charges de l'ensemble des atomes reste quasiment identique à l'état  $S_0$  et à l'état  $S_1$ , les différents transferts de charge intramoléculaires peuvent être responsables de la

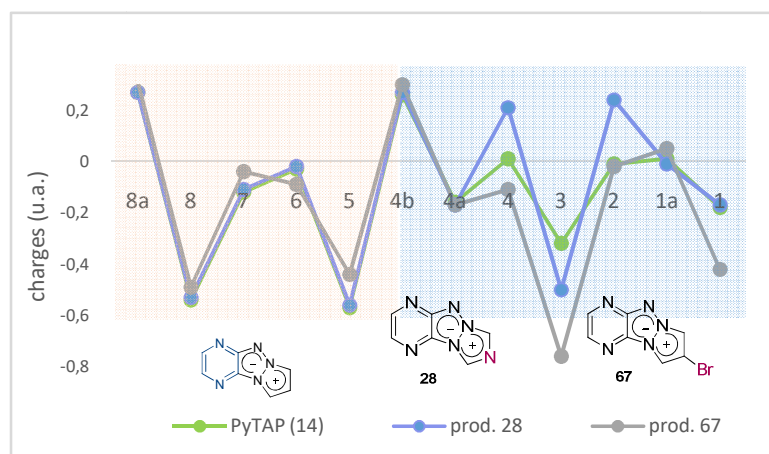
<sup>140</sup> Yanai, T., Tew, D. P. & Handy, N. C. A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.* **393**, 51–57 (2004).

fluorescence.<sup>141</sup> La comparaison de la répartition des charges partielles du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène et de son analogue benzo-1,3a,6a-triazapentalène (*Figure 119*), montre une très bonne corrélation des valeurs associées aux positions de C<sup>1</sup> à C<sup>4b</sup>, correspondant au motif commun 1,3a,6a-triazapentalène (*Figure 119*). Une différence plus importante est constatée sur le noyau à 6 chaînons (Ar), avec une fluctuation plus prononcée dans les cas de la pyrazine. Cette différence pourrait être associée à un mouvement électronique plus important dans le cas du cas du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène qui favoriserait la fluorescence.



**Figure 119 :** Variation des charges partielles du pyrazino- et benzo-1,3a,6a-triazapentalène à l'état excité.

La modulation du noyau azolique du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène en position C<sup>3</sup> avec un azote et un brome génère des profils de charge avec une bonne superposition globale (*figure 120*). Seule la position C<sup>3</sup> et les positions adjacentes subissent une fluctuation notable, en fonction de la nature du groupement (carbonée, azotée ou bromée).



**Figure 120 :** Variation des charges partielles du pyrazino- et benzo-1,3a,6a-triazapentalène à l'état excité.

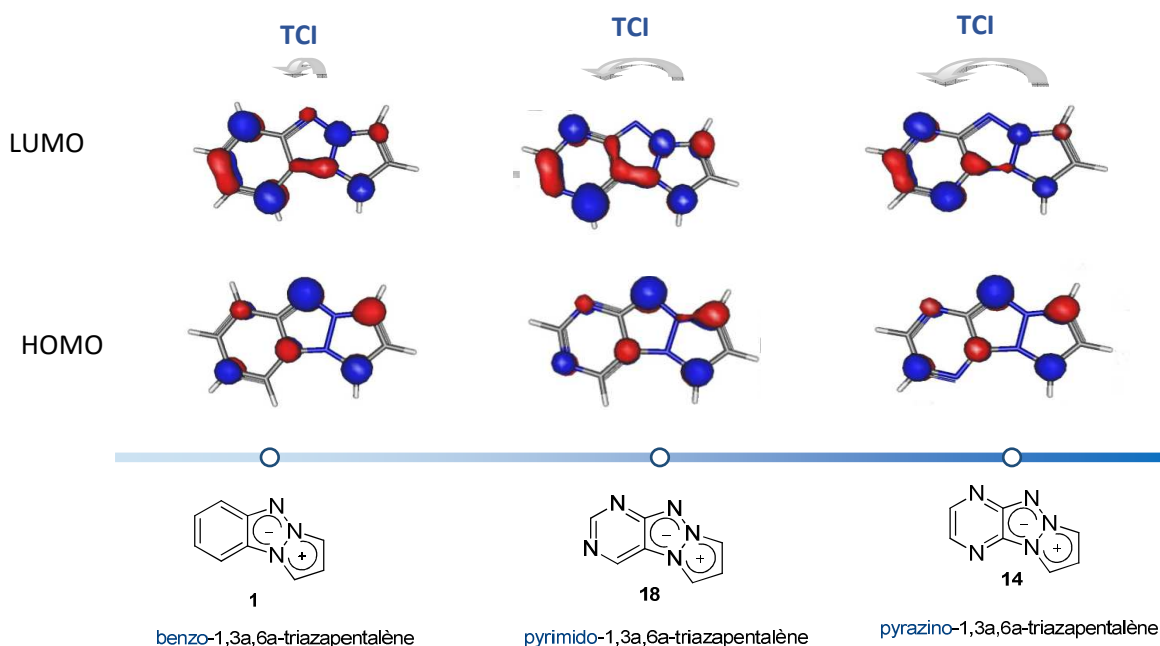
Il est à noter qu'une baisse importante de la valeur de la charge partielle en C<sup>3</sup> est constatée dans le cas du dérivé bromé (**67**). Nous pouvons alors nous attendre à une fluorescence bien plus marquée dans le cas du composé bromé par rapport à son analogue azoté (**28**) et carboné (**14**). Or, il

<sup>141</sup> Novakova, V. *et al.* Structural factors influencing the intramolecular charge transfer and photoinduced electron transfer in tetrapyrazinoporphyrazines. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 5440 (2014).

s'avère qu'expérimentalement, ces trois composés présentent des données de fluorescence similaires. La modulation de ce pyrazole et des charges électroniques partielles du noyau pyrazolique ne semble pas avoir d'impact important sur la fluorescence globale de la molécule. Dans le cas où les TCI seraient responsables de la fluorescence, il en résulte que pour influencer sur la nature fluorescente du noyau pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène, la modulation du cycle à 6 paraît être la meilleure solution.

### 1.3. Orbitales frontières

Dans cette partie nous avons calculé les coefficients orbitaux à l'état fondamental et à l'état excité de 3 analogues tricycliques du motif 1,3a,6a-triazapentalène (*figure 121*). Les résultats obtenus, schématisés ci-dessous, montrent que les Orbitales Frontières (OF) de ces molécules présentent la même tendance, qui est plus ou moins marquée : les coefficients des atomes de l'HOMO (taux d'implication de l'atome dans l'orbitale) sont plus importants sur le cycle à 5 atomes, tandis que la LUMO est plus localisée sur le cycle à 6 atomes, mais le transfert de charge est moins marqué dans le cas des composés A et E. En effet, les coefficients orbitaux sont aussi très présents sur le triazole central dans ce cas, ce qui n'est pas le cas du composé D.

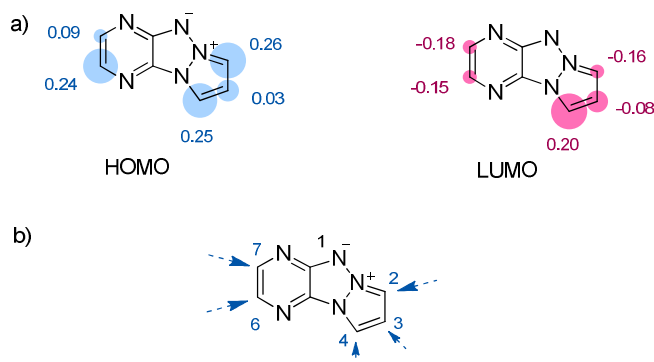


**Figure 121** : Les orbitales HOMO et LUMO à l'état fondamental.

Cheng *et coll.*<sup>48</sup> ont montré que les positions possédant une différence électronique plus marquée entre la LUMO et HOMO peuvent perturber le caractère électronique du noyau fluorescent faisant de ces positions des cibles de choix pour une post-fonctionnalisation. En se basant sur cette observation, nous avons étudié plus en détail les coefficients orbitaux et la densité électronique du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène (**14**) dans son état fondamental (HOMO) et à l'état excité (LUMO) (*Figure 122.a*). L'idée principale est d'identifier les positions les plus judicieuses à



fonctionnaliser pour obtenir des propriétés spectroscopiques plus attrayantes. Les valeurs obtenues montrent clairement que la densité électronique des 5 positions fonctionnalisables du noyau tricyclique varie considérablement entre l'état fondamental et excité. Toutefois, une variation plus conséquente est constatée sur les positions C<sup>2</sup>, C<sup>6</sup> et C<sup>7</sup> (Figure 122.b).



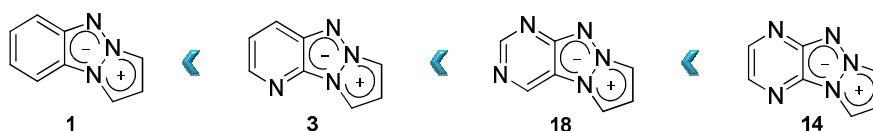
**Figure 122** : a) Densités électroniques des états fondamentaux pour la HOMO et la LUMO. b) Positions du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène propices à une post-fonctionnalisation.

Ce premier résultat montre que la quasi-totalité des positions disponibles sur ce noyau tricyclique peuvent être modulés avec des divers groupements susceptibles de perturber le caractère fluorescent du noyau central. En revanche, cette approche ne permet pas d'identifier la nature précise du groupement à introduire, pour obtenir une fluorescence optimale. Afin d'identifier la nature des ces groupements, des calculs d'énergies d'absorption et d'émission sont réalisés.

#### 1.4. Calculs des énergies d'excitation et d'émission

Dans cette partie nous nous sommes intéressés aux calculs des énergies nécessaires pour exciter les molécules, ainsi que l'énergie libérée par leur retour à l'état fondamental stable. Ceci revient à calculer les valeurs des longueurs d'onde d'absorption et d'excitation.

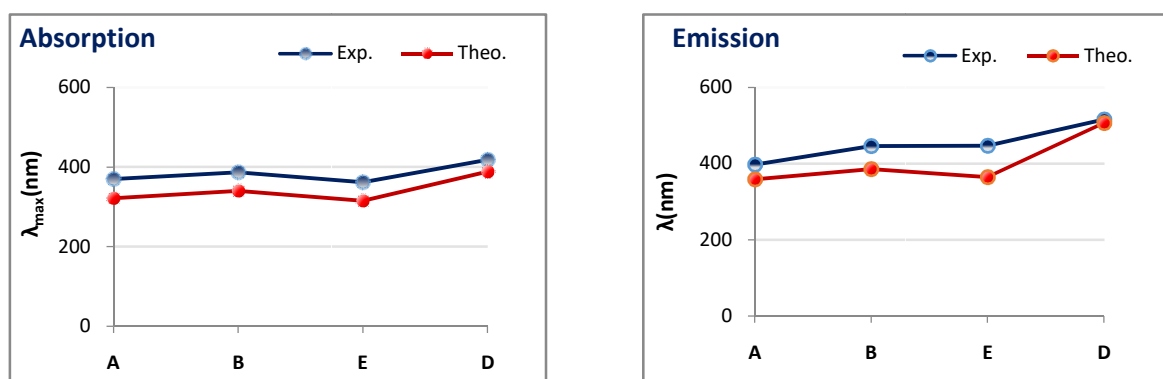
Dans un premier temps, les calculs ont été réalisés sur les 4 noyaux tricycliques (**1**), (**3**), (**18**), (**14**) pour lesquels les données expérimentales sont connues (Figure 123), le but étant de comparer les valeurs théoriques avec les valeurs expérimentales pour pouvoir valider cette méthode.



**Figure 123** : Structures utilisées pour valider la méthode de prédiction.

Les résultats obtenus lors de ces études, représentés dans les graphiques ci-dessous (Figure 124), montrent une très bonne corrélation entre les valeurs d'absorption et d'émission entre

l'expérimental et la théorie. La différence la plus petite est constatée dans le cas du composé le plus fluorescent qui est le pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène (**14**).



**Figure 124** : Comparaison de valeurs théoriques et expérimentales des longueurs d'onde d'absorption et d'émission.

Ces résultats confirment donc le mode de calcul mis en place, en vue de la prédiction des longueurs d'onde d'absorption et d'émission de nouvelles structures dans la série triazapentalènes. Il est important de noter que les deux limitations importantes de cette méthode sont : l'incapacité de prédire si le composé analysé est fluorescent ou non et l'impossibilité de calculer les coefficients d'extinction molaires.

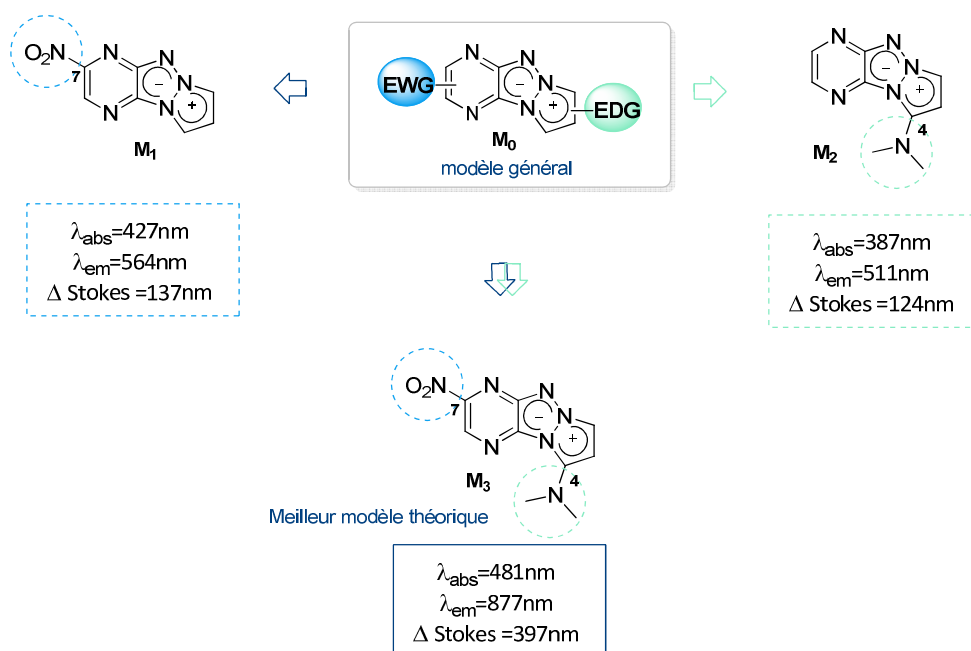
### 1.5. Application de la méthode : Prédiction et le modèle théorique

Les calculs ont été tout d'abord effectués en faisant varier des groupements attracteurs sur les 5 positions du noyau PyTAP. De par leurs propriétés électroniques particulières, les groupements choisis sont : -NO<sub>2</sub>, -CN, -Cl, -F, -CF<sub>3</sub>. Les mêmes calculs ont été ensuite réalisés sur les noyaux comportant des groupements donneurs comme : -NH<sub>2</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, OH et OMe.

Les résultats théoriques issus de ces calculs montrent que l'ajout de substituants électro-attracteurs provoquerait un effet bathochrome sur les longueurs d'onde d'émission, permettant aussi d'améliorer le déplacement de Stokes. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les groupements attracteurs sont situés sur le noyau pyrazine. Ces résultats sont en accord avec les calculs théoriques précédemment effectués, car la présence du groupement attracteur sur ce cycle renforce le transfert de charge vers le noyau à 6 chaînons. Théoriquement, le meilleur substituant est le groupement nitro, particulièrement en lorsqu'il est placé en position C<sup>7</sup> (**M**<sub>1</sub>, Figure 125). Ainsi, comparé au pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène (**14**) non fonctionnalisé, l'analogue nitré montrerait une longueur d'onde d'émission plus élevée à 564 nm et un meilleur déplacement de Stokes de 137 nm.

A l'inverse, la présence de groupements donneurs montre une conséquence bénéfique sur les propriétés de fluorescence lorsque ces derniers sont situés sur le noyau pyrazolique. Le meilleur groupement est la diméthylamine, qui une fois introduit sur la position C<sup>4</sup> (**M**<sub>2</sub>, Figure 125), montre une valeur théorique pour la longueur d'onde d'émission de 511 nm allié à un déplacement de

Stokes de 124 nm. Basés sur ces résultats, nous avons donc établi une structure générale du modèle moléculaire (**M<sub>0</sub>**, *Figure 125*), présentant les groupements donneurs et attracteurs d'une part et d'autre du noyau central.



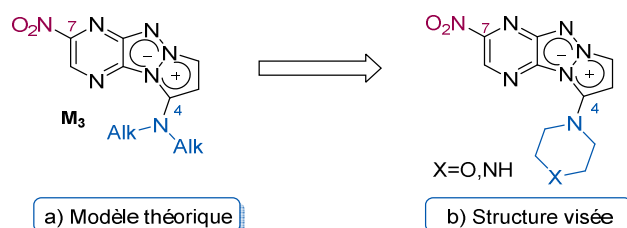
**Figure 125** : Modèle général et meilleurs modèles prédits mono- (**M<sub>1</sub>** et **M<sub>2</sub>**) et di-substitué (**M<sub>3</sub>**).

Finalement, l'effet induit par la présence simultanée des deux groupements directeurs avec l'amine alkylée en C<sup>4</sup> et le nitro en C<sup>7</sup> a été calculée (composé **M<sub>3</sub>**). Les résultats révèlent une émission à 877 nm, soit dans le domaine du proche infrarouge, mais aussi un déplacement de Stokes remarquable d'environ 400 nm.

Par conséquent, notre intérêt s'est tourné vers cette structure et ses analogues qui permettront de statuer sur la prédictabilité de ce modèle de ce calcul.

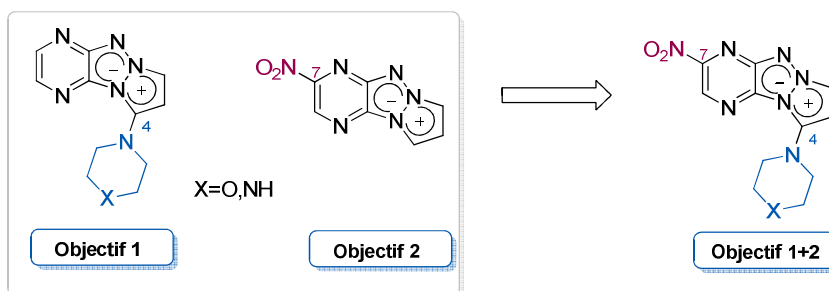
## 2. Synthèse du modèle théorique : fonctionnalisation du PyTAP en C<sup>4</sup> et C<sup>7</sup>

Basés sur les résultats théoriques avec un modèle moléculaire établi (**M<sub>3</sub>**, *Figure 126.a*), nous nous sommes concentrés sur la synthèse de ce type de composés. Dans un but pratique, nous avons dans un premier temps envisagé la fonctionnalisation du triazapentalène sur la position C<sup>4</sup> avec des amines cycliques de type morpholine ou pipérazine (*Figure 126.b*).



**Figure 126** : Modèle théorique et structure visée.

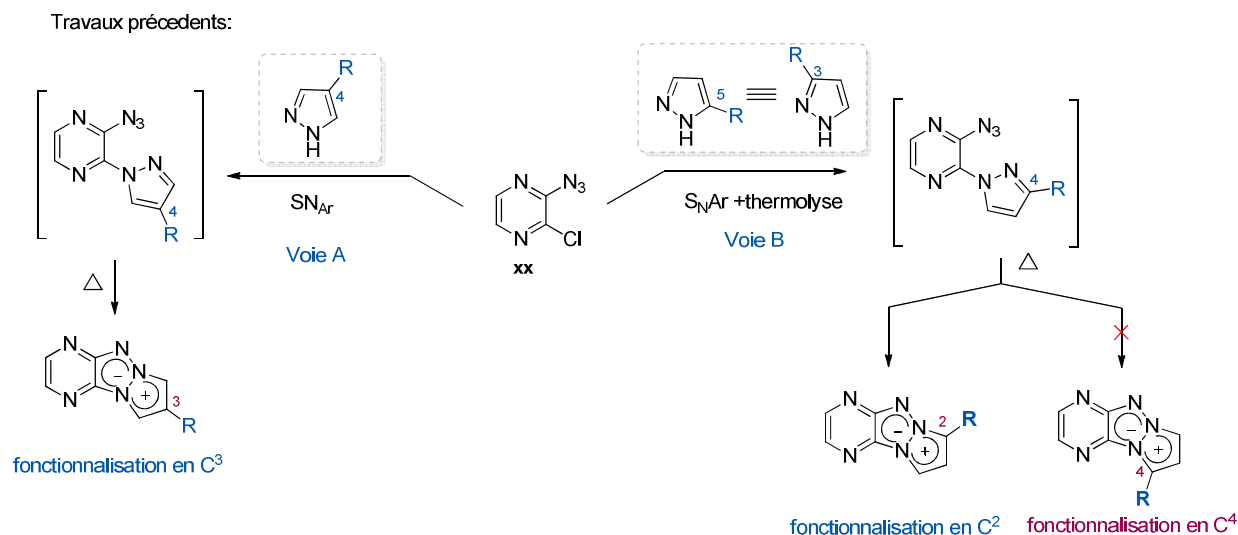
La synthèse du triazapentalène difonctionnalisé s'annonçant difficile de prime abord, l'idée directrice consiste à développer dans un premier temps des méthodes de synthèse pour chaque type de fonctionnalisation (*Figure 127*). Ainsi, la voie de synthèse menant vers les triazapentalènes fonctionnalisés en C<sup>4</sup> par une amine serait tout d'abord réalisée (*objectif 1*), suivi de la mise au point d'une méthode de fonctionnalisation de la pyrazine avec le groupement nitro (*objectif 2*). Enfin les deux voies de synthèse seront combinées dans le but d'accéder au composé souhaité (*objectif 3*).



**Figure 127** : Objectifs visés.

### 2.1. Objectif 1 : Synthèse du (4-amino)-PyTAP

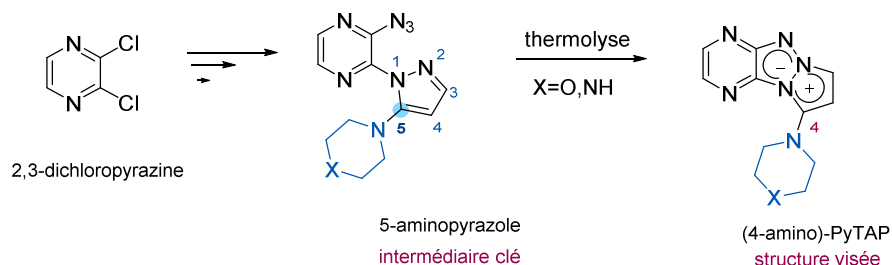
Dans les chapitres précédents, nous avons développé un accès synthétique aux structures de type pyrazino-triazapentalènes fonctionnalisés en C<sup>2</sup> et C<sup>3</sup> (*Figure 128*). Cette stratégie de synthèse consiste à partir des pyrazoles fonctionnalisés, de les introduire sur le noyau pyrazine *via* des substitutions nucléophiles aromatiques (*Voies A et B*). Cependant, du fait de la réactivité des pyrazoles, l'isomère qui conduirait au pyrazinotriazapentalène fonctionnalisé en C<sup>4</sup> n'est pas obtenu.



**Figure 128 :** Méthode générale pour la synthèse des triazapentalènes tricycliques C<sup>2</sup> et C<sup>3</sup> substitués.

Par conséquent, il est nécessaire de développer une autre méthode pour accéder aux noyaux pyraziniques judicieusement fonctionnalisés avec l'azoture et le 5-aminopyrazole (*figure 129*). Cet intermédiaire clé permettra d'accéder à la structure souhaitée (4-amino)-PyTAP par la réaction de thermolyse.

Nouveau Objectif:



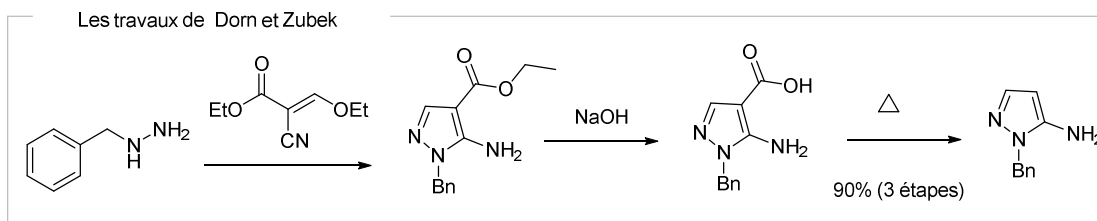
**Figure 129 :** Stratégie générale pour la synthèse du (4-amino)-pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène.

#### a) Etat de l'art : synthèse de 5-aminopyrazoles

Les pyrazoles comportant un groupement sur la position 5 sont plus difficiles d'accès que les pyrazoles substitué en 3/4. Cependant, leurs propriétés biologiques variées et intéressantes ont motivé de nombreuses équipes pour développer de nouvelles voies d'accès.

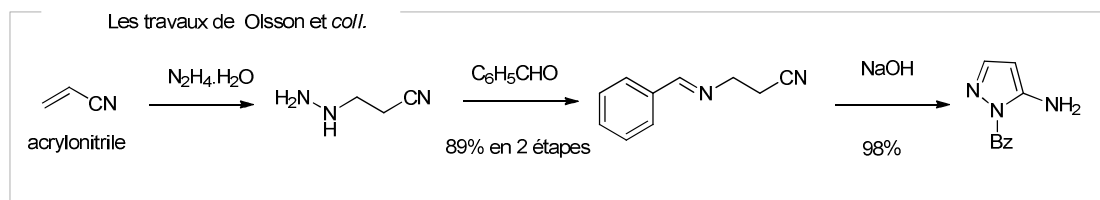
En effet, le Celecoxib®, Rimonabat® ou leur analogue 5-alkylaminopyrazole, présentent tous un pyrazole substitué en C<sup>5</sup> comme motif central et montrent de puissantes activités anti-inflammatoires, anti-obésité et en oncologie.

Une voie de synthèse proposée par Dorn et Zubek en trois étapes a permis d'obtenir la 5-amino pyrazole benzyl hydrazine (*Schéma 72*).<sup>142</sup> Leur schéma synthétique est composé d'une condensation de la benzylhydrazine avec le 2-cyano-3-éthoxyacrylate d'éthyle, d'une saponification et d'une décarboxylation, avec un rendement global de 90%.



**Schéma 72** : Synthèse du 5-aminopyrazole (méthode 1).

L'alternative plus efficace est proposée par l'équipe de Olsson.<sup>143</sup> Cette méthode permet d'obtenir l'intermédiaire souhaité *via* une condensation entre l'acrylonitrile et l'hydrazine monohydrate suivie d'une deuxième condensation avec le benzaldéhyde (*Schéma 73*). Ces deux premières étapes ont été réalisées de façon « one pot » permettant d'obtenir l'imine intermédiaire avec un rendement de 89%. La dernière étape est une cyclisation en milieu basique qui après trituration en milieu acide, permet l'obtention de l'amine désirée sous forme chlorhydrate sans aucune purification avec un rendement de 98%.



**Schéma 73** : Synthèse du 5-aminopyrazole (méthode 2).

Plus récemment, une méthode utile pour obtenir des pyrazoles fonctionnalisés a été développée par McCarthy et Naylor (*Schéma 74*).<sup>144</sup> Contrairement aux méthodes précédentes, elle suppose la synthèse du pyrazole difonctionnalisé par un groupement méthyle et une pipérazine, respectivement en positions 3 et 5. Cette méthode utilise comme précurseur commercial un cétoamide, réagissant avec la phenylhydrazine en présence du réactif de Lawesson. Le rôle du réactif de sulfuration est de générer un thioamide, plus réactif que l'amide de départ. Cette méthode a

<sup>142</sup> (a) Dorn, H. & Zubek, A. Potentielle Cytostatica, XVI. Bicyclische Systeme aus Acetessigester und 5-Amino-1-methyl-, 5-Amino-1-benzyl- sowie 3(5)-Amino-pyrazol. *Chem. Ber.* **101**, 3265–3277 (1968) (b) Suzuki, C. I, 1,5-disubstituted 1H-pyrazolo[3,4-b]pyrazine derivatives and antitumour agents which contain them; DE3432983 (A1)

<sup>143</sup> Holschbach, M. H., Wutz, W. & Olsson, R. A. Synthesis of 2-benzyl-2H-pyrazole-3,4-diamine dihydrochloride. *Tetrahedron Lett.* **44**, 41-43, (2003).

<sup>144</sup> McCarthy, T. D. & Naylor, A.; Heterocyclic compounds and methods for their use. (2013) WO2013110134 (A1).

l'avantage de permettre l'accès direct au pyrazole portant une amine tertiaire, ce qui contraste avec les méthodes précédentes.

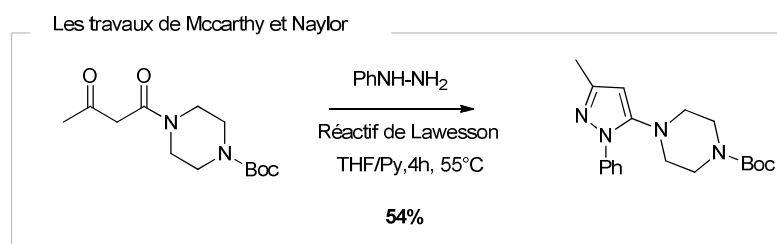


Schéma 74 : Synthèse du 5-aminopyrazole (méthode 3).

En dépit d'un rendement plus faible, cette méthodologie de synthèse est donc préférée aux précédentes, car elle permet une fonctionnalisation plus simple du noyau pyrazolique.

### b) Synthèse du 4-aminotriazapentalène : Stratégie générale

Basé sur ces résultats bibliographiques, le chemin rétrosynthétique suivant a été établi, avec dans un premier temps la présence d'un groupement morpholine sur le pyrazole (Schéma 75).

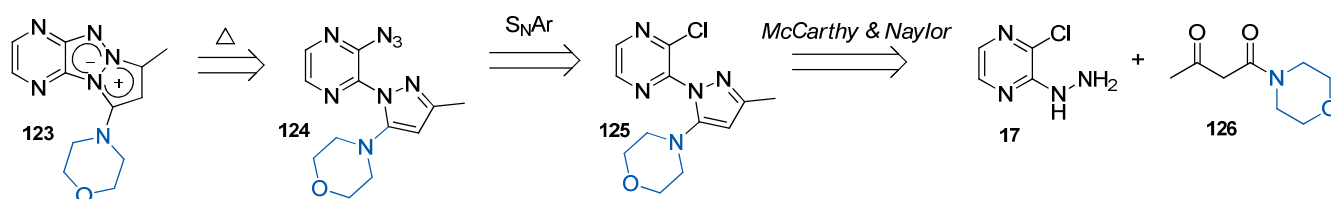


Schéma 75 : Rétrosynthèse du 4-morpholonyl-PyTAP (**123**).

Par cette stratégie, l'obtention du composé (**123**) issu de l'intermédiaire (**124**) est possible par une réaction de substitution nucleophile aromatique du chlore par l'azoture. L'intermédiaire (**125**) chloré serait obtenu à partir de la 2-chloro-3-hydrazinyl-pyrazine (**17**) et de la 1-morpholinobutane-1,3-dione (**126**).

### c) Synthèse et optimisation

Pour synthétiser le β-céto amide (**126**), nous avons employé la procédure décrite par Allais et coll.<sup>145</sup> La morpholine est ici insérée par un couplage peptidique catalysé avec la 4-diméthylaminopyridine à partir de l'ester acétoacétique (β-cétoester) commercial. Cette réaction engendre la

<sup>145</sup> Allais, C., Liéby-Muller, F., Rodriguez, J. & Constantieux, T. Metal-Free Michael-Addition-Initiated Three-Component Reaction for the Regioselective Synthesis of Highly Functionalized Pyridines: Scope, Mechanistic Investigations and Applications. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 4131–4145 (2013).

formation de l'intermédiaire souhaité (**126**), isolé avec un rendement quantitatif (Schéma 76, étape 1).

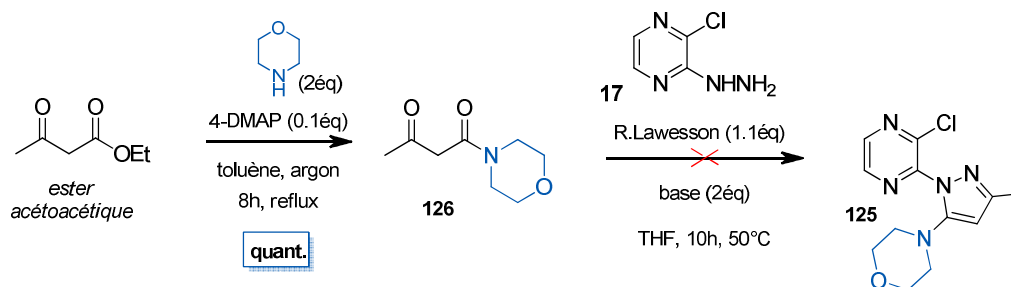


Schéma 76 : 1-morpholinobutane-1,3-dione (**126**).

Le  $\beta$ -céto amide est ensuite engagé dans l'étape de formation du pyrazole, étape réalisée selon les conditions du McCarthy et Naylor avec formation *in situ* du thioamide (Schéma 76, étape 2). Les conditions précises de la littérature ont été appliquées, à savoir les quantités des réactifs, le solvant et le chauffage, en remplaçant la phénylhydrazine par la 3-chloropyrazin-2-yl-hydrazine (**17**). Cependant, après 10h de réaction en milieu basique à 50°C, une multitude de sous-produits inséparables sur colonne et non identifiables par spectroscopie de masse sont observés, la présence du composé (**125**) n'étant pas observée. Face à ce résultat nous avons décidé d'optimiser la formation du pyrazole en isolant le thioamide intermédiaire avant de l'engager dans la condensation de Knorr avec l'hydrazine.

#### ➤ Optimisation de l'étape de thionation

Pour réaliser la réaction de thionation de carbonyles, plusieurs types de réactifs peuvent être employés : le pentasulfure de phosphore ( $P_2S_5$ ), le réactif de Belleau, le réactif de Davy ou le réactif de Lawesson (Figure 135). Ce dernier est l'agent de thionation le plus couramment utilisé, et est aussi le réactif prépondérant dans le cadre de notre optimisation.

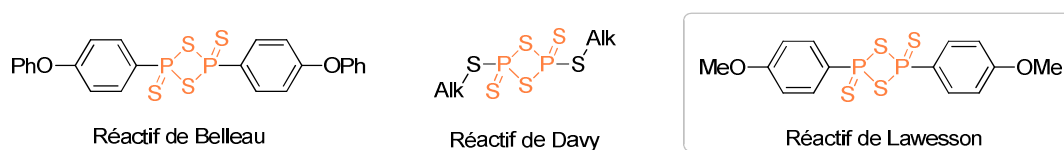


Figure 130 : Réactifs de thionation.

L'étude de Nishio *et coll.* sur la réactivité du réactif de Lawesson en fonction de la nature des substrats montre une meilleure efficacité envers les alcools que les amides ou les cétones.<sup>146</sup> Selon ce schéma, les esters sont les substrats les plus difficiles à transformer, demandant l'emploi de conditions très agressives (Figure 136).

<sup>146</sup> Nishio, T. & Ori, M. Sulfur-containing Heterocycles: Facile Synthesis of 4H-1,3-Thiazines by the Reaction of 3-N-Acylamino Ketones with Lawesson's Reagent. *Heterocycles*. **52**, 111 (2000).





**Figure 131** : Réactivité des substrats avec le réactif de Lawesson.<sup>146</sup>

Compte tenu de ces résultats bibliographiques, la thionation de l'amide devrait pouvoir s'effectuer sélectivement en contrôlant parfaitement la stoechiométrie du réactif de Lawesson. Les solvants généralement utilisés lors de thionation d'ester sont principalement le toluène ou du xylène. Basés sur ces résultats bibliographiques nous avons réalisé une série d'optimisation dans le toluène, en faisant varier plusieurs paramètres comme le mode d'activation, la température et la quantité du réactif de Lawesson introduite (*Tableau 20*).

**Tableau 20** : Thionation du cétamide.

Entrée	R. de Lawesson	Chauffage	T(°C)	Temps	η
1	0.5éq	Thermique	75°C	16h	40%
2	0.5éq	M-Ondes	110°C	30min	39%
3	0.5éq	M-Ondes	140°C	7min	79%
4	1éq	M-Ondes	140°C	7min	13%
5 (scale-up)	0,5éq	M-Ondes	140°C	10min	73%

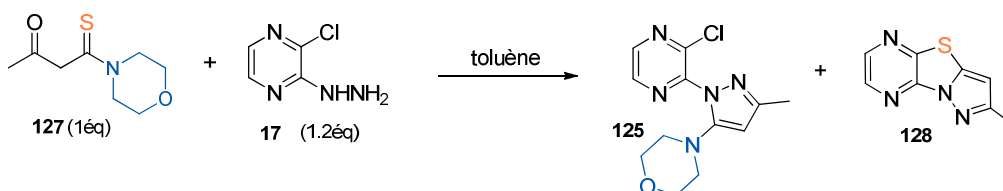
De manière générale, les meilleurs rendements sont issus d'une activation micro-onde, alliés à des temps de réaction courts. Ainsi, la réaction au micro-onde à 110°C (*entrée 2*) permet d'obtenir le même résultat qu'un chauffage thermique (*entrée 1*) en réduisant le temps de réaction de façon drastique (16 h vs. 30 min). L'augmentation de la température à 140°C (*entrée 3*) permet de diminuer encore le temps de réaction, comme on observe la conversion totale en 7 minutes, et de doubler le rendement. L'utilisation du réactif de Lawesson en excès (*entrée 4*), engendre la formation de nombreux sous-produits, rendant la purification laborieuse et conduisant également à une baisse considérable du rendement. Ce résultat explique très certainement l'échec des conditions de McCarthy et Taylor.

Enfin, les meilleures conditions (*entrée 3*) ont été appliquées à plus grande échelle, avec l'utilisation de 1,2 g de l'amide, et après seulement 10 minutes de réaction, le produit souhaité (**127**) est obtenu avec un rendement satisfaisant de 73%.

## ➤ Optimisation de l'étape de formation du pyrazole

La réaction de cyclisation est ensuite réalisée dans le toluène en présence d'un léger excès d'hydrazine (**17**) soit avec un chauffage thermique, ou sous irradiation micro-ondes, en milieu basique, acide ou neutre (*Tableau 21*).

**Tableau 21** : Formation du pyrazole.



Entrée	Base/acide	Chauffage	T(C°)	Temps	Rapport RMN ( <b>125</b> : <b>128</b> )	$\eta$ ( <b>125</b> : <b>128</b> )
1	-	Thermique	90	20h	1 : 1	13% : 22%
2	Py (1,7éq)	Thermique	90	20h	1 : 0,8	44% : 26%
3	Py (1,7éq)	M-Ondes	140	30min	1 : 0,4	45% : 16%
4	Py (4,5éq)	M-Ondes	140	30min	1 : 0,38	59% : 22%
5	AcOH(1éq)	M-Ondes	140	90min	0,2 : 1	10% : 58%
6 (scale-up)	Py (4,5éq)	M-Ondes	140	75min	1 : 0,5	47% : 22%

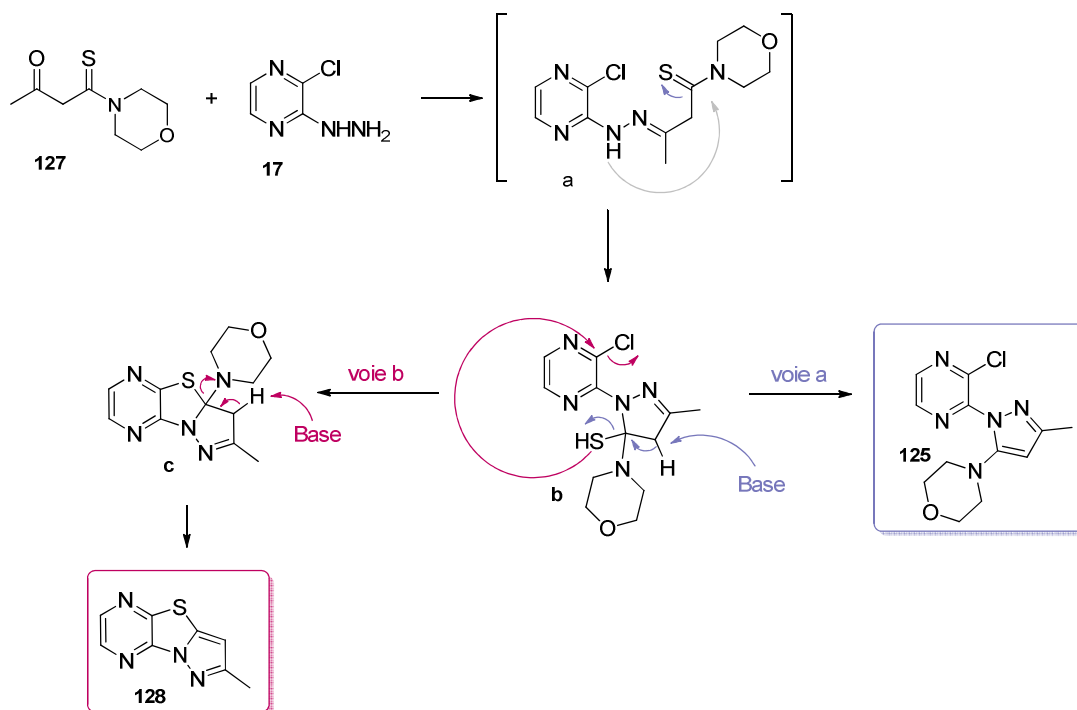
Lors des premiers essais, nous observons la formation du composé souhaité (**125**), et d'un sous-produit bleu fluorescent (**128**), obtenu en proportion importante lors de tous les essais. Sa structure a été confirmée par spectroscopie RMN et par HRMS et des analyses par diffraction de rayons X sont à ce jour également envisagées. Un des objectifs majeurs est donc de trouver des conditions permettant de limiter la formation de ce composé au profit du composé (**125**).

La réaction réalisée en absence de base ou d'acide (*entrée 1*) conduit à la formation des deux composés (**125**) et (**128**) avec de faibles rendements et un rapport de 1:1 (déterminé par RMN). L'ajout de pyridine apporte un réel effet bénéfique (*entrée 2*), le composé (**125**) est présent en plus grande quantité, et le rendement est meilleur. Le chauffage au micro-onde à 140°C (*entrée 3*) permet de diminuer considérablement le temps de réaction et d'améliorer le rapport (**125**)/(**128**) en faveur du composé souhaité. Le meilleur rendement est finalement obtenu lorsque la quantité de pyridine est augmentée de 1,7 à 4,5 équivalent (*entrée 4*), et ce malgré la production du composé tricyclique (**128**) indésirable en quantité non négligeable.

Dans des conditions acides (*entrée 5*) la réaction est plus lente et la proportion du tricycle soufré est produit en large majorité (58% de rendement pour un rapport 5:1). Nous avons par conséquent retenu comme meilleures conditions l'utilisation d'un large excès de base et un chauffage aux micro-ondes dans le toluène (*entrée 4*). Pour une réaction à plus large échelle (à partir

de 700 mg du composé thioné **127**), la pyrazine finale (**125**) comportant le motif (pyrazol-5-yl)morpholine a ainsi pu être isolée avec un rendement de 47%.

Le mécanisme proposé permettant l'accès au composé voulu et à notre impureté est présenté ci-dessous (*Schéma 77*) :



**Schéma 77** : Mécanismes proposés pour la formation des composés (**125**) et (**128**).

La cétone étant plus réactive que le thioamide, l'hydrazine (**a**) est formée dans un premier temps. Par la suite, le pyrazole est formé par une réaction de cyclisation entre l'hydrazone et le thioamide. A partir de l'intermédiaire (**b**), deux voies réactionnelles sont envisageables. La première (voie a) est favorisée en milieu basique et génère majoritairement le pyrazole difonctionnalisé (**125**) par élimination du sulfure d'hydrogène. A l'opposé, le soufre peut aussi réagir comme nucléophile, conduisant au départ du chlore après une substitution nucléophile intramoléculaire (voie b). La perte de morpholine permet d'aromatiser le noyau azolique formant ainsi le composé tricyclique (**128**).

#### ➤ Formation de l'azoture

Selon le schéma réactionnel général (*Schéma 75*), l'étape suivante consiste à obtenir l'azoture à partir du dérivé chloré (**125**). La synthèse de l'azoture se fait en deux étapes, par l'introduction de l'hydrazine suivie de son azoturation en milieu acide. Expérimentalement, cette dernière étape conduit à une dégradation de la molécule. Face à ce résultat, nous nous sommes tournés vers la substitution directe du chlore par l'azoture.

Quelques essais de  $S_NAr$  en présence d'azoture de sodium dans l'acétonitrile ou dans le *N,N*-diméthylformamide ont été réalisés. Le meilleur résultat est obtenu en utilisant deux équivalents de  $NaN_3$  dans le DMF à 100 °C durant 9h (Schéma 78). Le composé (**124**) est isolé avec un rendement faible de 27%. Une optimisation jugée trop chronophage n'a pas été effectuée.

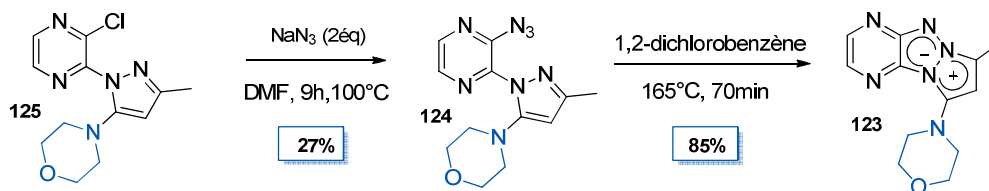


Schéma 78 : Synthèse du composé (**123**) -  $S_NAr$ / thermolyse.

L'intermédiaire (**124**) est ensuite directement engagé dans l'étape de thermolyse conduisant à la formation du composé souhaité (**123**) avec un bon rendement isolé de 85%.

## 2.2. Objectif 2 : Synthèse du 7-nitro-PyTAP (**129**)

Le deuxième objectif est de synthétiser le triazapentalène comportant un groupement nitro sur le noyau pyrazine (**129**). Un des défis majeurs de cette partie est l'identification d'une méthode de nitration de la pyrazine, en l'absence de données bibliographiques (Schéma 79).

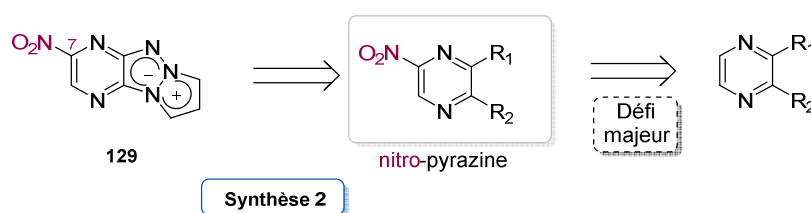


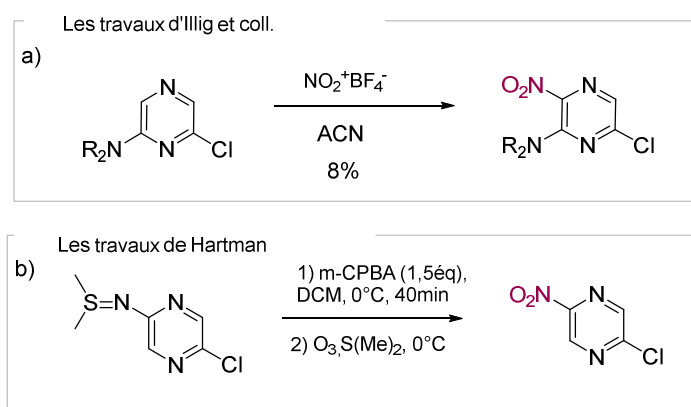
Schéma 79 : Schéma rétrosynthétique général pour accéder au composé d'intérêt (**129**).

### a) Etat de l'art : méthodes générales de nitration

A ce jour, de nombreux agents de nitration sont connus. La méthode historique consiste à utiliser un mélange d'acides forts ( $H_2SO_4/HNO_3$ ), généralement associé à des conditions drastiques pouvant mener à la dégradation du substrat de départ ou à une nitration non contrôlée. Afin de pallier ces problèmes, des méthodes plus performantes ont été développées dans des conditions plus douces. En fonction du résultat visé, principalement la régio- ou chémosélectivité, de nombreux systèmes de nitration plus récents ont été décrits. Pour ce faire, on peut employer des acyl- et alkyl nitrates, des sels de nitronium, des nitrates de métaux, des chlorures de nitriles. Des méthodes procédant par transfert de groupements nitro en solution à l'aide de liquides ioniques sont

également possibles.<sup>147</sup> En 2009, Buchwald *et coll.* proposent une nouvelle approche sélective basée sur la technique d'« ipso-nitration », *via* une métallo-catalyse.<sup>148</sup> Malgré leurs efficacités relatives, la réaction de nitration présente encore des limitations, comme une faible sélectivité ainsi qu'une dépendance aux substrats très marquée.

De plus, la nitration des pyrazines reste à ce jour un sujet très peu étudié. Illig *et coll.* ont réalisé la nitration d'une pyrazine à l'aide du tétrafluoroborate de nitronium, conduisant à l'obtention de la nitropyrazine correspondante avec un très faible rendement de 8% (*Schéma 80.a*).<sup>149</sup> Le groupe d'Hartman parvient quant à eux à obtenir le groupement nitro sur les pyrazines par oxydation de la dimethylsulfilimine (*Schéma 80.b*).<sup>150</sup>



**Schéma 80** : Synthèse de nitro-pyrazines, précédents de la littérature.

#### b) Nos résultats : la nitration de la pyrazine

##### ➤ Approche 1

Très logiquement, nous avons commencé par appliquer à nos substrats la méthode décrite par Hartman consistant à introduire le nitro à partir de la diméthylsulfilimine, cette dernière pouvant être obtenue à partir de l'amine correspondante (*Schéma 81*).

<sup>147</sup> (a) Olah, G. A., Orlinikov, A., Oxyzoglou, A. B. & Prakash, G. K. S. Nitration of Strongly Deactivated Aromatics with Superacidic Mixed Nitric-Triflatoboric Acid (HNO<sub>3</sub>/2CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H-B(O<sub>3</sub>SCF<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). *J. Org. Chem.* **60**, 7348–7350 (1995). (b) Olah, G. A., Fung, A. P., Narang, S. C. & Olah, J. A. Aromatic substitution. 48. Boron trifluoride catalyzed nitration of aromatics with silver nitrate in acetonitrile solution. *J. Org. Chem.* **46**, 3533–3537 (1981). (c) Olah, G. A., Narang, S. C., Olah, J. A., & Lammertsma, K. Recent aspects of nitration: New preparative methods and mechanistic studies (A Review); *Proc. Natl Acad. Sci.*, **79**, 4487–4494, (1982)

<sup>148</sup> Fors, B. P. & Buchwald, S. L. Pd-Catalyzed Conversion of Aryl Chlorides, Triflates, and Nonaflates to Nitroaromatics. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 12898–12899 (2009).

<sup>149</sup> Illig, C. R. *et al.* Discovery of novel FMS kinase inhibitors as anti-inflammatory agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **18**, 1642–1648 (2008).

<sup>150</sup> Hartman, G. D. 2,6-disubstituted derivatives of 3-nitropyrazines useful as adjuncts to radiation therapy. US4609659 (A)

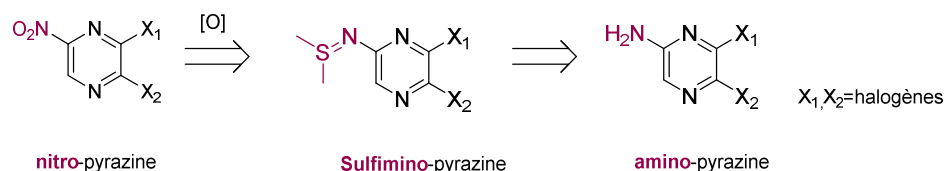
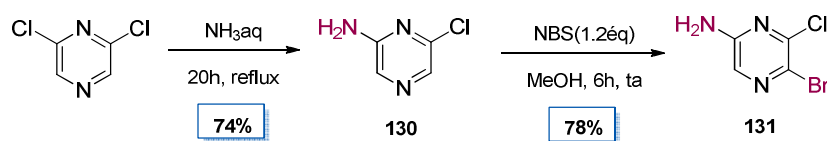
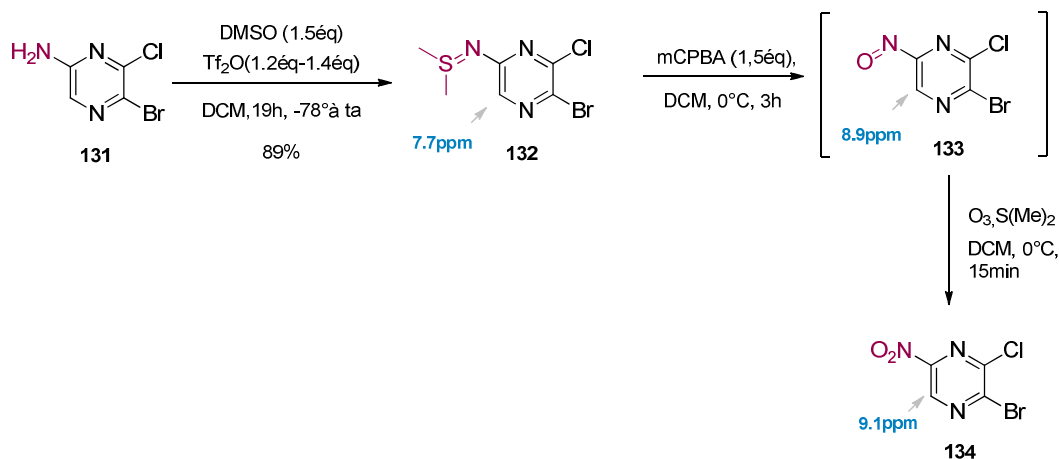


Schéma 81 : Rétrosynthèse du dihalogéno- nitropyrazine.

En se basant sur les travaux de Collins et *coll.*, nous avons synthétisé la 2-amino-pyrazine dihalogéné (**131**) en deux étapes (Schéma 82).<sup>151</sup> La première étape est une substitution sélective d'un halogène de la 2,6-dichloropyrazine en présence d'ammoniaque (solution à 28%v/v). L'intermédiaire (**130**) est ensuite engagé dans la réaction de bromation en présence de *N*-bromosuccinimide. Le composé souhaité (**131**) est obtenu avec un rendement global de 58%.

Schéma 82 : Synthèse du 2-amino-5-bromo-6-chloropyrazine(**131**).

La sulfilimine (**132**) est obtenue par traitement de l'amine (**131**) précédemment obtenue avec du diméthylsulfoxyde activé par l'anhydride triflique (Schéma 83). L'étape suivante est une mono oxydation en présence du mCPBA dans le dichlorométhane. La formation du groupement nitroso (**133**) n'a pas pu être confirmée par des analyses de spectroscopie de masse. En revanche, en RMN il est intéressant de constater un déplacement du signal du proton pyrazinique de 7,7ppm à 8,9ppm.

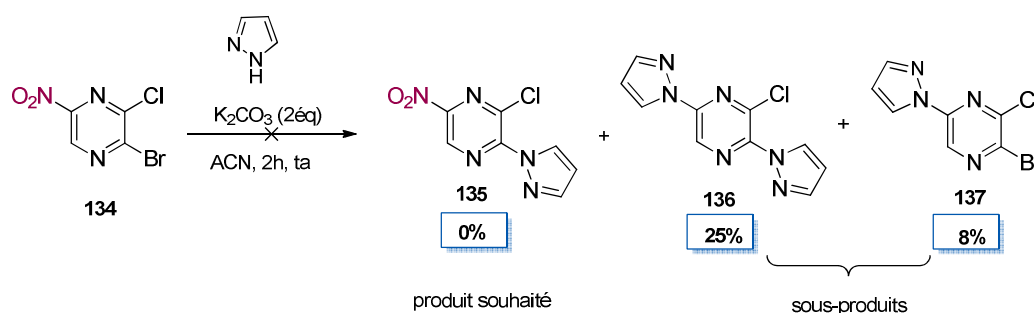
Schéma 83 : Synthèse du nitro-pyrazine (**134**).

<sup>151</sup> Collins I., Lainchbury, M., Matthews, T. P. & Reader, J. C. 5-(pyridin-2-yl-amino)-pyrazine-2-carbonitrile compounds and their therapeutic use. (2013) WO2013068755 (A1)

La dernière étape est l'oxydation du groupement nitroso par ozonolyse en présence de diméthylsulfure. Une fois le milieu réactionnel saturé en ozone, la réaction subit un traitement en milieu réducteur et un nouveau composé est isolé. Sur le spectre RMN, nous constatons de nouveau un déplacement chimique du singlet de 8,9 ppm à 9,15 ppm.

Pour prouver la formation de la structure souhaitée nous avons poursuivi la synthèse, avec comme objectif de substituer dans un premier temps le brome par le pyrazole, puis le chlore par l'azoture pour finir avec la thermolyse.

La réaction de substitution nucléophile en présence du pyrazole ne permet pas d'obtenir le composé souhaité. En effet, après 2h de réaction à température ambiante, de nombreux sous-produits sont formés avec deux composés majoritaires. Les diverses analyses montrent la formation du composé (**136**) et (**137**) comme composés majoritaires (*Schéma 84*). Le fort pouvoir nucléofuge du groupement nitro empêche donc toute formation du composé souhaité (**135**).



**Schéma 84** :  $S_NAr$  entre le nitro-pyrazine et le pyrazole.

Par conséquent, une nouvelle voie de synthèse a dû être envisagée.

#### ➤ Approche 2

Cette deuxième approche consiste à introduire le groupement nitro par une substitution électrophile aromatique. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur la réaction de bromation de la pyrazine développée dans le chapitre précédent. L'introduction d'un brome par ce procédé est en effet possible en présence d'une hydrazine protégée avec un groupement trifluoroacetate. L'introduction d'un groupement nitro électrophile a donc été tentée sur le substrat (**111**) (*Schéma 85*).

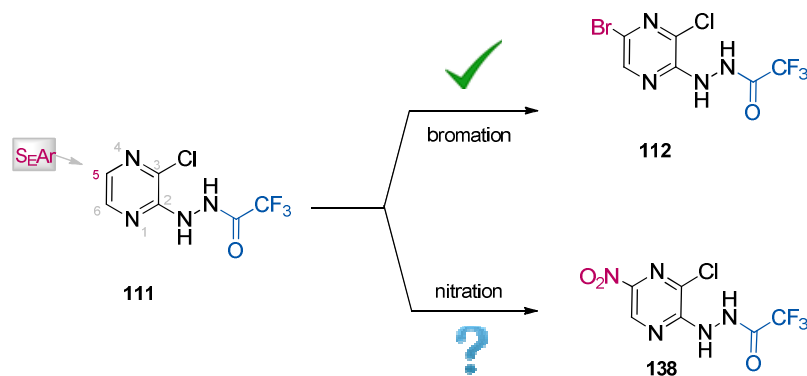


Schéma 85 : Fonctionnalisation de la position 5 de la pyrazine(111).

Par cette voie réactionnelle, le composé (138) serait engagé dans la voie de synthèse détaillée dans le Schéma 86. Selon cette stratégie, l'intermédiaire (139) serait obtenu par déprotection du groupement trifluoroacétate suivie d'une réaction de Knorr pour former le pyrazole (140). Enfin, la substitution nucléophile aromatique du chlore par l'azoture et la thermolyse permettraient d'accéder au 7-nitro-PyTAP souhaité (129).

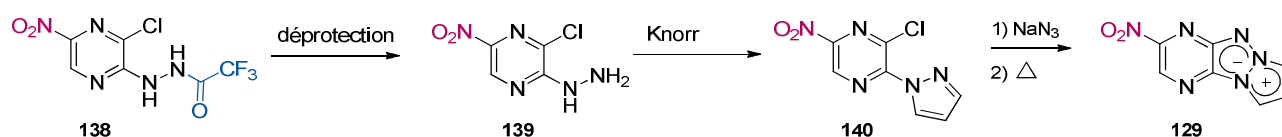


Schéma 86 : Schéma général de synthèse du composé (129).

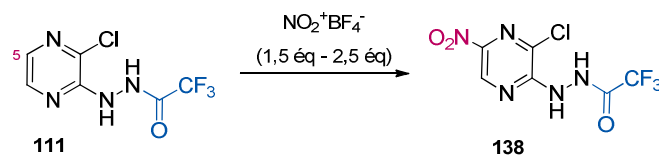
#### - Nitration de la pyrazine par $S_EAr$

Nous avons choisi le tétrafluoroborate de nitronium comme agent de nitration, il a été utilisé pour réaliser des nitrations des composés aromatiques dans des conditions plus douces que celles employées lors de l'application de procédés traditionnels (Illig et coll.). Il est important de noter que le trifluoroborate de nitronium est un réactif commercial qui est disponible à l'état solide ou en solution dans le sulfolane.

Le solvant étant un facteur déterminant dans la réalisation de cette réaction, nous avons décidé d'étudier son influence précise. La réaction est réalisée dans trois solvants couramment utilisés lors des réactions de nitrations : acétonitrile, diméthylsulfoxyde, et le sulfolane contenant le sel de nitronium (Tableau 22).



Tableau 22 : Nitration de la pyrazine (111).



Entrée	$\text{NO}_2^+ \text{BF}_4^-$	solvant	$T(^{\circ}\text{C})$	temps	conversion	$\eta$
1	Solide	ACN	0°C à ta	18h	dégradation	/
2	Solide	DMSO	0°C à ta	18h	dégradation	/
3	Dans le Sulfolane (0.3-0.5M)	/	0°C à ta	8h	totale	27%

Les résultats montrent clairement que le seul moyen permettant un accès au composé (138) est d'utiliser le tétrafluoroborate de nitronium dans le sulfolane (*entrée* 3). Afin d'améliorer ce faible rendement de 27%, une série d'optimisation a été menée, par la modification de la concentration, la température, le temps de réaction, ou l'ajout de co-solvant comme l'acétonitrile. Cependant, ces nombreux efforts se sont montrés infructueux car le meilleur rendement obtenu n'est que de 31%.

- *Déprotection du groupement trifluoroacétate*

Malgré ce résultat décevant, nous avons continué la synthèse avec l'étape de déprotection du groupement trifluoroacétate. Quelques méthodes couramment employés sont représentées dans le Schéma 87.<sup>129</sup>

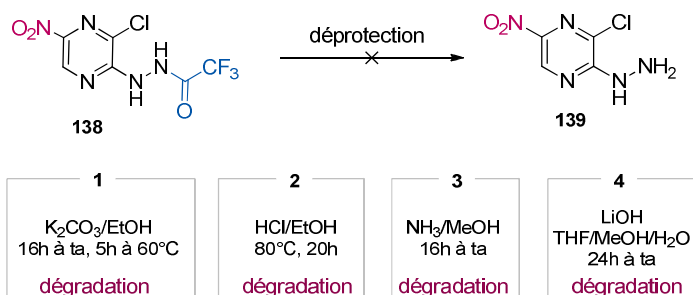


Schéma 87 : Déprotection du groupement trifluoroacétate.

En milieu acide ou basique, les conditions de déprotection utilisées mènent majoritairement à de la dégradation. Dans quelques cas, le produit déprotégé fut identifié par spectroscopie de masse, mais il s'est dégradé durant les divers traitements ultérieurs. Cette dégradation très marquée pourrait être due à une forte réactivité du groupement nitro et/ou à une instabilité de la pyrazine, trop désactivée par la présence de ce groupement attracteur.

Malgré les résultats intéressants obtenus lors des nitrations de pyrazines, l'incapacité à stabiliser l'hydrazine formée rend cette voie de synthèse inadéquate. Il serait intéressant de

remplacer le trifluoroacétate par un autre autre groupement protecteur plus labile, qui pourrait aussi permettre un meilleur rendement de nitration.

### Conclusion

Dans cette partie, nous nous étions fixés deux objectifs : la synthèse du 4-amino-pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène (**M<sub>1</sub>**) et au 7-nitro-PyTAP (**M<sub>2</sub>**) (Figure 132). Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse du dérivé aminé. Ainsi durant ce projet une méthode originale a été mise au point permettant d'accéder à l'analogue du composé **M<sub>1</sub>**, le composé (**123**), comportant un méthyle en C<sup>2</sup> et une morpholine en C<sup>4</sup>. Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse de l'analogue nitré du triazapentalène tricyclique. Durant les études d'optimisation, nous avons développé une nouvelle méthode de nitration des pyrazines. En revanche, le faible rendement de nitration et de difficultés de synthèse induites sur les étapes suivantes n'ont pas permis l'obtention du composé (**129**).

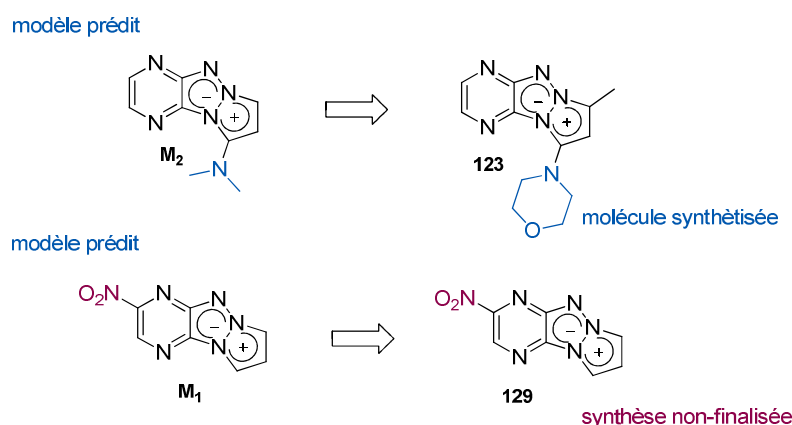
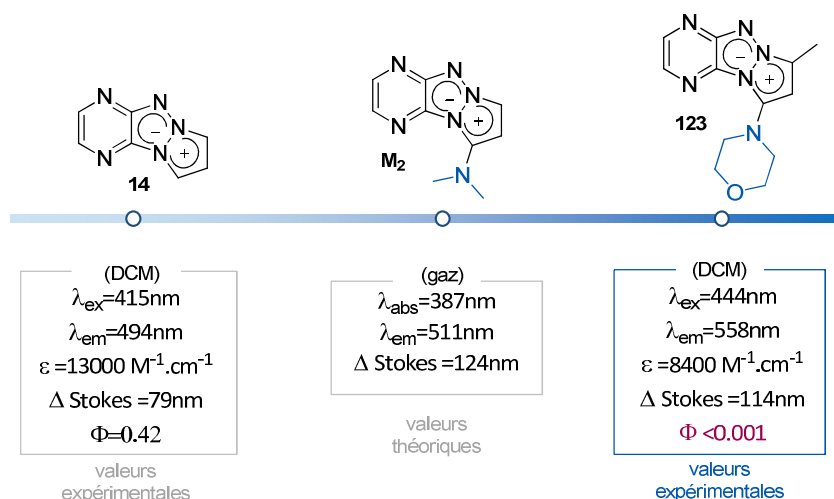


Figure 132 : Les deux structures envisagées.

Malgré l'échec de la synthèse du composé (**129**), il apparaît toutefois intéressant d'évaluer la fluorescence du composé (**123**) et de comparer le résultat obtenu avec les valeurs théoriques.

### 2.3. Analyse photophysique du composé (123)

Comme il a été mentionné lors de l'évaluation théorique, la fonctionnalisation du pyrazino-triazapentalène avec une diméthylamine en position C<sup>4</sup> permet d'avoir un léger effet bathochrome. L'analyse spectrophotométrique du composé (**123**) dans le dichlorométhane confirme ce résultat, car la fonctionnalisation du noyau azolique avec un méthyle et une morpholine respectivement greffés en C<sup>2</sup> et C<sup>4</sup> permet d'augmenter la longueur d'onde d'émission de 64 nm par rapport au composé de référence PyTAP (composé **14**), soit 558 nm (Figure 133).



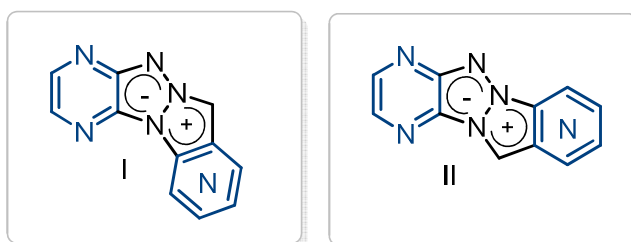
**Figure 133** : Comparaison des valeurs expérimentales et théoriques des 4-amino-triazapentalènes.

La valeur du déplacement de Stokes est de 114 nm, du même ordre de valeur que la valeur calculée pour la structure  $M_2$ . En revanche, ces modifications structurales conduisent à une perte quasi-totale des propriétés de fluorescence du noyau triazapentalène. En effet, un signal très faible de fluorescence est détecté avec un rendement quantique inférieur à 0,1%. Il serait intéressant de savoir si la présence morpholine est la seule responsable de l'inhibition de la fluorescence, ou si le groupement méthyle présent joue également un rôle sur cet effet.

Au final, si la méthode de calcul s'est avérée très efficace, une de ces limitations induites par ce modèle est l'incapacité à prédire le caractère fluorescent des molécules. A ce stade, le seul moyen de prédire efficacement la fluorescence de ces composés passe par leurs synthèses, en s'appuyant toutefois sur les méthodes de calculs théoriques pour chercher les structures susceptibles d'émettre dans les grandes longueurs d'onde comme le domaine du proche infrarouge.



Partie C : Synthèse de nouveaux fluorophores polycycliques  
analogues du 1,3a,6a-triazapentalène





## Chapitre 1 : Etude de la conjugaison sur le noyau pyrazino-triazapentalène

Ayant déjà en possession plusieurs fluorophores émettant dans le vert et le jaune, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux dérivés émettant dans le rouge pour des utilisations dans les applications biologiques. Un tel effet bathochrome ayant été insuffisant sur la base des groupes fonctionnels introduits précédemment, nous allons chercher à atteindre cet objectif en augmentant la conjugaison du système  $\pi$ .

L'équipe de Hanan a montré qu'en augmentant la conjugaison des BODIPY par addition d'un benzène fusionné, il est possible d'obtenir un effet « push-pull » renforcé qui induit un fort effet bathochrome.<sup>152</sup> Cette modification structurale leur a permis d'obtenir une série de fluorophores performants émettant dans le proche infrarouge. Motivés par ce résultat, et ayant pour objectif d'obtenir des sondes plus performantes, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouvelles sondes polyconjuguées. Ainsi, la modulation la plus appropriée pour atteindre l'objectif serait d'apporter une conjugaison supplémentaire aux PyTAPs développés précédemment, par l'introduction de cycles aromatiques supplémentaires fusionnés d'un côté ou de l'autre du tricycle (Figure 134).

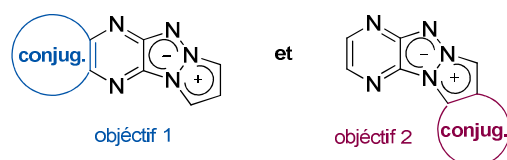


Figure 134 : Structures générales polycycliques visées.

### 1. Objectif 1 : Pyrazines conjuguées

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la synthèse des systèmes tétracycliques ou pentacycliques fusionnés dont les structures sont schématisées dans le Schéma 88. Afin de suivre la voie de synthèse bien établie et efficace pour la formation du motif PyTAP, il est nécessaire de partir de la 2,3-dichloroquinoxaline ( $n=0$ ) et le 2,3-dichloro(benzo)quinoxaline ( $n=1$ ) ( $n$  = nombre de cycles benzéniques fusionnés à la quinoxaline).

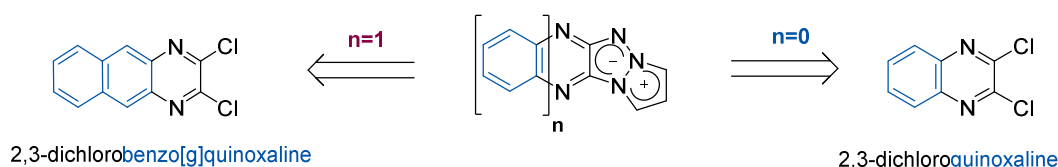


Schéma 88 : Structure des triazapentalènes polycycliques envisagés.

<sup>152</sup> Bessette, A. *et al.* Non-symmetric benzo[b]-fused BODIPYs as a versatile fluorophore platform reaching the NIR: a systematic study of the underlying structure–property relationship. *Dalt. Trans.* **45**, 7589–7604 (2016).

Dans le but de confirmer ou d'infirmer un éventuel effet bénéfique de cette conjugaison, seuls quelques exemples seront synthétisés, et leur évaluation photophysique sera immédiatement réalisée.

### 1.1. Synthèse du quinoxaline-1,3a,6a-triazapentalène

La 2,3-dichloroquinoxaline (**141**) a été synthétisée *via* une double chloration selon les conditions mises aux points par Romer.<sup>153</sup> Cette première étape a été réalisée en présence d'une quantité équimolaire de chlorure de thionyle et d'une quantité catalytique de DMF, à partir de la 2,3-dihydroxyquinoxaline commerciale (*Schéma 88*).

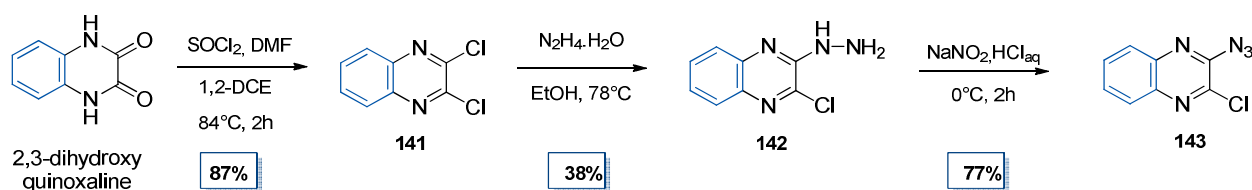


Schéma 89 : Synthèse de la 2-azido-3-chloroquinoxaline (**143**).

L'étape suivante consiste en une substitution sélective d'un halogène par l'hydrazine, pour fournir le composé (**142**). Contrairement au cas de la pyrazine simple, nous observons ici la formation de deux isomères mono- et disubstitué. Une purification sur colonne de gel de silice permet d'isoler l'isomère (**142**) avec un rendement de 38%. L'azoture bicyclique (**143**) est obtenu dans les conditions habituelles avec un rendement de 77%.

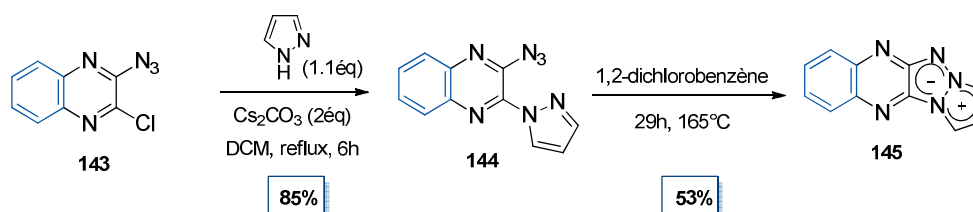


Schéma 90 : Formation du tétracycloquinoxaline-1,3a,6a-triazapentalène (**145**).

Le traitement du composé (**143**) avec du pyrazole permet d'accéder avec un très bon rendement à l'intermédiaire (**144**) (*Schéma 90*). Contrairement à la série pyrazine, cet intermédiaire a pu être isolé avec une très haute pureté après seulement une extraction liquide/liquide. Enfin, l'étape de thermolyse qui nécessite ici un temps de réaction plus long a permis de former le composé (**145**) avec un rendement satisfaisant.

<sup>153</sup> Romer, D. R. Synthesis of 2,3-dichloroquinoxalines *via* Vilsmeier reagent chlorination. *J. Heterocycl. Chem.* **46**, 317–319 (2009).



## 1.2. Synthèse du benzo[g]quinoxaline-1,3a,6a-triazapentalène

La synthèse du deuxième composé polycyclique a été réalisée dans le cadre d'un programme de maturation avec le Dr. Régis Delatouche. Cette synthèse débute avec le traitement du 2,3-diaminonaphtalène avec un excès de diéthyl oxalate pour obtenir la 2,3-dihydroxyquinoxaline (**146**) (*Schéma 91*). L'intermédiaire dichloré (**147**) est obtenu par réaction avec un excès de trichlorure de phosphore. Ce dernier est engagé dans deux étapes de substitutions nucléophiles aromatiques successives. Le pyrazole est tout d'abord introduit, suivi de l'azoture pour générer le composé (**149**) avec un rendement de 20% sur les deux étapes. L'ultime étape de thermolyse nécessite également un temps de réaction plus long et une température supérieure à 165°C pour générer le nitrène. Ainsi, la consommation totale de l'azoture est constatée après 24h de réaction à 180°C.

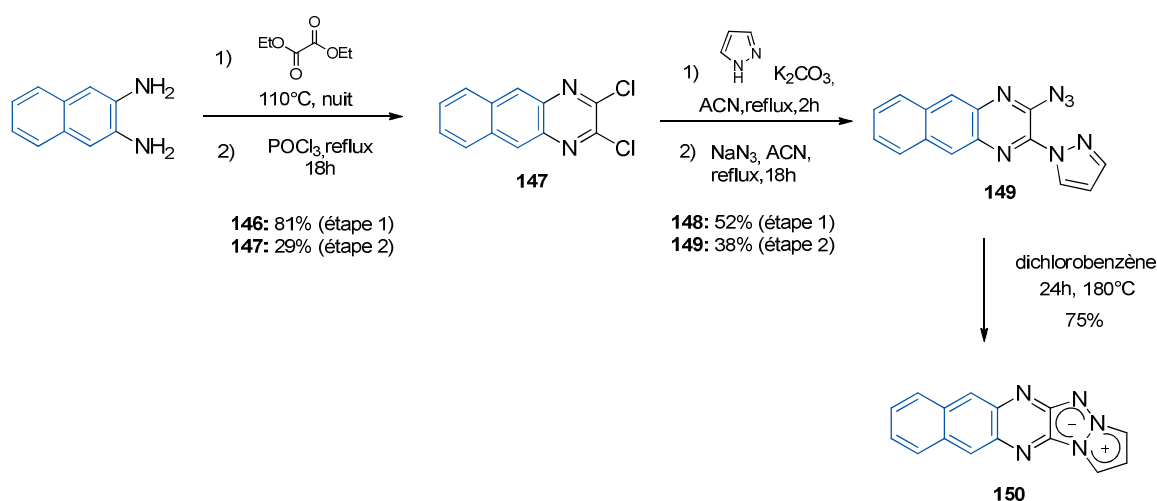


Schéma 91 : Formation du benzo[g]quinoxaline-1,3a,6a-triazapentalène (**150**).

## 2. Objectif 2 : azoles conjugués

Par la suite, nous nous sommes focalisés sur le deuxième objectif consistant à augmenter la conjugaison au niveau du noyau azolique terminal. Ceci revient à remplacer les pyrazoles utilisés dans les réactions de  $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$  par des indazoles ou benzotriazoles. Leurs insertions respectives sur la 2-azido-3-chloropyrazine (**16**) se fait *via* la méthode décrite précédemment et schématisé ci-dessous (*Schéma 92*).

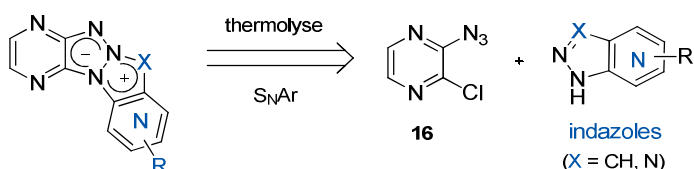


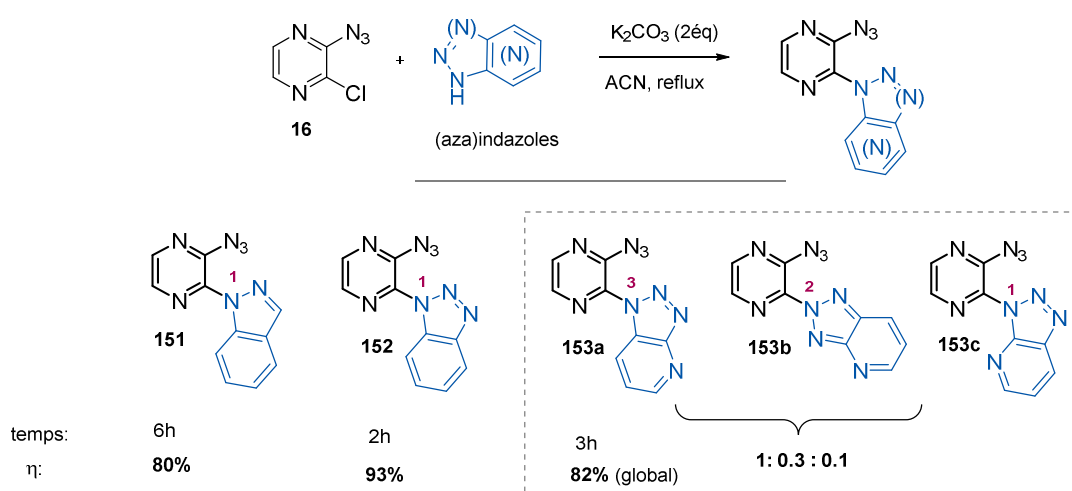
Schéma 92 : Voie rétrosynthétique avec l'utilisation d'indazoles.

## 2.1. Utilisation des indazoles et aza-indazoles non substitués

Pour commencer, les noyaux indazoles et (aza)indazoles ont été utilisés pour synthétiser quelques molécules d'intérêt comme preuve de concept. Pour ce faire, nous avons suivi le schéma synthétique général décrit précédemment.

### a) Substitution nucléophile aromatique

Nous avons tout d'abord opté pour l'utilisation de l'indazole et de ses deux analogues azotés commerciaux : le benzotriazole et la 1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridine (ou 7-azabenzotriazole). Les résultats issus de la réaction de substitution réalisée dans les conditions classiques développées précédemment sont présentés dans le *Schéma 93*.



**Schéma 93** : Intermédiaires aux triazapentalènes conjugués dans la série indazoles.

Lorsque l'indazole et le benzotriazole sont utilisés comme espèces nucléophiles, les produits correspondants (**151**) et (**152**), sont obtenus sous la forme d'un seul isomère. Dans les deux cas, seulement les isomères N<sup>1</sup> sont obtenus avec d'excellents rendements, leurs structures étant confirmées par analyse RMN.

Une perte de sélectivité est en revanche observée en utilisant la 1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridine comme nucléophile. La présence d'un azote supplémentaire sur la position C<sup>7</sup> du benzotriazole, induit la formation d'un isomère majoritaire et de deux minoritaires dans un rapport de 1 : 0,3 : 0,1 (*Schéma 93*, exemple **153**) avec un rendement global de 82%. Etant donné la complexité du spectre RMN de ce mélange, il a été impossible de distinguer les trois formes et d'identifier quelle est la forme majoritaire. De plus, les tentatives de séparation sur silice ont échoué car les composés sont non seulement très polaires, mais sont aussi caractérisés par de rapports frontaux quasi identiques. Pour cette raison le mélange brut a été directement engagé dans l'étape de thermolyse. Notons cependant que, dans certains cas reportés dans la littérature traitant de la réactivité du 7-

azabenzotriazole, la *N*-arylation de ce composé *via* des réactions de substitutions conduit essentiellement à la formation de l'isomère N<sup>3</sup>.<sup>154</sup>

### b) Thermolyse

La thermolyse des composés (**151**) et (**152**) a permis de générer les triazapentalènes tétracycliques correspondants avec d'excellents rendements (*Schéma 94*).

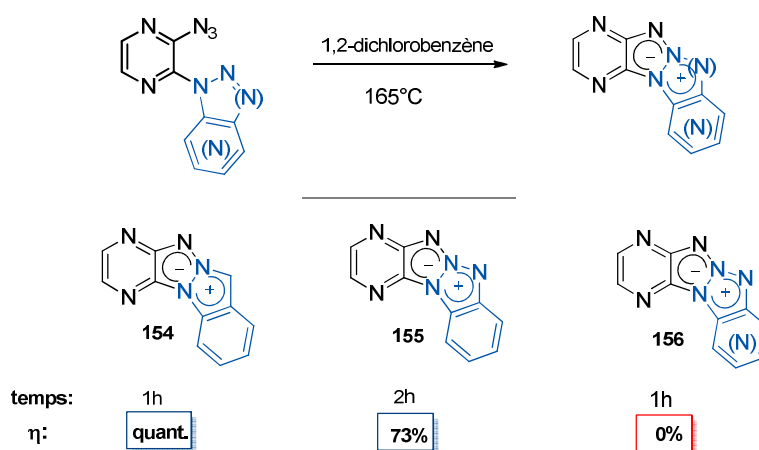


Schéma 94 : Exemples de tétracycles coulés.

Les deux composés (**154**) et (**155**) sont très stables et faciles à purifier. Quant à la thermolyse du mélange des 3 isomères (**153a-c**), les premiers résultats sont moins encourageants. En effet, le suivi de la réaction montre bien la consommation des trois isomères après seulement 1h de réaction, cependant la plaque CCM révèle la formation d'une grande quantité de sous-produits fluorescents et non fluorescents. L'analyse par LC/MS confirme la présence des structures voulues, malheureusement à l'état de traces. Parmi la multitude de signaux présents sur le chromatogramme, quelques pics majoritaires se distinguent et possèdent la signature d'un composé dichloré. Des analyses approfondies montrent que deux sous-produits (**157a**) et (**157b**) issus de l'interaction du solvant avec le nitrène sont obtenus avec un rapport de 1:1, déterminé par RMN du proton (*Schéma 95*). Ceux-ci sont aussi observés en chauffant à 130 °C de manière thermique ou par irradiation aux micro-ondes.

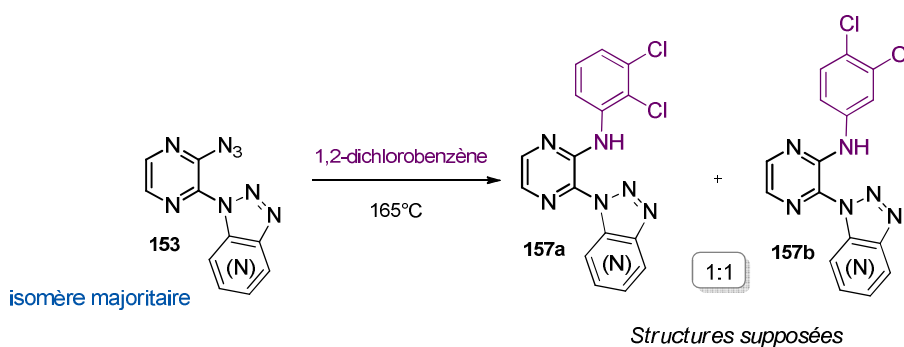
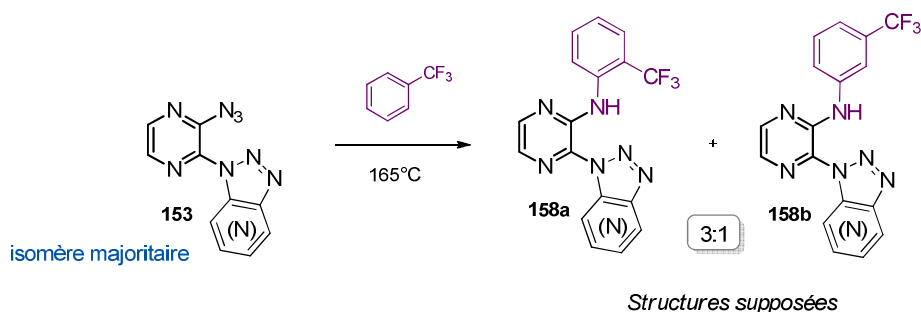


Schéma 95 : Réactivité du composé (**153**) avec le dichlorobenzène.

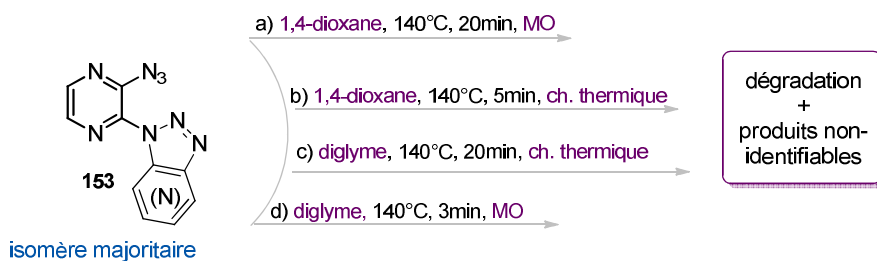
<sup>154</sup> Balachari, D. & Trudell, M. L. Synthesis of new dipyridotetraazapentalenes. *Tetrahedron Lett.* **38**, 8607–8610 (1997).

Afin de limiter la formation de ces sous-produits, nous avons remplacé le 1,2-dichlorobenzène par le trifluorotoluène, un solvant à haute point d'ébullition et *a priori* moins réactif vis-à-vis du nitrène. Surprenamment, nous constatons à nouveau la présence de deux sous-produits issus de la réaction avec le solvant, ce résultat a été confirmé en masse et par RMN avec un rapport RMN de 3:1 (*Schéma 96*).



**Schéma 96** : Réactivité du composé (**153**) et le trifluorotoluène.

Nous avons également remplacé le solvant aromatique par d'autres solvants classiquement utilisés dans des réactions de thermolyse, comme le dioxane et le diglyme. Nous avons également essayé différents moyens de chauffage, par micro-ondes ou chauffage classique, se soldant par une incapacité à interpréter correctement les résultats expérimentaux (*Schéma 97*). Face à ces résultats infructueux, nous avons abandonné l'étude de ce composé.



**Schéma 97** : Essais de cyclisation de l'isomère majoritaire (**153**).

### c) Thermolyse au micro-ondes

Afin d'améliorer les temps de réaction, nous avons voulu tester la faisabilité de cette dernière étape avec une activation aux micro-ondes. Nous avons choisi l'intermédiaire (**151**), dont la thermolyse dans les conditions classiques permet d'obtenir le composé final avec un rendement quantitatif en 1h dans le 1,2-dichlorobenzène (voie a, *Schéma 98*)

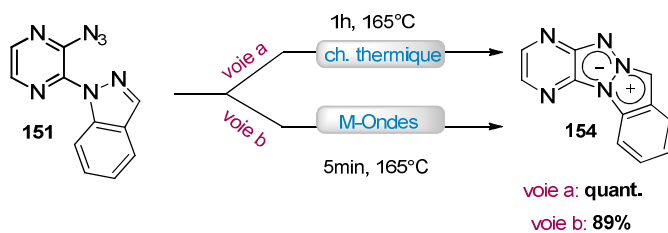


Schéma 98 : Thermolyse au micro-ondes.

La même réaction menée par irradiation micro-ondes (voie b), en respectant les mêmes conditions (température, concentration, solvant) conduit à une conversion totale en moins de 5 minutes. La réaction a été lancée sur une millimole et nous n'avons rencontré aucun problème de suppression, malgré la libération du diazote. Le rendement obtenu est légèrement inférieur à celui obtenu *via* la méthode classique, néanmoins le gain considérable de temps compense cette perte.

### 3. Analyses photophysiques : effet de la conjugaison

A ce stade, nous avons mesuré les propriétés spectroscopiques des différents composés afin d'évaluer leur potentiel en tant que fluorophore.

#### a) Pyrazine conjuguée

La caractérisation photophysique du quinoxaline-1,3a,6a-triazapentalène (**145**) a été réalisée dans le DMSO.

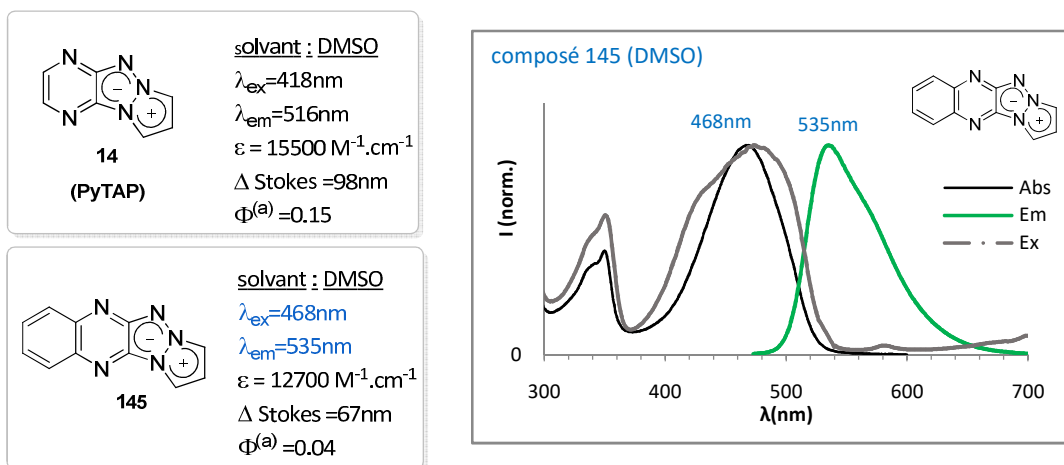
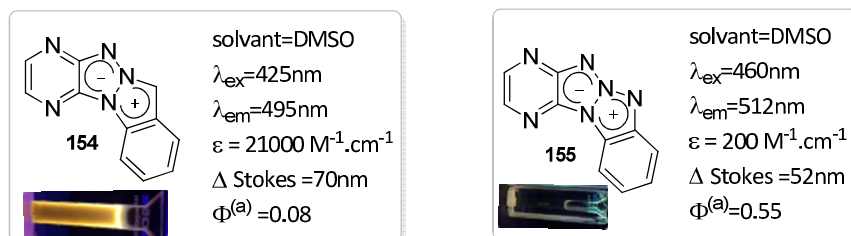


Figure 135 : Propriétés photophysiques du quinoxaline-1,3a,6a-triazapentalène.<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « Coumarine 153 » avec  $\lambda_{ex}$ =425nm et 460nm,  $\Phi$ =0,38 dans l'EtOH.

Comme espéré, l'augmentation de la conjugaison des PyTAP a produit un effet bathochrome de 50 nm sur la longueur d'onde d'absorption et de 20 nm sur celle d'émission. En revanche, contrairement aux attentes, la valeur du coefficient d'extinction molaire baisse d'environ 18%, et le rendement quantique chute à 4% dans le DMSO (et à 5% dans l'éthanol) contre 15% pour le PyTAP.

## b) Azoles conjugués

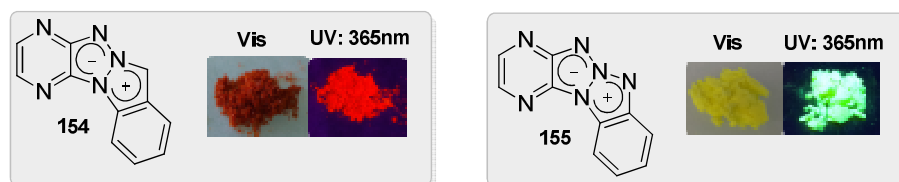
Contrairement à l'utilisation de pyrazines conjuguées, la présence de l'indazole ou benzotriazole ne permet pas l'obtention de l'effet bathochrome recherché. (Figure 137).



**Figure 136 :** Propriétés photophysiques des composés (154) et (155); <sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « Coumarine 153 » avec  $\lambda_{ex}$ =425nm et 460nm,  $\Phi$ =0,38 dans l'EtOH.

Dans le cas du composé (155), il est constaté un léger effet bathochrome sur la longueur d'onde d'absorption, la valeur du  $\lambda_{em}$  restant identique à celle du composé tricyclique de référence (PyTAP). Pour le composé (154), la longueur d'onde d'émission diminue de 21 nm. Un effet positif est cependant constaté dans le cas du dérivé (154) avec un coefficient d'extinction molaire nettement amélioré. A l'opposé, son analogue azoté (155) est caractérisé par une valeur de coefficient d'extinction molaire très faible. Dans ce cas, même si le rendement quantique de cette deuxième molécule est de 55%, la valeur de la brillance est au final très faible.

Contrairement au composé tricyclique de référence PyTAP (14), les deux structures tétracycliques sont caractérisées par une fluorescence à l'état solide (Figure 138).



**Figure 137 :** Fluorescence à l'état solide des structures tétracycliques à la lumière visible et sous irradiation UV à 365nm.

Par exemple le composé (154), qui soumis à l'irradiation UV (365 nm) montre une fluorescence orange en solution, est orange-rouge fluorescent à l'état solide. En contraste, le tétracycle (155), est caractérisé à l'état solide par une luminescence blanche-verte intense. Le composé (155) fait preuve d'une particularité peu commune chez les fluorophores, à savoir une forte fluorescence à l'état solide, fortement minorée en solution.

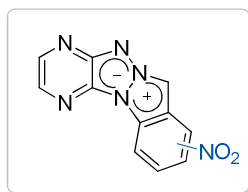
## 4. Utilisation des indazoles substitués

A la vue des résultats photophysiques des composés, il apparait clairement que le potentiel du noyau comportant un indazole (154) est plus intéressant à exploiter. L'introduction des

groupements donneurs ou attracteurs sur le noyau indazolique est envisagée afin de pouvoir moduler le caractère photophysique de cette famille de composés. Par ailleurs, certains groupements pourraient être exploités en tant que groupements post fonctionnalisables (*via* des esters ou des halogènes) ou en tant que groupements pharmacophores (nitro).

#### 4.1. Le cas des nitro-indazoles

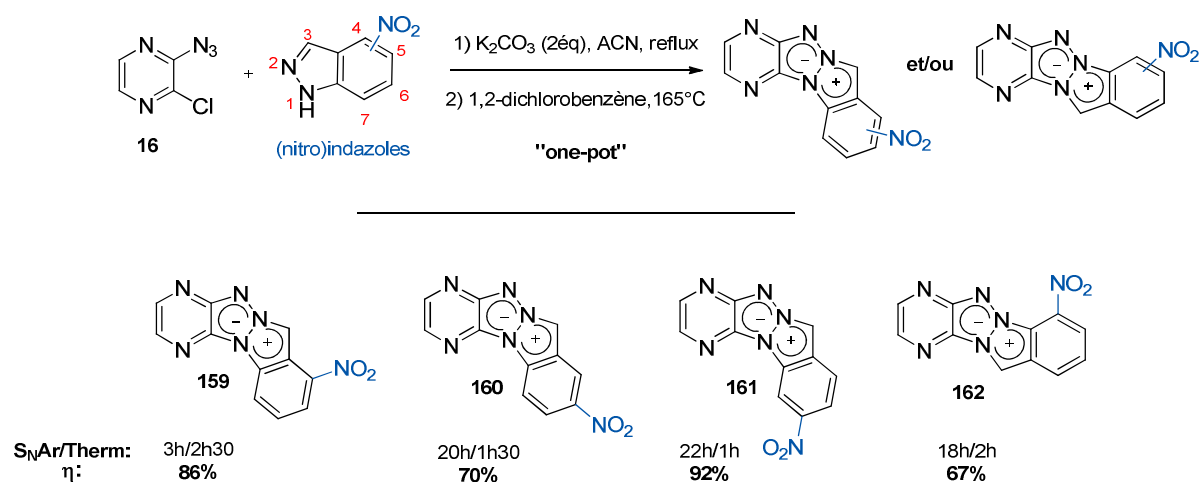
Dans un premier temps, nous sommes intéressés à la synthèse d'analogues tétracycliques du pyrazino-triazapentalène comportant des groupements électroattracteurs ( $-\text{NO}_2$ ) (*Figure 139*).



**Figure 138** : Structure générale visée.

Outre l'intérêt d'évaluer l'effet induit par ces groupements sur les propriétés spectroscopiques, ces nitro-PyTAP peuvent être étudiées en tant que sonde hypoxie. Dans ce contexte, nous avons établi une collaboration avec l'équipe de Pr. Małgorzata Brindell de l'Université Jagiellonian en Pologne. La synthèse et la caractérisation photophysique des composés nitrés ont été réalisés dans notre laboratoire (dans le cadre d'un stage de master réalisé par Magdalena Maciuszek) et les tests d'évaluation des fluorophores nitrés sur des tissus hypoxies ont été réalisés dans l'équipe de chimie de coordination et bioorganique à l'Université Jagiellonian.

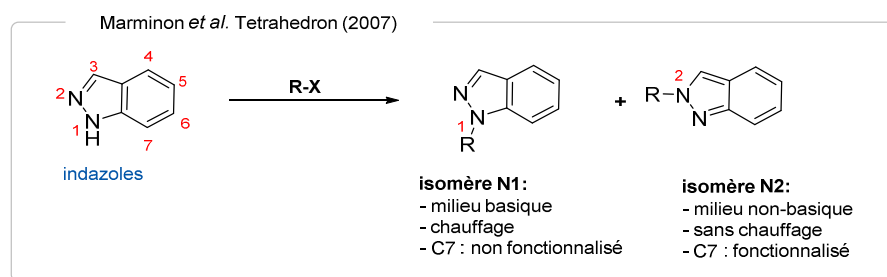
Les composés d'intérêt ont été synthétisés à partir de nitroindazoles (commerciaux ou synthétisés au laboratoire), en présence du 2-azido-3-chloropyrazine (**16**) (*Schéma 99*).



**Schéma 99** : Synthèse de nitro-PyTAP tétracycliques.

Dans le cas du composé (**159**), le 4-nitroindazole de départ a été synthétisé à partir de la 2-méthyl-3-nitroaniline selon la méthode générale décrite par Hopkins.<sup>155</sup> Dans les autres cas, les nitro-indazoles proviennent de sources commerciales. Dans cette série caractérisée par des structures intermédiaires polaires et difficiles à purifier, l'approche « one-pot » a été la plus appropriée et a permis d'accéder aux produits finaux avec des meilleurs rendements situés entre 67 et 92%.

Il est à noter que dans les quatre cas, la réaction de substitution nucléophile conduit exclusivement à la formation d'un seul isomère (confirmé par RMN du proton). Les analyses spectroscopiques des intermédiaires obtenus ainsi que des produits finaux (basés essentiellement sur le déplacement chimique du proton indazolique de la position C<sup>3</sup>) révèlent la formation des isomères N<sup>1</sup> dans les cas où le groupement nitro se situe sur les positions C<sup>4</sup>, C<sup>5</sup> ou C<sup>6</sup>. A l'opposé, la présence du groupement nitro en position C<sup>7</sup> de l'indazole, impose l'attaque prédominante de l'azote N<sup>2</sup> de l'indazole. Cette hypothèse est en accord avec les données de la littérature qui montrent que dans les conditions basiques sous chauffage, l'attaque de l'azote N<sup>1</sup> est favorisée à l'exception des indazoles substitués en C<sup>7</sup> (Schéma 100).<sup>156</sup> L'isomère N<sup>2</sup> est généralement obtenu lorsque la réaction est conduite en l'absence de base et à basse température.<sup>157</sup>



**Schéma 100** : Cas général – l'indazole et les produits de substitution.

La réactivité du 7-nitroindazole face aux réactions d'alkylation a été étudiée par quelques groupes. Marminon *et coll.* se sont, par exemple, intéressés à la réaction de benzylation du 7-nitroindazole.<sup>157b</sup> Les résultats de cette étude montrent que même en présence d'une base (NaH ou KOH), la forme majoritaire est l'isomère N<sup>2</sup>.

#### 4.2. Le cas de méthyle 1H-indazole carboxylates/bromé/méthoxy

La synthèse de noyaux tétracycliques fonctionnalisés avec des groupements esters méthyliques, halogènes (pour réaliser des couplages) et des éthers méthyliques a ensuite été réalisée. L'ensemble de ces noyaux ont été obtenus en collaboration dans le cadre du projet de maturation du brevet par le Dr. Régis Delatouche. Ces produits ne sont donc pas décrits dans la partie expérimentale, et sont numérotés avec un prime pour les différencier. Contrairement à la synthèse des analogues nitrés, ici la synthèse a été réalisée en deux étapes en utilisant des bases plus

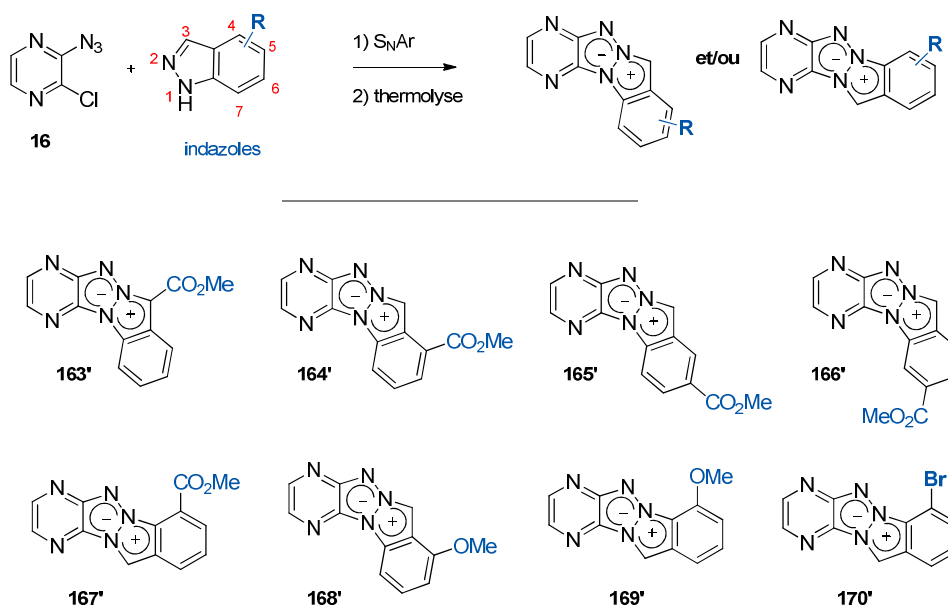
<sup>155</sup> Hancock, D. L. & Hopkins, R. B.. Treating wasting syndromes with aryloxy propanolamines. (2001) WO2001035947 (A2).

<sup>156</sup> Hunt, K. W., Moreno, D. A., Suiter, N., Clark, C. T. & Kim, G. Selective synthesis of 1-functionalized-alkyl-1H-indazoles. *Org. Lett.* **11**, 5054–7 (2009).

<sup>157</sup> (a) Cheung, M., Bloor, A. & Stafford, J. A. Efficient and Regioselective Synthesis of 2-Alkyl-2 H-indazoles. *J. Org. Chem.* **68**, 4093–4095 (2003). (b) Marminon, C., Gentili, J., Barret, R. & Nebois, P. Synthesis of N-benzylated indole-, indazole- and benzotriazole-4,7-diones. *Tetrahedron*. **63**, 735–739 (2007).



fortes (NaOH) pour l'étape de substitution. Les divers produits obtenus sont représentés dans le *Schéma 101*.



**Schéma 101** : Synthèse de méthyle triazapentalène-carboxylates.<sup>158</sup>

Dans tous les cas un seul isomère est obtenu lors de l'étape de substitution nucléophile aromatique. L'utilisation des indazoles fonctionnalisés sur la position C<sup>7</sup> a conduit une nouvelle fois à l'obtention des composés (**167'**, **169'** et **170'**) dont la configuration supposée est linéaire (résultat de l'attaque de l'azote N<sup>2</sup>). Dans tous les autres cas les structures tétracycliques adoptent une configuration coudée (résultat de l'attaque de l'azote N<sup>1</sup> de l'indazole).

Un des arguments très important pour justifier les isomères linéaires ou coudés est le déplacement chimique du proton indazolique (situé en position C<sup>3</sup>) avant cyclisation par thermolyse. Par exemple dans la série comportant les esters méthyliques le déplacement du proton indazolique est de 9,9 ppm avant thermolyse pour le composé (**167'**), alors que dans les autres cas (**163'** : **166'**) cette valeur est comprise entre 8,9 et 9,3 ppm.



#### 4.3. Analyses photophysiques

##### a) Les dérivés nitrés

Les dérivés de la série nitro-indazole ont été analysés en premier. L'ensemble des analyses a été réalisé dans le DMSO, excepté le composé (**159**) qui ne présentait des propriétés de fluorescence que dans le DCM mais pas dans le DMSO (*Tableau 23*).

<sup>158</sup> *Note* : Les méthodes d'accès permettant d'obtenir ces composés sont détaillées dans le brevet traitant sur le sujet des triazapentalènes.

**Tableau 23** : Propriétés photophysiques de nitro-PyTAP tétracycliques.

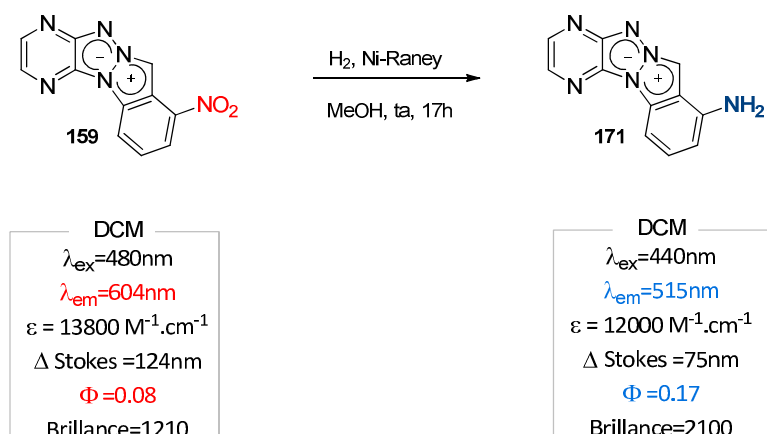
<i>produits</i>	(159)	(160)	(161)	(162)
solvant	DCM	DMSO	DMSO	DMSO
$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	480	419	484	522
$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	604	/	612	/
$\epsilon(\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$	13800	30800	21500	10000
$\Delta$ Stokes (nm)	124	/	128	/
$\Phi^{(a)}$	0.09	/	0.11	/
Brillance	1200	/	2400	/
Couleur <sup>(b)</sup>				

<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est le « *Perylene Red* » avec  $\lambda_{\text{ex}}$  = 480 nm et 484 nm, et  $\Phi=0,96$  dans le  $\text{CHCl}_3$ ; <sup>(b)</sup> les images sont réalisées sur les échantillons solubilisés dans le DCM irradiés à 365nm.

Le résultat obtenu lors des analyses de fluorescence montre clairement que seulement deux produits parmi les quatre analysés sont fluorescents. Il s'agit des composés **(159)** et **(161)** comportant des groupements électroattracteurs sur les positions C<sup>4</sup> et C<sup>6</sup> sur l'isomère coudé. De plus, un fort effet bathochrome sur les longueurs d'onde d'émission est observé avec des valeurs de 604 et de 612 nm, respectivement pour les composés **(159)** et **(161)**. Par conséquent nous obtenons des composés émettant dans le domaine de l'orange et du rouge.

Un autre avantage est le grand déplacement de Stokes qui est respectivement de 124 et de 128 nm. Les coefficients d'extinction molaire sont de 14 000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  pour **(159)** et de 21 500  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  pour le composé rouge **(161)**. Le seul bémol est le rendement quantique encore trop bas.

Dans ce projet nous avons également voulu évaluer le potentiel de fluorescence des analogues aminés de ces structures. Cependant, à cause de problèmes de purification après les étapes de réductions, seul le composé **(171)** obtenu par réduction de son analogue **(159)** a pu être isolé et caractérisé (*Figure 140*).



**Figure 139** : Différence de fluorescence de l'analogue nitro et l'analogue amino.<sup>a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique du (**159**) est le « *Perylene Red* » avec  $\lambda_{ex}=480nm$  et  $484nm$ , et  $\Phi=0,96$  dans le  $CHCl_3$ , et pour le composé (**171**) La référence est la « *Coumarine 153* » avec  $\lambda_{ex}=425nm$  et  $460nm$ ,  $\Phi=0,38$  dans l' $EtOH$ .

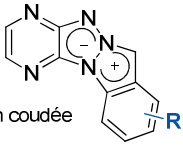
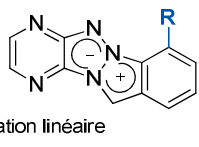
Les résultats obtenus montrent une forte dépendance des propriétés photophysiques avec la nature du groupement présent sur l'indazole. La formation de l'amine permet d'une part, de doubler le rendement quantique de son analogue nitro, et d'autre part d'améliorer la valeur de la brillance. En revanche, cette transformation engendre un effet hypsochrome remarquable, avec une baisse de la longueur d'onde d'excitation de 40 nm, et de 89 nm pour l'émission. La présence d'un système électroattracteur est donc essentielle pour obtenir un effet bathochrome et des longueurs d'onde d'émission plus proche du rouge.

#### b) La fonctionnalisation avec des esters, bromes, et des éthers

Contrairement aux dérivés nitrés, la présence des groupements moins électroattracteurs comme les esters provoquent une baisse significative des propriétés de fluorescence (*Tableau 24, 163' : 167'*). Dans les cinq cas les rendements quantiques sont compris entre 1 et 6% dans le DMSO. Seulement deux composés se démarquent (**168'**) et (**170'**) avec des rendements quantiques respectifs de 25% et de 11%.

Il est intéressant de constater une différence entre les tétracycles coudés et les linéaires. Les résultats montrent clairement que les composés linéaires ont des longueurs d'onde d'émission comprises entre 557 nm et 585 nm, alors que les valeurs des composés coudés ne dépassent pas les 500 nm. L'effet bathochrome est également plus marqué dans le cas des composés linéaires ayant des longueurs d'onde d'excitation allant de 491 nm à 502 nm. Malgré les rendements quantiques et la brillance encore bas, ces résultats montrent clairement le potentiel prometteur des composés linéaires. Ainsi, une fonctionnalisation judicieuse nous permettrait d'atteindre des meilleures structures fluorescentes.

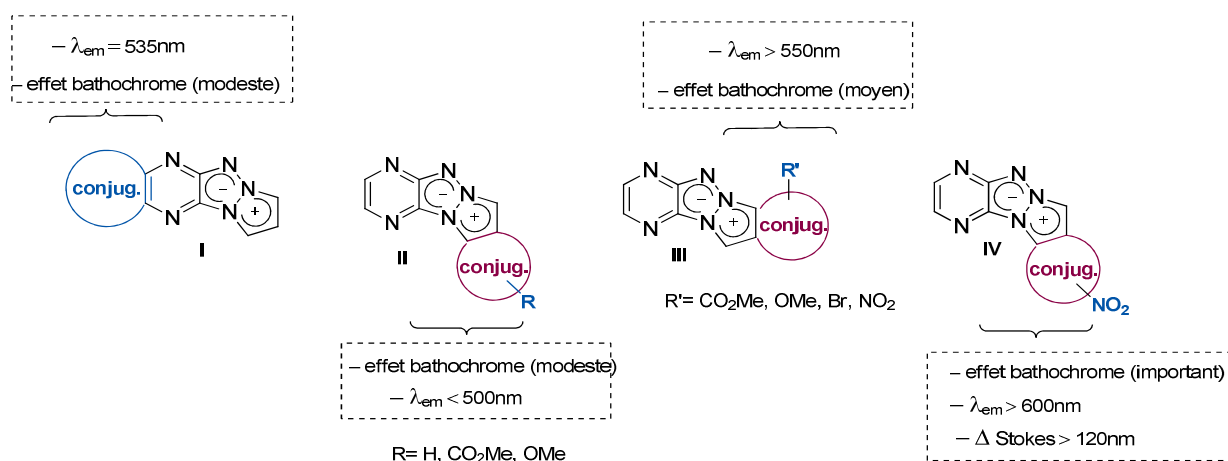
**Tableau 24** : Propriétés photophysiques des analogues du PyTAP tétracycliques.

	 Configuration coudée					 Configuration linéaire		
Produits	(163')	(164')	(165')	(166')	(168')	(167')	(169')	(170')
solvant	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DCM
$\lambda_{ex}(nm)$	438	446	427	447	433	502	492	491
$\lambda_{em}(nm)$	484	486	481	479	504	568	585	557
$\epsilon(M^{-1}.cm^{-1})$	31100	9500	15600	32800	6000	10000	2600	7000
$\Delta$ Stokes (nm)	46	40	54	32	71	64	93	66
$\phi^{(a)}$	0.01	0.01	0.1	0.02	0.25	0.06	0.003	0.11
Brillance	280	110	1600	600	1500	560	9	760

<sup>(a)</sup> La référence pour le calcul du rendement quantique est la « *Coumarine 153* » avec  $\lambda_{ex}=\lambda_{ex}$  des produits, et  $\Phi=0,38$  dans l'EtOH ; <sup>(b)</sup> les images sont réalisées sur les échantillons solubilisés dans le DCM irradiés à 365nm.

### Conclusion et perspectives

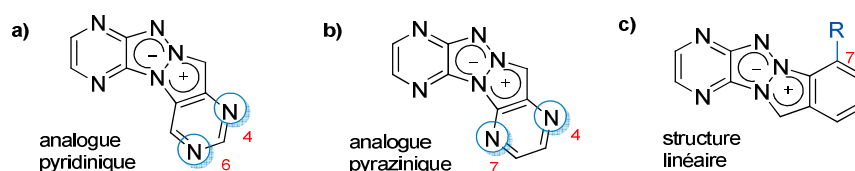
Dans cette partie nous avons montré que l'ajout d'un cycle aromatique fusionné d'un côté ou de l'autre du PyTAP influence le caractère fluorescent du noyau central. Les effets majeurs induits sont résumés dans la *Figure 141*.

**Figure 140** : Effets de la conjugaison sur la fluorescence du noyau PyTAP.

La conjugaison du côté pyrazine (**I**) a permis d'apporter un effet bathochrome non négligeable (de 50 nm sur la valeur de  $\lambda_{ex}$ ), et une augmentation de la valeur de la longueur d'émission de 20 nm. A l'opposé la conjugaison du pyrazole pour donner les structures tétracycliques (**II**) n'a pas permis d'apporter une amélioration des caractéristiques photophysiques. Il est aussi intéressant de noter que les structures tétracycliques linéaires (**III**) peuvent avoir des caractéristiques de fluorescence remarquables, comme un effet bathochrome plus marqué (d'environ 80 nm) associé

à une émission dans la zone de l'orange ou rouge. Enfin, l'accroissement de la conjugaison du côté azolique avec l'ajout de groupements fortement électroattracteurs sur certaines positions permettent d'obtenir des nouveaux fluorophores (**IV**) avec des propriétés photophysiques très intéressantes. Ainsi il a été possible d'obtenir un effet bathochrome considérable (d'environ 60 nm sur la valeur de  $\lambda_{ex}$ ) et des déplacements de Stokes supérieurs à 120 nm. De plus, ces modifications nous ont permis d'atteindre notre objectif qui était de synthétiser des sondes avec de longues longueurs d'onde d'émission supérieures à 600 nm. A travers ces résultats, il en ressort qu'un quatrième cycle appauvri en électrons serait indispensable pour l'obtention de sondes fluorescentes émettant dans le rouge.

Malgré les diverses améliorations spectroscopiques apportées par cette conjugaison, certains paramètres comme le rendement quantique et la brillance restent encore insuffisants. Pour ce faire, quelques nouvelles structures ont été proposées (*Figure 142*).



**Figure 141** : Nouvelles structures visées.

Une des solutions serait de fusionner une pyrimidine avec des azotes sur les positions C<sup>4</sup> et C<sup>6</sup>, des positions qui se sont montrées efficaces dans le cas des groupements nitro (*Figure 142a*). Dans un deuxième temps, en s'appuyant sur nos études précédentes, il semble aussi intéressant d'utiliser des noyaux diazotés de type pyrazine, ayant prouvé être fluorescents dans le cas de pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène (*Figure 142b*). Un dernier objectif envisagé consiste à étudier plus en détails le potentiel fluorescent du système tétracyclique linéaire (*Figure 142c*).



## Chapitre 2 : Synthèse de nouveaux composés tétracycliques fluorescents

La cible retenue est la structure tétracyclique (**172**) comportant deux pyrazines d'un côté et de l'autre du noyau 1,3a,6a-triazapentalène central. Selon la méthode générale de synthèse cette deuxième pyrazine serait apportée par l'utilisation du 4,7-diaza-1H-indazole (**173**) comme espèce nucléophile selon le schéma général suivant (Schéma 102).

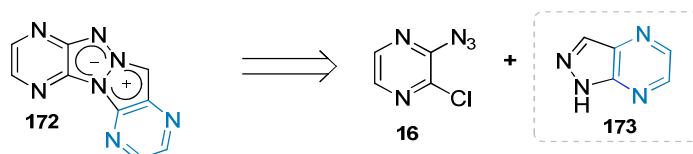


Schéma 102 : Rétrosynthèse du composé (**172**).

### 1. Synthèse du noyau tétracyclique polyazoté (**172**)

#### 1.1. Synthèse du noyau 4,7-diaza-1H-indazole (**173**)

Etant donné la faible disponibilité commerciale de cet indazole azoté, il s'est avéré nécessaire de synthétiser cet intermédiaire au laboratoire. Suivant les données de la littérature,<sup>159</sup> nous avons opté pour la réalisation de cet indazole diazoté en modulant le chemin synthétique proposé par Lin et coll.<sup>160</sup> Ayant pour but d'obtenir un aldéhyde et non une fonction cétone, nous allons utiliser le 1,3-dithiane non méthylé comme réactif de départ.

Selon les conditions décrites précédemment par Torr et coll.,<sup>161</sup> la 2,6-dichloropyrazine est ajoutée à une solution de 1,3-dithiane dans le *n*BuLi, conduisant à la formation sélective du composé souhaité (**174**)<sup>162</sup> avec d'excellents rendements compris entre 72 et 81% (Schéma 103).

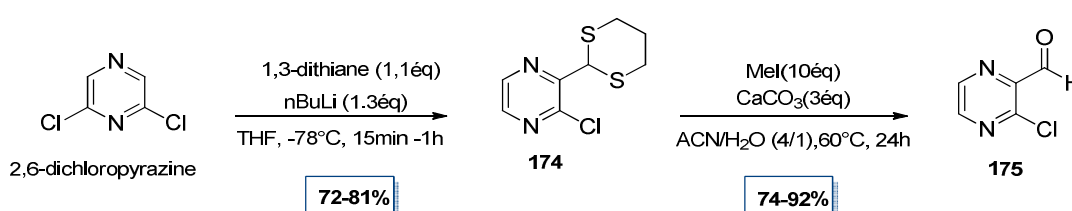


Schéma 103 : Synthèse du 3-chloropyrazine-2-carbaldéhyde (**175**).

<sup>159</sup> (a) Dorn, H. & Dilcher, H. Potential cytostatic agents. XV. Synthesis and methylation of 1H-pyrazolo[3,4-b]pyrazines, a new class of purine antagonists. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **717**, 118-23, (1968). (b) Chien, T. C., Smaldone, R. A., & Townsend, L. B.. Facile synthesis of 1-substituted 4,5-diaminopyrazoles and its application toward the synthesis of pyrazolo[3,4-b]pyrazines. *Tetrahedron Lett.*, **45**(21), 4105-4108, (2004)

<sup>160</sup> Lin, H. et al. 2,3,5-Trisubstituted pyridines as selective AKT inhibitors. Part II: Improved drug-like properties and kinase selectivity from azaindazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20**, 679-683, (2010).

<sup>161</sup> Torr, J. E., Largea, J. M., Hortonb, P. N., Hursthouseb, M. B. & McDonald, E. On the nucleophilic tele-substitution of dichloropyrazines by metallated dithianes. *Tetrahedron Lett.*, **47**, 31-34, (2006)

<sup>162</sup> Suwiński, J. & Świerczek, K. cine- and tele-Substitution reactions. *Tetrahedron*. **57**, 1639-1662 (2001).

Afin d'obtenir l'aldéhyde (**175**), nous avons poursuivi la voie de synthèse avec la déprotection du dithiane. Cette étape est réalisée selon les conditions développées par Cardani.<sup>163</sup> Celle-ci suppose l'utilisation d'un excès d'iodométhane en présence de carbonate de calcium dans un mélange acétonitrile/eau (*Schéma 103*). Le composé instable (**175**) non purifié est directement engagé dans la réaction suivante de cyclisation en présence de l'hydrazine afin de former l'indazole (**173**). Nous avons réalisé une série d'essais en chauffage classique ou par irradiation aux micro-ondes et les conditions optimales sont une irradiation micro-ondes dans un mélange hydrazine/acétonitrile (*Schéma 104*).

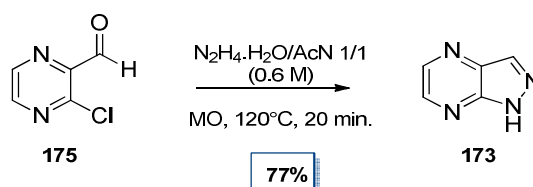


Schéma 104 : Formation de l'indazole (**173**).

## 1.2. Synthèse du triazapentalène d'intérêt (**172**) : les premiers résultats

Une fois la synthèse du composé (**173**) optimisée, l'imidazole diazoté est engagé dans l'étape de substitution nucléophile aromatique en présence de la 2-azido-3-chloropyrazine (**16**) (*Schéma 105*).

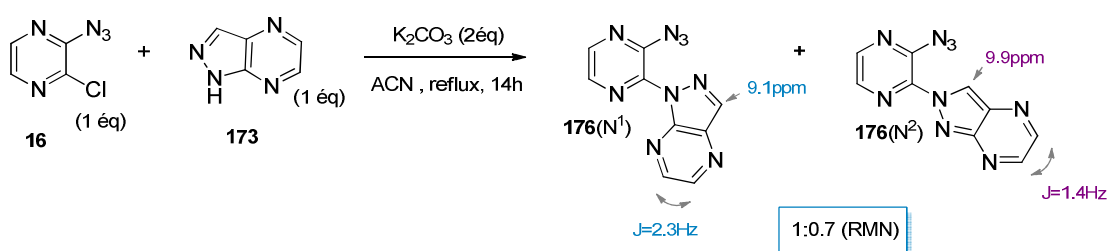


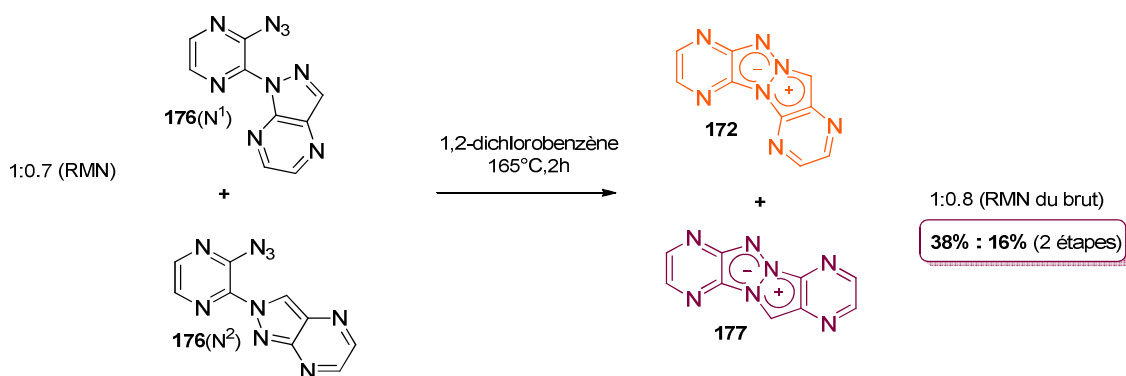
Schéma 105 : S<sub>N</sub>Ar avec le 4,7-diaza-1H-indazole (**173**).

Un suivi par CCM montre une consommation progressive de l'azoture (**16**) et la formation de deux produits avec des R<sub>f</sub> très proches. L'analyse RMN du mélange brut réactionnel montre la présence des deux régioisomères N<sup>1</sup> et N<sup>2</sup> avec un rapport de 1 : 0,7. Le noyau indazole de l'isomère majoritaire est caractérisé par un singulet à 9,1 ppm et de deux doublets avec une constante de couplage de 2,3 Hz. Quant au composé minoritaire, son proton indazolique situé en C<sup>3</sup> est plus déblindé à 9,9 ppm. Les deux doublets pyraziniques de cet indazole sont caractérisés par une constante de couplage plus petite de 1,4 Hz.

La séparation des deux isomères n'ayant pas été possible malgré de nombreux essais, le mélange des deux isomères **176(N<sup>1</sup>)** et **176(N<sup>2</sup>)** est engagé dans l'étape de thermolyse (*Schéma 106*).

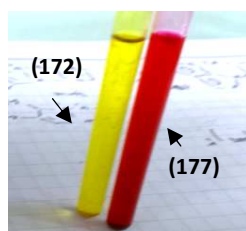
<sup>163</sup> Cardani, S. *et al.* Asymmetric synthesis of functionalized  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxy acids via chiral norephedrine-derived oxazolidines. *Tetrahedron*. **44**, 5563–5572 (1988).





**Schéma 106** : Obtention de deux isomères tétracycliques **176** (N<sup>1</sup>) et **176** (N<sup>2</sup>).

Après 2h de chauffage à 165°C, les azotures sont complètement consommés et l'analyse RMN confirme la formation des deux isomères (**172**) et (**177**) avec un rapport de 1 : 0.8. La chromatographie sur couche mince révèle la présence d'une seule tache orange fluorescente qui se traduit par la superposition d'un produit jaune et un autre rouge fluorescent.



**Figure 142** : aspect visuel de deux isomères.

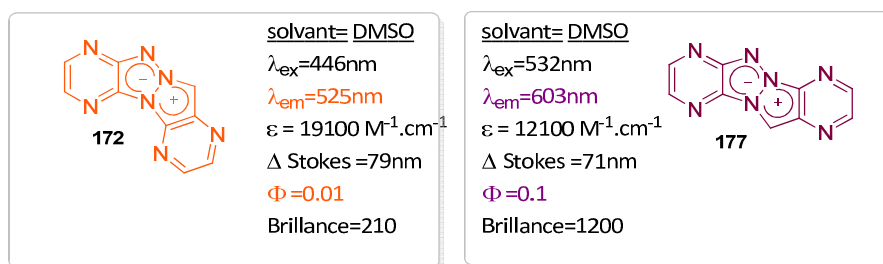
La séparation de ces deux isomères s'est avérée très laborieuse. Non seulement ces deux composés présentent le même rapport frontal, mais les deux structures montrent une forte affinité avec la phase stationnaire. Des nombreuses séparations ont été nécessaires pour pouvoir bien séparer les deux structures. De cette manière nous avons pu récupérer dans un premier temps l'isomère jaune, légèrement moins polaire, puis l'isomère rouge.

Suite aux tentatives de purification, le composé jaune fluorescent, soit l'isomère (**172**), est isolé avec un rendement de 38% et le composé rouge fluorescent, soit le composé (**177**) est obtenu avec un rendement de seulement 16% sur les 2 étapes.

### 1.3. Analyse photophysique

#### a) Caractérisation dans le DMSO et dans le DCM

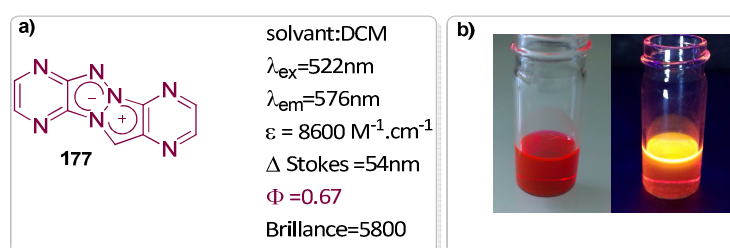
L'analyse photophysique montre clairement une différence considérable entre les deux structures (*Figure 144*). Avant tout, il est important de noter que les deux composés émettent dans des régions différentes. Dans le DMSO par exemple, la structure coudée a une émission vers 525 nm, se situant donc dans la région du jaune, alors que son analogue linéaire (**177**) présente une émission à 603nm appartenant plus à la catégorie des fluorophores orange-rouge.



**Figure 143** : Caractérisation photophysique dans le DMSO.

En revanche, le coefficient d'extinction molaire est supérieur dans le cas du composé jaune. La molécule coudée est ainsi caractérisée par une absorptivité supérieure à celle de la structure linéaire. Mais la structure linéaire présente un rendement quantique 10 fois supérieur, et une meilleure brillance que son analogue. Nous conservons un bon déplacement de Stokes dans les deux cas.

Des analyses complémentaires ont montré que la structure **(177)** manifeste une meilleure fluorescence et une meilleure brillance dans les solvants organiques moins polaires. L'analyse de ce composé dans le dichlorométhane a permis d'augmenter le rendement quantique du composé linéaire d'un facteur 7 (*Figure 145.a*) par rapport à celui mesuré dans le DMSO.



**Figure 144** : a) Propriétés photophysiques du composé **(172)** dans le DCM ; b) solution dans le DCM sans irradiation et irradié à 365nm.

Cependant, dans ce solvant le maximum d'émission se trouve à de plus petites longueurs d'onde (*Figure 144.b*). Le coefficient d'absorption et le déplacement de Stokes présentent aussi des valeurs plus basses. Toutefois, le rendement quantique important permet de compenser la baisse d'absorptivité ainsi la brillance est supérieure d'un facteur 6 par rapport au DMSO.

A l'aide des calculs de chimie quantique, nous nous sommes intéressés à la détermination des caractéristiques photophysiques des deux isomères, pour le calcul une estimation des longueurs d'onde d'absorption et d'émission de deux isomères **(172)** et **(177)**.

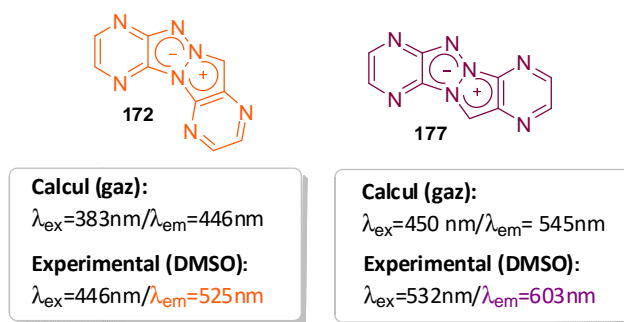


Figure 145 : Valeurs théoriques et expérimentales des  $\lambda_{abs}$  et  $\lambda_{em}$ .

Les résultats montrent une différence entre les valeurs théoriques et expérimentales car lors des calculs l'effet du solvant n'est pas pris en compte. Toutefois la corrélation est évidente, car ces calculs confirment que l'isomère coudé présente des valeurs d'émission plus basse que la structure linéaire.

#### b) L'analyse dans l'eau du composé rouge (177)

Les premières analyses du fluorophore (**177**) en milieux aqueux sont plutôt encourageantes : en effet il est parfaitement soluble, et présente l'avantage de conserver sa fluorescence. Même si ses propriétés de fluorescence sont moins prononcées dans ce cas, la solubilisation dans l'eau permet d'obtenir une émission dans le rouge avec une longueur d'onde située vers 604 nm.

Afin de mettre en évidence l'impact induit par le changement de pH, nous avons caractérisé ce composé à pH acide, neutre et basique. Nous obtenons une superposition parfaite des spectres d'absorption mesurés à divers pH avec un maximum dans les 3 cas à 522 nm. Cette parfaite superposition est également constatée sur les spectres d'émission avec des maxima à 604 nm (Figure 147), ce qui démontre que la structure n'est pas pH-dépendante ni pH-sensible.

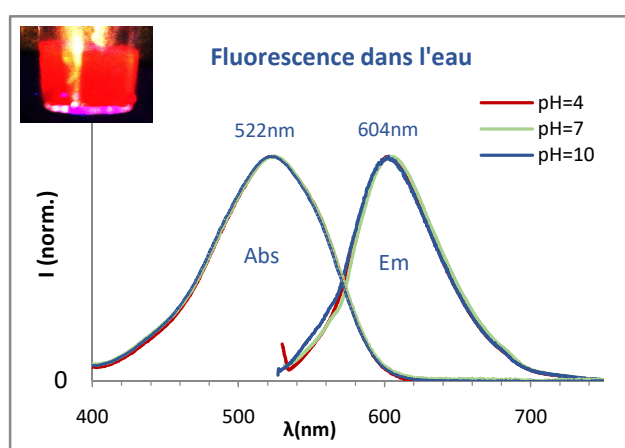


Figure 146 : Spectres d'absorption et d'émissions du composé (**177**) en fonction de divers pH.

Le composé tétracyclique linéaire (**177**) s'est montré très fluorescent dans les milieux organiques avec un rendement quantique de 67% dans DCM. Une baisse de rendement quantique nuancée par un effet bathochrome important a été observée dans des solvants plus polaires comme le DMSO et l'eau. Dans ces milieux, nous obtenons une émission supérieure à 600 nm (dans le domaine du rouge). L'objectif qui découle de ces nombreux avantages est de maintenant réaliser des analogues à partir de ce "hit" dans le but d'améliorer son caractère fluorescent et de renforcer l'effet bathochrome.

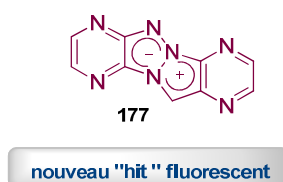


Figure 147 : Structure linéaire émettant dans le rouge.

## 2. Synthèse du fluorophore rouge (177)

Avant de pouvoir exploiter toute la potentialité de ce squelette fluorescent, il est essentiel d'optimiser sa voie de synthèse. Notre objectif est d'obtenir le composé d'intérêt à partir de l'intermédiaire azoture **176** ( $N^2$ ) qui serait synthétisé à partir de l'indazole (**173**) et de l'azoture (**16**) (Schéma 107).

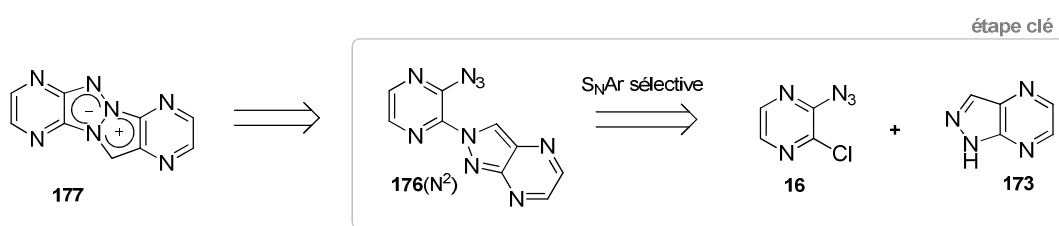


Schéma 107 : Rétrosynthèse du composé(177).

### 2.1. Optimisation de l'étape de $S_NAr$

Cette stratégie de synthèse nécessite d'optimiser l'étape de substitution nucléophile aromatique et d'identifier les conditions réactionnelles permettant de favoriser la formation de l'isomère (**176-N<sup>2</sup>**) tout en limitant la formation de l'analogue (**176-N<sup>1</sup>**). Pour cela, nous avons expérimenté une série de facteurs tels que : la température, la nature du solvant et la base (Schéma 108).

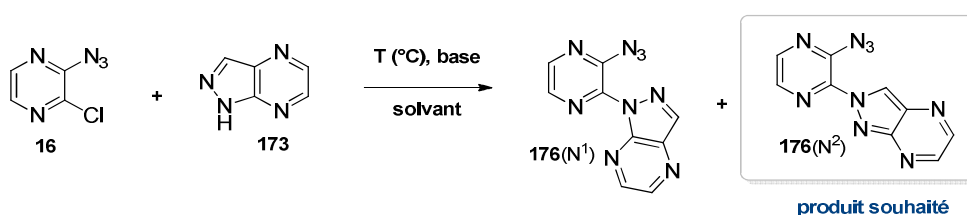


Schéma 108 : Optimisation de l'étape de  $S_NAr$ .

### Effet de la température

Le paramètre température nous a paru particulièrement intéressant compte tenu de son effet sur la sélectivité observée pour les indazoles. Pour ce faire, nous avons réalisé une série de tests dans des conditions classiques (avec l'acétonitrile et carbonate de potassium) à des températures comprises entre 0°C et 82°C à partir de 0,2mmol de produit de départ.

**Tableau 25 :** Rapport des isomères **176(N<sup>1</sup>)** et **176(N<sup>2</sup>)** en fonction de la température.

Entrée	Base	Solvant	T(°C)	Temps	Rapport RMN (N <sup>1</sup> :N <sup>2</sup> )
<b>1</b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2éq)	ACN	reflux	18h	1:0,77
<b>2</b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2éq)	ACN	70	18h	1:1
<b>3</b>	<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2éq)</b>	<b>ACN</b>	<b>ta</b>	<b>18h</b>	<b>0,6:1</b>
<b>4</b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2éq)	ACN	0	18h	0,7:1

Les résultats représentés dans le *Tableau 26* montrent clairement l'influence de la température sur cette sélectivité. En effet, plus la température est basse, plus le rapport est en faveur de l'isomère souhaité (**176-N<sup>2</sup>**). Ainsi, au reflux de l'acétonitrile la formation de l'isomère N<sup>1</sup> est favorisée (*entrée 1*). A 70°C, l'équilibre entre les isomères N<sup>1</sup> et N<sup>2</sup> est observé (*entrée 2*). Le meilleur résultat est obtenu lorsque la réaction est réalisée à température ambiante, avec l'obtention d'un ratio N<sup>1</sup>:N<sup>2</sup> de 0,6 pour 1 (*entrée 3*). Lorsque la réaction est réalisée à 0°C, la tendance est conservée avec toutefois un ratio N<sup>1</sup>:N<sup>2</sup> légèrement moins bon (*entrée 4*). Nous soumettons ici l'hypothèse d'un mélange de produit thermodynamique et cinétique : le composé N<sup>1</sup> serait le produit thermodynamique et le N<sup>2</sup> le cinétique. Pour confirmer ou infirmer cette théorie, il serait intéressant de faire un suivi LC-MS de cette réaction. En effet, l'utilisation de la RMN du proton ou des CCM n'a pas permis un suivi suffisamment précis de la réaction.

### Effet du solvant

Pour étudier l'importance de la nature du solvant sur le rapport des deux isomères, plusieurs solvants de natures différentes ont été employés : protiques/aprotiques et de polarité variable. Les divers essais ont été réalisés en présence du carbonate du potassium et à température ambiante.

**Tableau 26 :** Rapport des isomères (**176-N<sup>1</sup>**) et (**176-N<sup>2</sup>**) en fonction du solvant.

Entrée	Base	Solvant	T(°C)	Temps	Rapport RMN (N <sup>1</sup> :N <sup>2</sup> )
<b>1</b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2éq)	DMF	ta	18h	0,9 :1
<b>2</b>	<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2éq)</b>	<b>ACN</b>	<b>ta</b>	<b>18h</b>	<b>0,6:1</b>
<b>3</b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2éq)	EtOH	ta	18h	1: 0
<b>4</b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2éq)	Dioxane	ta	18h	/
<b>5</b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2éq)	THF	ta	18h	1 :0,6

polarité



Les résultats obtenus (*Tableau 27*) ne montrent aucune corrélation apparente entre la polarité du milieu réactionnel et le résultat de la réaction. En comparant les deux premiers essais, nous obtenons dans les deux cas l'isomère N<sup>2</sup> majoritaire, avec un meilleur rapport lorsque la réaction est réalisée dans l'acétonitrile. Lorsque des solvants aprotiques moins polaires sont utilisés les résultats ne suivent pas la même tendance. Dans le dioxane (*entrée 4*) aucune conversion n'est constatée, tandis que dans le THF (*entrée 5*) l'isomère majoritaire est le produit N<sup>1</sup>. En revanche, un solvant protique comme l'éthanol conduit à la formation sélective de l'isomère N<sup>1</sup> (*entrée 3*). Le solvant de choix est donc l'acétonitrile.

### Effet de la base

Dans cette partie nous avons sélectionné une série de bases inorganiques et organiques avec un pKa de l'acide conjugué faible et plusieurs exemples de bases fortes. L'essai réalisé en absence de base (*entrée 1*), montre clairement l'importance de celle-ci. Le même résultat est constaté lorsque les bases employées possèdent un pKa très faible, comme le bicarbonate de potassium (*entrée 2*) et la lutidine (*entrée 3*).

**Tableau 27** : Rapport des isomères (176-N<sup>1</sup>) et (176-N<sup>2</sup>) en fonction de la base.

Entrée	Base(2éq)	solvant	T(°C)	temps	conversion	Rapport RMN (N1:N2)
1	/	ACN	ta	18h	Aucune conversion	/
2	NaHCO <sub>3</sub> (pKa=3.6)	ACN	ta	18h	Aucune conversion	/
3	2,6-lutidine (pKa=6.6)	ACN	ta	18h	Aucune conversion	/
4	DABCO (pKa=8.8)	ACN	ta	2h	totale	1 :0,9
5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (pKa=10.3)	ACN	ta	18h	totale	0,6:1
6	<b>Et<sub>3</sub>N (pKa=10.8)</b>	<b>ACN</b>	<b>ta</b>	<b>18h</b>	<b>totale</b>	<b>0,3 :1</b>
7	DIPEA(pKa=11.4)	ACN	ta	18h	32%	0,5 :1
8	NaH <sup>a</sup>	THF	0	2h	dégradation	/
9	LiHMDS <sup>b</sup>	THF	-78	2h	dégradation	/

Avec le 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (*entrée 4*), une conversion totale est constatée après 2h de réaction, avec la formation de l'isomère non désiré comme produit majoritaire. En présence de carbonate de potassium, de triéthylamine ou de la base de Hünig (*entrées 5,6 et 7*) la formation de l'isomère N<sup>2</sup> est favorisée. La conversion est alors plus lente et nécessite entre 12 h et 18 h d'agitation en fonction de la base employée. L'utilisation de bases fortes comme l'hydru de sodium ou l'hexaméthylidisilazane de lithium engendre une dégradation immédiate du milieu réactionnel (*entrées 8 et 9*). Les conditions optimales sont donc celles reportées dans l'*entrée 6*.

## 2.2. Les conditions optimales

Finalement, nous avons réalisé la réaction de substitution dans les conditions optimales et nous avons pu obtenir majoritairement le composé (**176-N<sup>2</sup>**) dans une proportion de 1/0,3 avec l'autre isomère. Ce mélange, engagé dans l'étape de thermolyse permet d'obtenir les deux isomères cyclisés (**172**) et (**177**). Ces derniers ont pu facilement être séparés et le produit rouge fluorescent a été isolé avec un rendement de 62% sur les deux étapes.

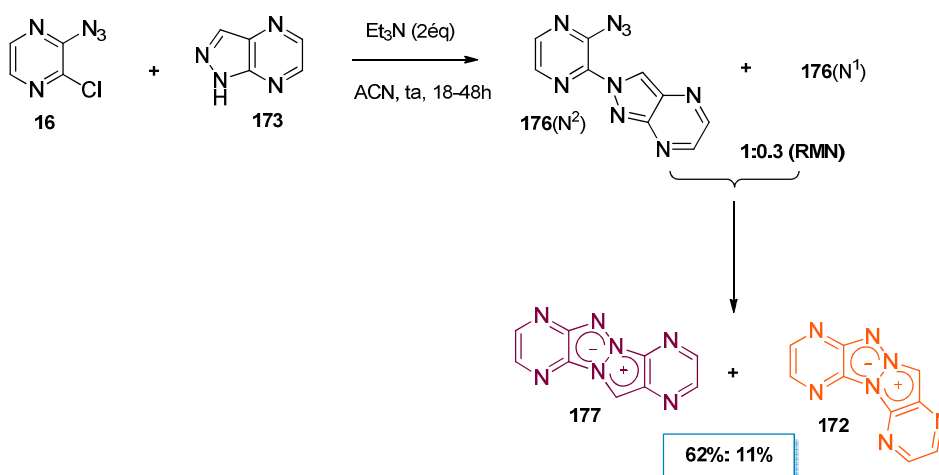


Schéma 109 : Synthèse optimisée du composé (**177**) rouge fluorescent.

## 3. Fonctionnalisation de l'isomère tétracyclique rouge(177)

Une fois la méthode de synthèse identifiée, notre objectif est d'étudier la réactivité de cette nouvelle charpente moléculaire et d'identifier de nouvelles méthodes de fonctionnalisation (*Figure 149*).

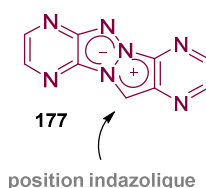


Figure 148 : Objectif synthétique.

Nous envisageons ici de réaliser des réactions d'halogénéation sur la position indazolique, dans le but d'effectuer ultérieurement des couplages métallo-catalysés. Il sera aussi intéressant de tester le potentiel de ce type de structures faces aux réactions de CH arylation. Afin de préserver ce composé et de limiter les pertes pendant les réactions d'optimisation, nous avons utilisé dans un premier temps son isomère coudé jaune (**172**) (celui ci peut facilement être plus obtenu) lors des

divers tests d'optimisation, pour ensuite appliquer les conditions réactionnelles qui se dégagent sur le composé rouge.

### 3.1. Halogénéation

La fonctionnalisation avec des halogènes a été privilégiée en premier lieu, ayant pour but de réaliser par la suite des couplages. Les premières tentatives d'halogénéation ont été réalisées sur le dérivé (**172**). Pour réaliser la réaction d'halogénéation, nous avons utilisé des conditions classiques de substitution électrophile aromatique.

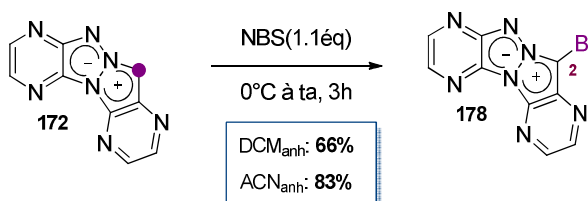
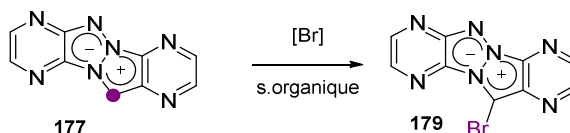


Figure 149 : Bromation du composé(**172**).

En présence de NBS (1,1éq) dans le DCM anhydre sous atmosphère inerte, une conversion totale est obtenue après 3 h de réaction en absence de chauffage. Ces conditions de bromation ont été ensuite employées sur le produit (**177**). Les divers essais réalisés dans des milieux organiques sont énumérés dans le *Tableau 29*.

Tableau 28 : Essais de bromation du composé (**177**) dans les solvants organiques.

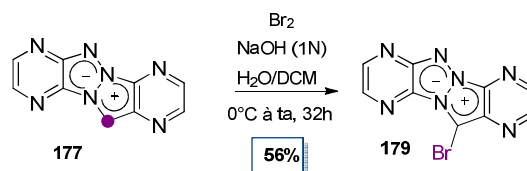


Entrée	Agent de bromation	Additif	solvant	T(°C)	temps	conversion	$\eta$
1	NBS(1.1éq)	/	DCM <sub>anh</sub>	0°C à ta	3h	Dégradation	0-26%
2	NBS(1.1éq)	/	CHCl <sub>3</sub> <sub>anh</sub>	0°C	/	Dégradation immediate	0%
3	Br <sub>2</sub> (1.1éq)	/	DCM <sub>anh</sub>	0°C	/	Dégradation immediate	0%

Le suivi de la réaction montre la formation d'un produit fluorescent violet moins polaire et une consommation quasi-totale du produit de départ après 3h de réaction (*entrée 1, tableau 29*). Malheureusement, beaucoup de dégradation est observée et aucune amélioration n'a pu être apportée malgré différents essais réalisés.

Face à cet échec, nous avons envisagé d'autres méthodes de bromation, notamment les méthodes réalisées dans l'eau (*Schéma 110*). Dans les conditions aqueuses, les composés (**177**) et (**179**) sont plus stables, avec très peu de dégradation constatée.



Schéma 110 : Bromation du composé (**177**) en milieu aqueux.

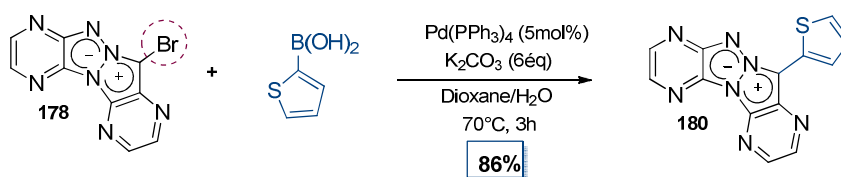
Une méthode généralement utilisée pour bromer la position indazolique consiste à utiliser le dibrome comme agent d'halogénéation dans un milieu aqueux basique. Un premier essai a été réalisé dans un mélange diphasique ( $\text{H}_2\text{O/DCM}$ ). Même si la réaction est un peu plus longue, la conversion totale est atteinte et le rendement est de 56%. Un début d'optimisation non concluant a été mené, et par manque de temps, elle n'a pas été poursuivie. D'autres essais sont prévus pour compléter et améliorer ce résultat. Au final, malgré les divers problèmes inexplicables rencontrés, nous avons réussi à identifier une méthode de bromation qui permet de limiter les problèmes de dégradation du composé (**177**).

### 3.2. Réactions de couplage

Ayant en possession les deux dérivés bromés (**178**) et (**179**), nous avons envisagé de réaliser quelques réactions de couplage afin de tester leur réactivité et les conséquences des groupements introduits sur les propriétés spectroscopiques

#### a) Couplage de Suzuki-Miyaura

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au couplage de Suzuki-Miyaura en utilisant les conditions développées précédemment. Contrairement aux cas précédents, un chauffage à  $70^\circ\text{C}$  est ici suffisant pour obtenir une conversion totale en seulement 3h (Schéma 111). Avec l'aide de l'acide 2-thiénnylboronique, le produit (**180**) est obtenu avec un excellent rendement de 86%.

Schéma 111 : Couplage de Suzuki-Miyaura sur le composé(**178**).

La réaction de Suzuki-Miyaura sur l'isomère (**179**) met en avant sa grande réactivité avec un temps de réaction inférieur à une heure (Schéma 111). On note également la formation d'une quantité non négligeable du composé déhalogéné, qui se traduit par une baisse du rendement, le composé (**181**) étant obtenu avec un rendement plus modeste de 44%.

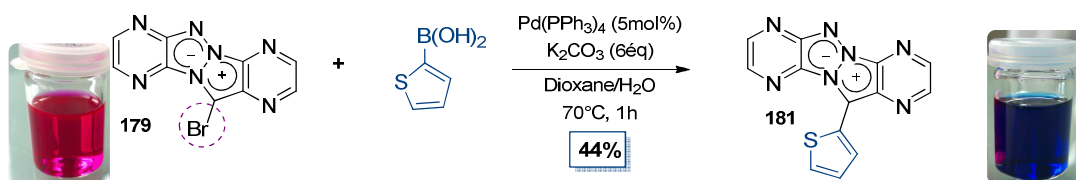


Schéma 112 : Couplage de Suzuki-Miyaura à partir du composé(181).

Il est intéressant de constater que dans ce cas, l'ajout d'une fonction thiophène permet d'obtenir un composé bleu à l'état solide et à l'état liquide ( $\lambda_{\text{abs}} = 610 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 6\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) mais ne présentant pas de signe de fluorescence, alors que le composé bromé manifeste une fluorescence vers le rouge-violet.

#### b) Couplage de Sonogashira

Afin de valider l'approche d'un couplage de Sonogashira, seuls deux exemples ont été réalisés à partir du dérivé bromé (179) avec le triéthylsilyl acétylène et le phénylacétylène (Schéma 113).

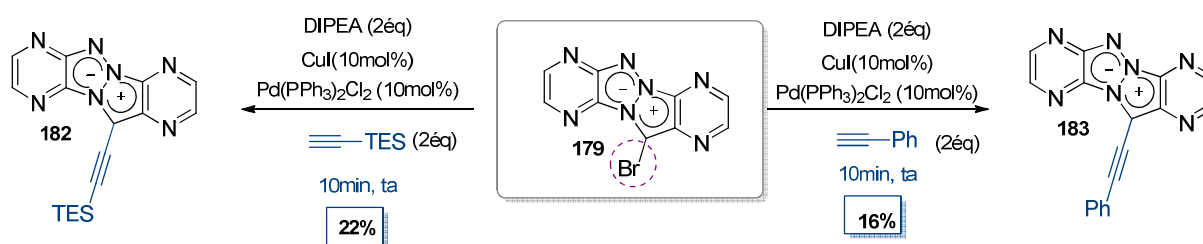


Schéma 113 : Exemples de couplage de Sonogashira.

Dans les conditions usuelles développées au cours de ce projet, le dérivé bromé montre une forte réactivité, car dans les deux cas après 10 min d'agitation à température ambiante, le produit de départ est entièrement consommé. En revanche, la formation du composé déhalogéné est majoritaire et les deux produits de couplage sont isolés avec des rendements modestes. Selon leur potentiel fluorescent, cette réaction pourra être optimisée par la suite.

#### d) C-H arylation

Il était intéressant d'évaluer la réactivité de nos PyTAPs tétracycliques linéaires dans des réactions de C-H arylation. En effet, les réactions de bromation se soldant par des résultats très modestes, cette activation pourrait permettre de s'affranchir de cette étape en développant un couplage organo-métallique non décrit sur ce type de noyaux.

- *Etat de l'art : C-H arylation des indazoles*

Si la C-H arylation a été le sujet d'un développement considérable, ce procédé souffre toutefois d'un manque de données dans le cas du noyau indazolique. En effet, très peu de publications relatent la modulation de cet hétérocycle en particulier.

Greaney *et coll.* en 2007 présentent une méthode qui permet de réaliser la C-H arylation sur des substrats déficients en électrons, comme les thiazoles dans l'eau à 60°C. Eco-compatible et douce, cette approche répond ainsi à certaines limitations des méthodes classiques de C-H arylation (Schéma 114).<sup>164</sup> C'est un exemple d'une réaction hétérogène étudiée par Sharpless, un phénomène appelé «on-water».<sup>165</sup>

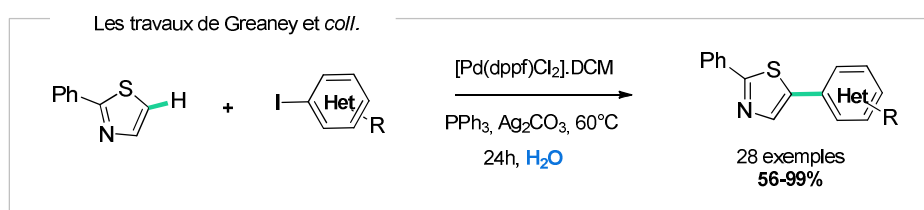


Schéma 114 : Arylation des 2-phenylthiazoles par couplage C-H/C-I.

En 2012, l'équipe de Guillaumet a été parmi les premières à mettre au point des méthodes permettant de fonctionnaliser la position C<sup>3</sup> du 1*H*-indazole ou 2*H*-indazole *via* une activation C-H.<sup>166</sup> Dans le cas des 1*H*-indazoles, les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant un système catalytique composé d'acétate de palladium et de 1,10-phénantroline (Schéma 115). Une des limitations est la nécessité de chauffer à haute température (165°C dans le *N,N*-diméthylacétamide), ce qui impose l'utilisation de substrats de départ thermostables.

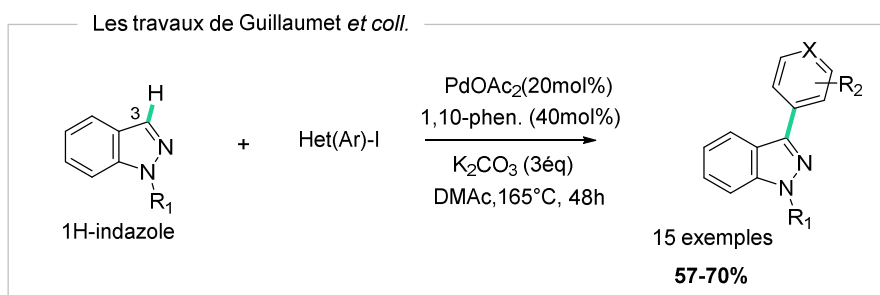


Schéma 115 : C<sup>3</sup> arylation des indazoles.

<sup>164</sup> Turner, G. L., Morris, J. A. & Greaney, M. F. Direct Arylation of Thiazoles on Water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 7996–8000 (2007).

<sup>165</sup> Narayan, S. *et al.* 'On Water': Unique Reactivity of Organic Compounds in Aqueous Suspension. *Angew. Chemie.* **117**, 3339–3343 (2005).

<sup>166</sup> Ben-Yahia, A., Naas, M., El Kazzouli, S., Essassi, E. M. & Guillaumet, G. Direct C-3-Arylations of 1*H*-Indazoles. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 7075–7081 (2012).

Cette même année, l'équipe d'Itami a montré une méthode similaire permettant de fonctionnaliser la position C<sup>3</sup> du 1*H*-indazole.<sup>167</sup> Quant à la C-H arylation des 2*H*-indazoles, la réaction peut être réalisée à une température plus basse (110°C dans le *N,N*-diméthylformamide) *via* une catalyse au cuivre avec la 1,10-phénantroline (Schéma 116).

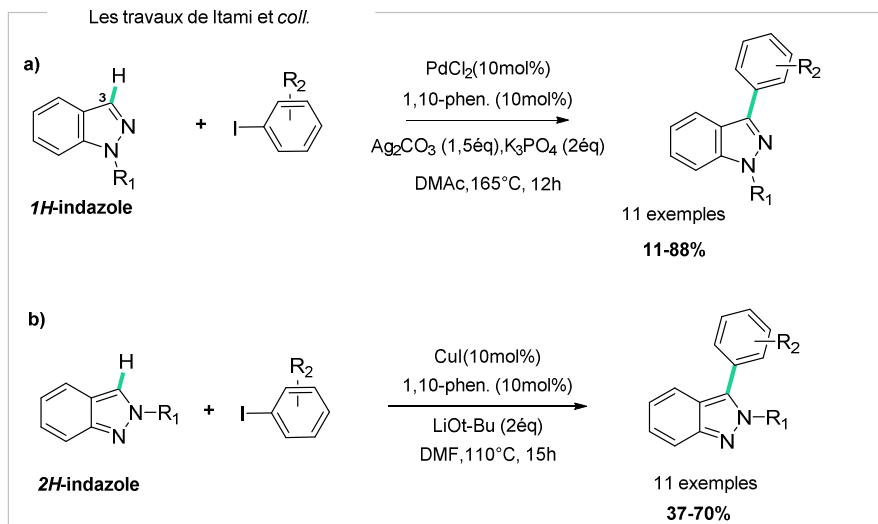


Schéma 116 : C-H arylation des indazoles.

Récemment, Cheng et coll. a étudié un autre type de fonctionnalisation des 2*H*-indazoles qui est basé sur un couplage oxydatif de type C-H/C-H.<sup>48</sup> Les conditions misent au point supposent l'utilisation d'un système de deux catalyseurs, palladium et cuivre, et un chauffage dans le dioxane à 120°C. Cette méthode permet de fonctionnaliser les indazoles avec divers noyaux hétérocycliques à 5 chaînons de type thiophène, furane et pyrrole.

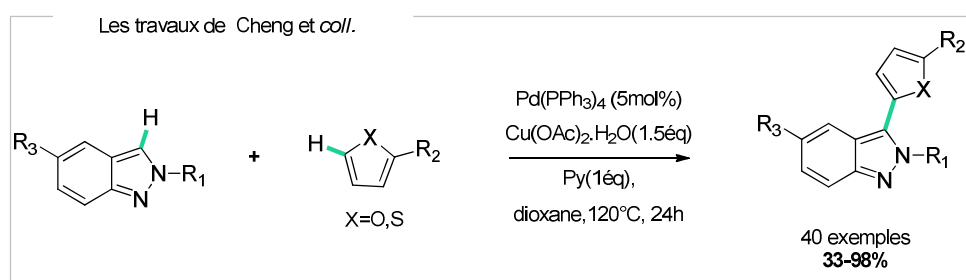


Schéma 117 : Arylation des 2-phenylthiazoles par couplage C-H/C-H.

<sup>167</sup> Hattori, K., Yamaguchi, K., Yamaguchi, J. & Itami, K. Pd- and Cu-catalyzed C–H arylation of indazoles. *Tetrahedron*. **68**, 7605–7612 (2012).

- Nos résultats : C-H arylation des triazapentalènes

Dans ce contexte il nous a paru intéressant de commencer notre étude en testant la méthode de C-H/C-H arylation entre le triazapentalène tétracyclique (**177**) et le benzothiophène, exemple utilisé lors des travaux de Cheng (*Schéma 117*). La consommation totale du composé rouge fluorescent est constatée après seulement 1h de réaction à 70°C. Les analyses spectrométriques n'ont pas permis d'identifier même sous forme de traces le composé (**184**) attendu (*Schéma 18.a*). Le produit majoritaire de cette réaction de CH arylation est le produit (**185**) issu de l'homocouplage de deux motifs triazapentalènes (confirmation en masse) avec un rendement satisfaisant de l'ordre de 85%. Le composé obtenu est un solide bleu foncé très polaire et insoluble dans la plupart des solvants testés, dont le DMSO, ce qui a rendu impossible sa caractérisation par RMN.

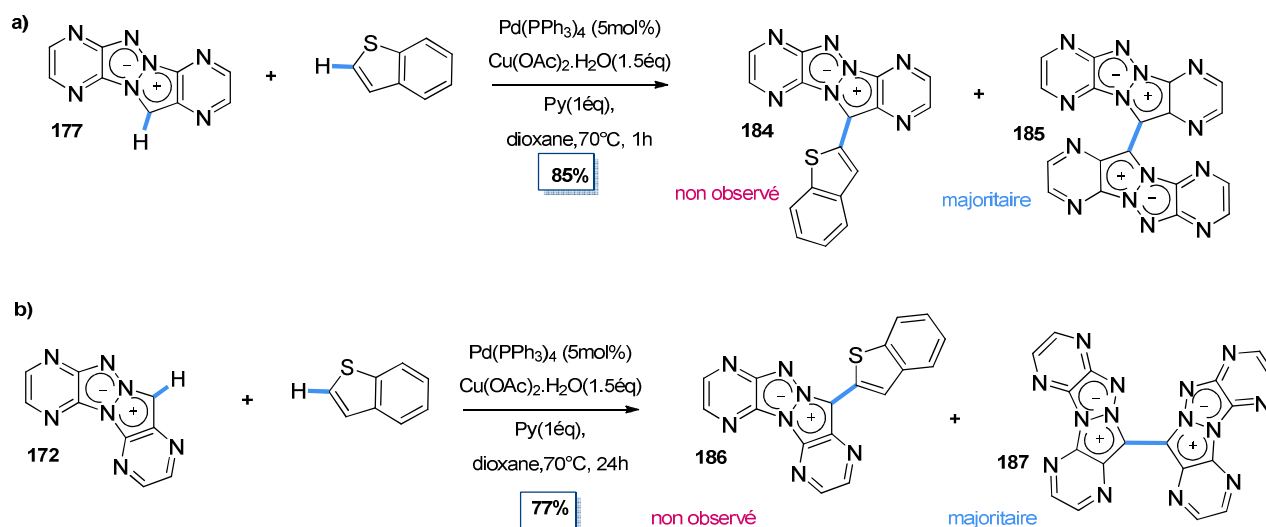


Schéma 118 : C-H arylation des composés (**177**) et (**172**).

Un résultat semblable est obtenu avec l'isomère (**172**), la structure (**186**) attendue n'est pas obtenue et l'analyse par spectrométrie de masse confirme à nouveau la formation du produit d'homocouplage (**187**) (*Schéma 18.b*). En revanche, contrairement au premier cas, la cinétique de cette réaction est plus lente, car après 24h de réaction à 70°C, la conversion n'est toujours pas complète.

Malgré l'absence du produit de couplage avec le benzothiophène, ce résultat reste encourageant car la formation des sous-produits de type homocouplage se traduit par une bonne réactivité des triazapentalènes dans ces conditions, et une réactivité insuffisante de benzothiophène.

Face à ce résultat, il nous a paru judicieux d'utiliser un thiophène iodé. Nous avons opté donc pour un couplage de type C-H/C-I à partir des deux substrats fluorescents (**172** et **177**) et du 2-iodothiophène selon les conditions de Greaney (*Schéma 119*).

Dans le cas du composé jaune (**172**), insoluble dans le milieu aqueux, la réaction dans l'eau a permis d'atteindre une conversion de 44% après 18h à 70°C (*figure 202.a*). Pendant cette première réaction il y a été observé la formation de micro-agglomérats et la précipitation du produit sur les parois (comme décrit par Greaney). Alors que la même réaction conduite dans un milieu organique (à 100°C dans le dioxane) ne permet d'observer que des traces du composé **123**. Dans le cas de substrats de départ hydrophobes, les conditions hétérogènes (ou « on-water ») peuvent favoriser la réaction de C-H arylation.

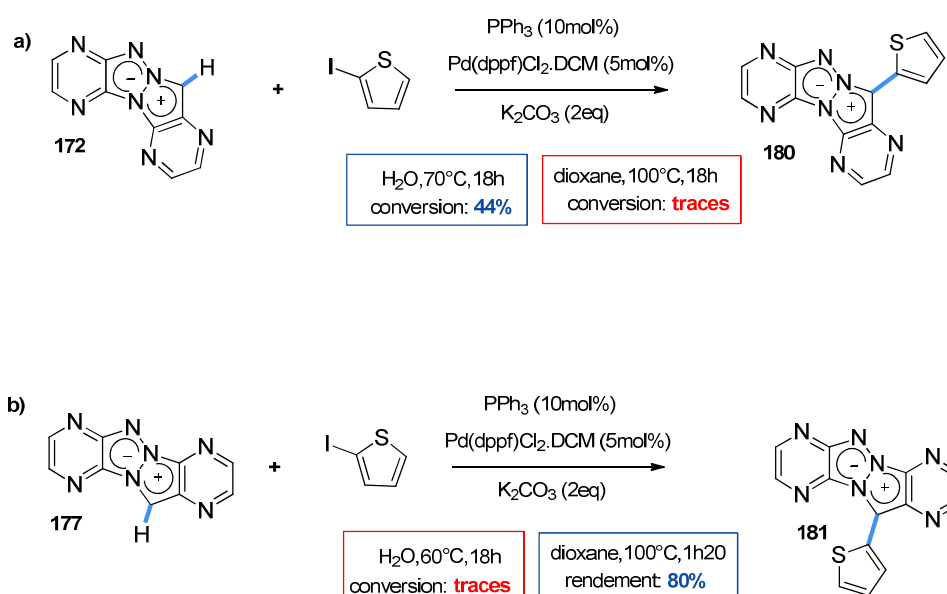


Schéma 119 : Couplage C-H/C-I des triazapentalènes(**172**) et(**177**).

Un résultat opposé est obtenu lorsque la réaction de couplage est réalisée à partir du fluorophores rouge (**177**). Comme nous avons mentionné précédemment ce composé a un caractère amphiphile et sa solubilisation dans le milieu aqueux empêche de créer le milieu hétérogène important pour ce type de couplage. En revanche, dans le milieu organique (à 100°C dans le dioxane) le composé fait preuve d'une grande réactivité. Le composé bleu (**181**) est isolé avec un rendement très satisfaisant de 80%.

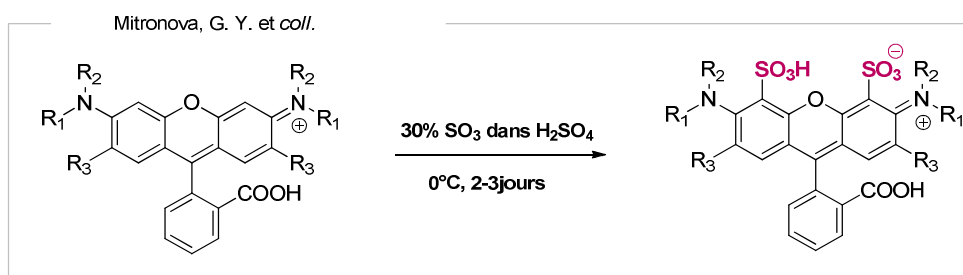
### Conclusion

Nous avons montré que les deux composés tétracycliques (**172**) et (**177**) se différencient non seulement par leurs propriétés de fluorescence mais aussi par une réactivité bien distincte. Le composé jaune (**172**) s'avère plus stable, et moins réactif, notamment dans les couplages par CH activation. A l'opposé le chromophore rouge (**177**) possède une très forte réactivité et s'avère un excellent substrat de départ pour réaliser dans des temps très courts et à basse température des réactions de type Suzuki-Miyaura, Sonogashira et des réactions de CH arylation.

### 3.3. Sulfonation

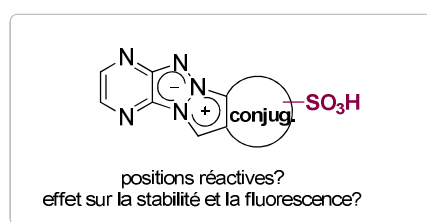
La sulfonation est un outil très puissant dans la fonctionnalisation des structures fluorescentes, car, comme nous l'avons vu dans l'introduction, ce procédé a permis, entre autres, de créer une des plus grandes familles de fluorophores, connue sous le nom d'Alexa Fluor. La présence des groupements sulfonates permet de rendre les noyaux fluorescents hydrophiles. Un autre effet bénéfique est l'augmentation de la photostabilité et de la brillance.<sup>168</sup>

La méthode de sulfonation généralement utilisée consiste à traiter le composé fluorescent avec de l'oleum.<sup>169</sup> Dans le cas de la rhodamine, 3 jours d'agitation dans ce mélange acide permettent d'ajouter deux groupements sulfonates (*Figure 151*).



**Figure 150** : Sulfonation de la rhodamine.

Dans ce contexte, il est intéressant d'évaluer quel effet pourra avoir un groupement sulfonate sur des systèmes de type triazapentalène. Notre objectif est d'identifier les positions réactives susceptibles d'accueillir un groupement sulfonate et la méthode de sulfonation la plus compatible avec nos structures (*Figure 152*).



**Figure 151** : Structure générale visée.

#### a) Méthodes de synthèse

Etudiée en parallèle par le Dr Régis Delatouche, la méthode de sulfonation appliquée dans la synthèse d'AlexaFluor présentée dans la *Figure 151* s'est montrée peu sélective sur les PyTAPs avec

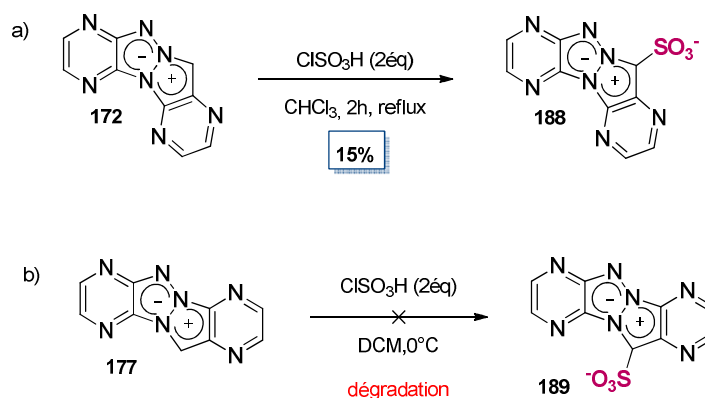
<sup>168</sup> Panchuk-Voloshina, N. et al. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1179–88 (1999).

<sup>169</sup> Mitronova, G. Y. et al. New fluorinated rhodamines for optical microscopy and nanoscopy. *Chem. Eur. J.* **16**, 4477–88 (2010).

des résultats peu reproductibles. Basés sur la littérature, nous nous sommes tournés vers une méthode de sulfonation plus douce et plus sélective décrite par Rangasamy et *coll.*<sup>170</sup> La méthode utilise de l'acide chlorosulfonique dans un solvant organique chloré.

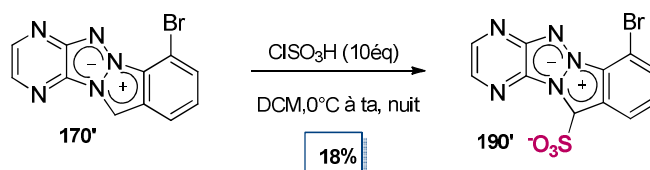
Cette méthode est appliquée dans un premier temps au composé (**172**) (*Schéma 120.a*). Les essais d'optimisation sur cette structure ont montré que la réaction est possible si le milieu réactionnel est chauffé. Ainsi, un chauffage au reflux du chloroforme pendant 2h permet d'obtenir le composé jaune hydrophile (**188**) comportant un seul groupement sulfonate (confirmation par spectroscopie de masse). Ce composé est purifié sur chromatographie en phase inverse et est isolé avec un rendement modeste de 15%.

Lorsque cette méthode est appliquée au composé rouge (**177**), nous constatons uniquement de la dégradation, que ce soit à haute ou à basse température (*Schéma 120.b*).



**Schéma 120** :Sulfonation des triazapentalènes tétracycliques polyazotés (**172**)et (**177**).

En parallèle, cette méthode a été employée dans le cadre du projet de maturation par le Dr. Régis Delatouche sur la molécule bromée (**170'**). Le composé (**190'**) est isolé après la purification en phase inverse avec un rendement modeste de 18% (*figure 206*).



**Schéma 121** : Sulfonation du composé tétracyclique (**170'**).

Malgré des rendements modestes, ces premiers résultats sur la sulfonation sont très encourageants et seront exploités dans la suite du projet sur d'autres noyaux fluorescents en fonction des résultats spectroscopiques.

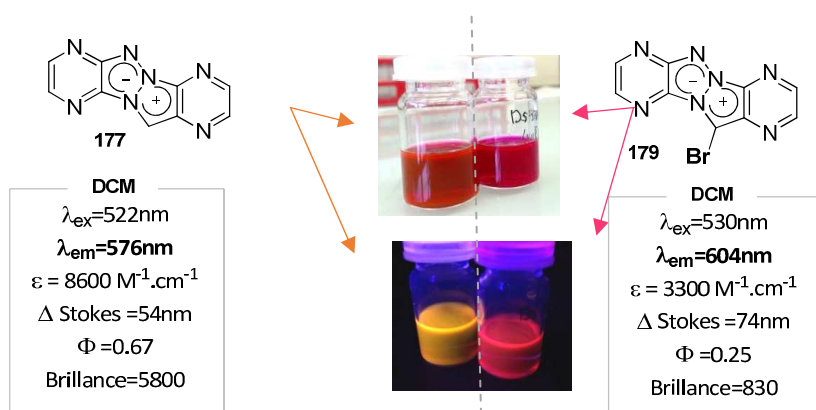
<sup>170</sup> Rangasamy, S., Ju, H., Um, S., Oh, D. & Song, J.; Mitochondria and DNA Targeting of 5,10,15,20-Tetrakis(7-sulfonatobenzo-[b]thiophene) Porphyrin-Induced Photodynamic Therapy via Intrinsic and Extrinsic Apoptotic Cell Death. *J. Med. Chem.*, **58**, (17), pp 6864–6874, (2015)



### 3.4. Analyses photophysiques des fluorophores rouges

#### a) L'effet du brome

Il est intéressant de noter que la bromation du composé (**177**) permet d'obtenir un effet bathochrome sur le spectre d'absorption et d'émission. Ainsi, dans le dichlorométhane, le dérivé bromé (**179**) est caractérisé par un maximum d'absorption de 530 nm, soit 8nm de plus que le composé (**177**) et il émet à 604 nm, soit avec une augmentation de 28nm (*Figure 153*). Le dérivé bromé est donc un véritable fluorophore rouge avec la longueur d'onde d'émission qui peut augmenter avec la polarité du solvant.

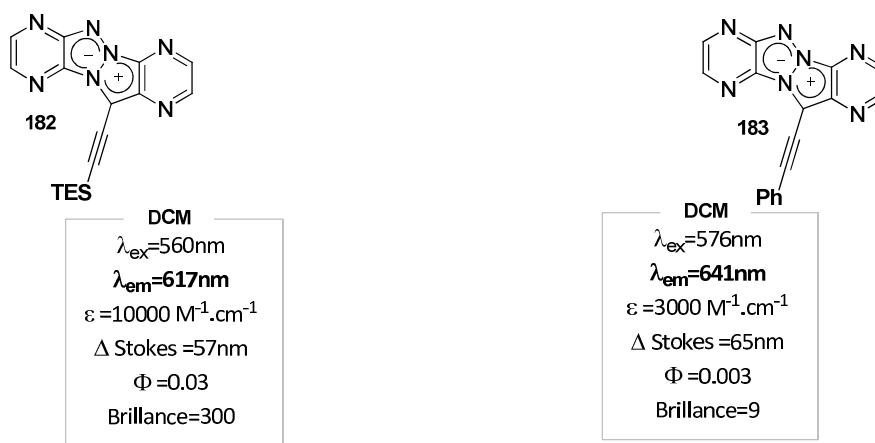


**Figure 152** : Propriétés optiques du composé(**177**) et son dérivé bromé(**179**).

Un autre avantage du composé bromé (**179**) est son déplacement de Stokes qui est amélioré de 20nm. En revanche, le coefficient d'absorptivité et le rendement quantique sont moins importants se traduisant par une baisse considérable de la brillance.

#### b) L'effet de la conjugaison

L'analyse des composés (**182**) et (**183**) conjugués à une fonction alcyne subissent un fort effet bathochrome avec des longueurs d'onde d'émission à 617 et 641 nm respectivement (*Figure 154*).

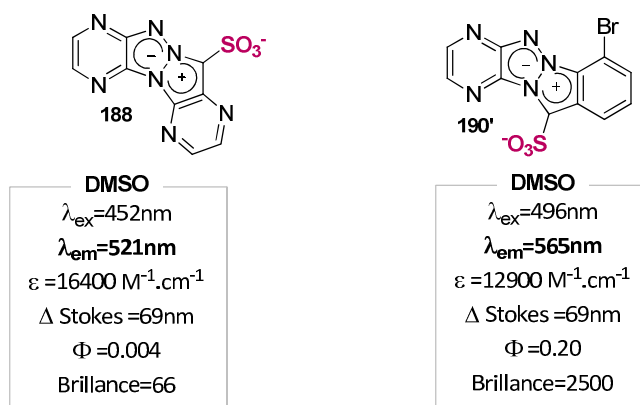


**Figure 153** : Propriétés optiques des composés (**182**) et (**183**).

Malheureusement, le composé (**182**) comportant l'alcyne silylé est caractérisé par un rendement quantique de seulement 3% et son analogue avec le phénylacétylène est encore moins fluorescent ayant avec un rendement de 0,3% et une très faible brillance.

a) L'effet des sulfonates

Les composés (**188**) et (**190'**) ont été caractérisés et seul le triazapentalène linéaire (**190'**) présente des propriétés de fluorescence intéressantes (*Figure 155*). En effet la présence du sulfonate a permis de déplacer sa longueur d'onde d'émission de 557 nm à 565 nm. La constante d'extinction molaire est augmentée d'un facteur 2, tout comme le rendement quantique. Finalement, la sulfonation a permis d'améliorer considérablement la brillance et aussi de rendre ce composé hydrophile.



**Figure 154** : Propriétés optiques des structures comportant les sulfonates.

### Conclusion

Dans cette partie nous avons montré que la fonctionnalisation des structures linéaires (**177**) avec des groupements halogènes ou encore avec des alcynes permet d'obtenir de composés émettant dans le rouge avec des longueurs d'onde d'émission allant jusqu'à 640nm dans le dichlorométhane. Nous avons également identifié une méthode permettant d'introduire sélectivement un groupement sulfonate sur deux structures tétracycliques. Dans le cas du composé (**190'**), cette modification a permis d'améliorer le rendement quantique, l'absorptivité et donc la brillance de cette structure.

A ce stade, notre ambition est de réaliser diverses modifications structurales sur les noyaux tétracycliques linéaires afin d'augmenter le nombre de composés émettant dans le rouge et en améliorant si possible leur brillance.



## Partie D : Préparation de sondes fluorescentes et application dans l'imagerie cellulaire

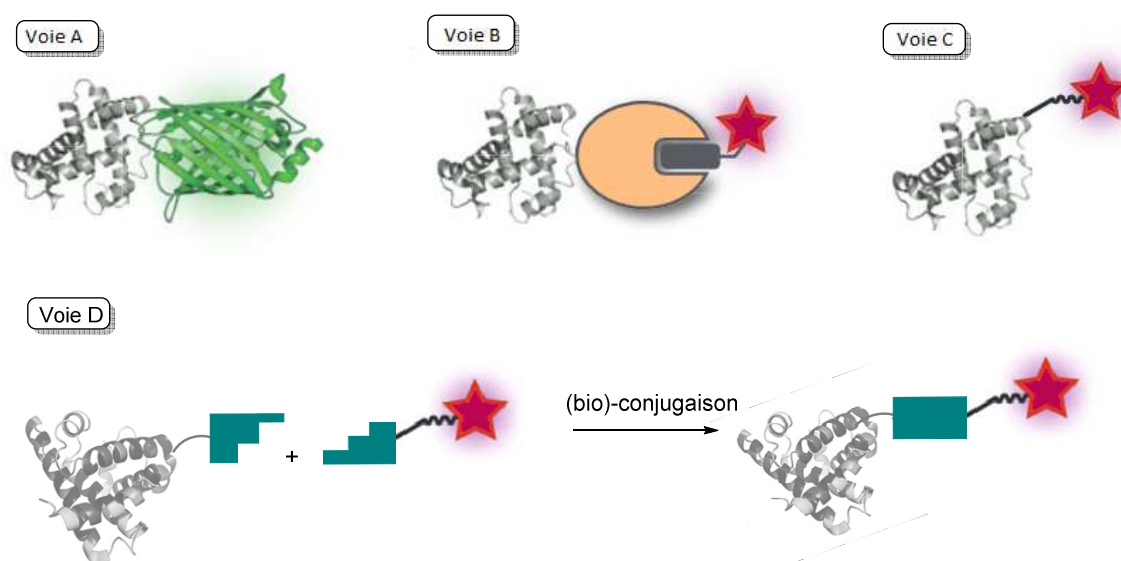




## Chapitre 1 : Synthèse de sondes fluorescentes pour le marquage

Dans les parties précédentes, nous avons mis au point des méthodes de synthèse efficaces et convergentes, permettant d'accéder à une large diversité de triazapentalènes. Dans ce chapitre, notre objectif est d'utiliser les méthodes développées pour fonctionnaliser les fluorophores avec des bras espaceurs pour des applications éventuelles dans le marquage de protéines ou d'autres biomolécules (peptide, anticorps, principes actifs...).

Le marquage d'une biomolécule avec des sondes fluorescentes est essentiel à la compréhension de divers mécanismes cellulaires. Dans le cas des protéines, cette insertion peut se faire de plusieurs façons représentées dans la *Figure 156* : La *voie A* correspond à la fusion d'une protéine fluorescente sur une protéine cible. La *voie B* utilise un ligand fluorescent capable de se lier à son récepteur. La *voie C*, quant à elle, envisage l'introduction directe du marqueur sur la protéine d'intérêt sans autre modification ce qui en fait une des voies les plus efficaces. Pour finir, le marqueur fluorescent peut être introduit par réaction de « (bio)conjugaison » (*Voie D*).<sup>171</sup>

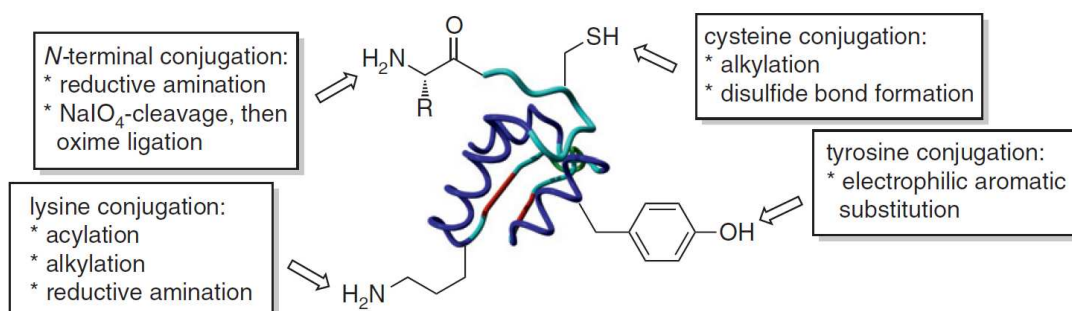


**Figure 155 : Marquage d'une protéine.**<sup>172</sup>

Dans cette partie nous allons nous concentrer essentiellement sur la dernière voie de marquage. Dans ce contexte, notre but est de préparer des fluorophores comportant une fonction réactive utile pour la fixation de divers vecteurs moléculaires. Les données bibliographiques concernant le marquage montrent que la bioconjugaison traditionnelle de protéines se fait sur des sites spécifiques (*Figure 157*).

<sup>171</sup> Lang, K. *et al.* Genetically encoded norbornene directs site-specific cellular protein labelling via a rapid bioorthogonal reaction. *Nat. Chem.* **4**, 298–304 (2012)

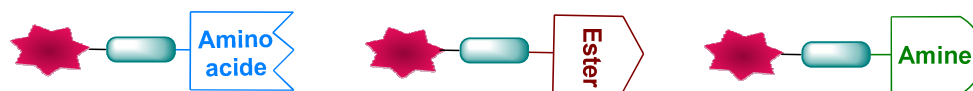
<sup>172</sup> Romanini, D. W. & Cornish, V. W. Protein labelling: Playing tag with proteins. *Nat. Chem.* **4**, 248–250 (2012)



**Figure 156 :** Différents points d'ancrage sur une protéine.<sup>173</sup>

Dans une optique de bioconjugaison, plusieurs sites réactionnels peuvent être mis à profit en tant que tels. Il s'agit notamment des sites N-terminaux, des NH<sub>2</sub> des lysines très nucléophiles, et aussi des groupements thiols présents sur les cystéines.

Afin de permettre le couplage des molécules fluorescentes avec ces différents récepteurs, nous avons envisagé les fonctionnalisations suivantes :



**Figure 157 :** Objectif synthétique.

## 1. Couplage de Sonogashira

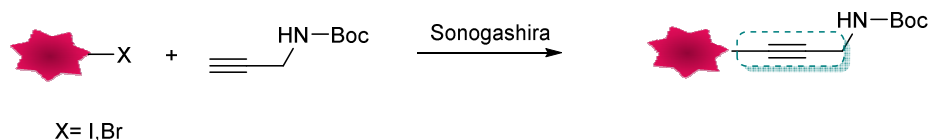
Nous nous sommes focalisés sur la synthèse de molécules fluorescentes avec des espaceurs. Les résultats très encourageants obtenus lors de l'étude du couplage de Sonogashira sur nos molécules nous ont motivé à utiliser cette approche pour introduire ces bras fonctionnalisés. Après le couplage, la triple liaison pourrait être réduite pour générer une chaîne alkyle flexible.

### 1.1. Fonctionnalisation avec des amines

Notre première idée consiste à introduire des bras espaceurs comportant une amine protégée. Pour commencer nous avons opté pour l'utilisation de chaînes courtes avec le couplage de la *N*-Boc-propargylamine commerciale et différents fluorophores halogénés (Figure 159).

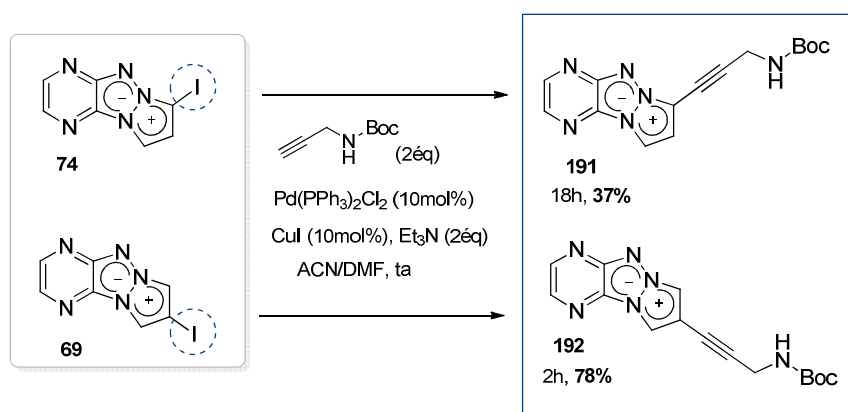
<sup>173</sup> van Berkel, S. S. & van Delft, F. L. Metal-free bioconjugation reactions. *Drug Discov. Today Technol.* **10**, e45–e51 (2013).





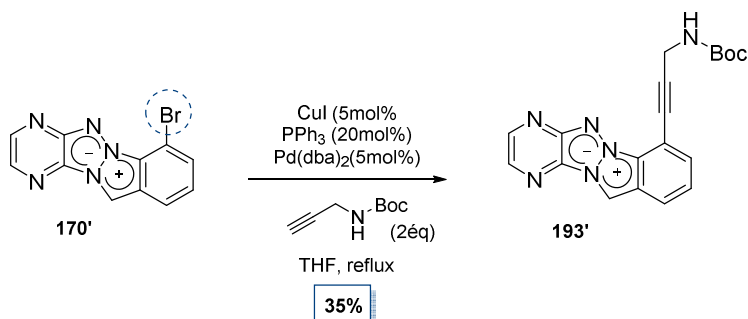
**Figure 158** : Structures générales visées comportant une amine terminale protégée.

Le couplage de Sonogashira est appliqué dans un premier temps sur les fluorophores tricycliques iodés (**69**) et (**74**) dans les conditions développées précédemment (*Schéma 122*). Ainsi la fonctionnalisation du composé (**74**) avec la *N*-Boc-propargylamine permet d'obtenir un nouveau composé fluorescent (**191**) avec un rendement de 37%, résultat modeste dû à la réaction parasite de déshalogénéation. La réaction de couplage sur le deuxième dérivé iodé (**69**) a mieux fonctionné, permettant d'accéder au produit souhaité (**192**) avec un meilleur rendement après seulement 2 h de réaction.



**Schéma 122** : Fonctionnalisation des fluorophores tricycliques avec des bras espaceurs.

Le couplage du dérivé bromé (**170'**) a nécessité un système catalytique différent et des températures plus élevées pour obtenir le composé (**193'**) avec un rendement de seulement 35% (*Schéma 123*).

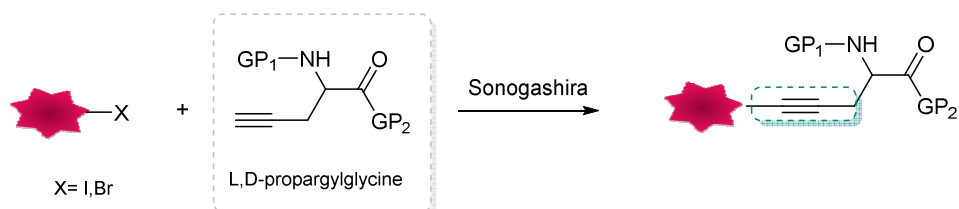


**Schéma 123** : Fonctionnalisation du composé (**170'**) avec un bras espaceur.

La prochaine étape sera de réduire la triple liaison et d'envisager la déprotection des fonctions amines.

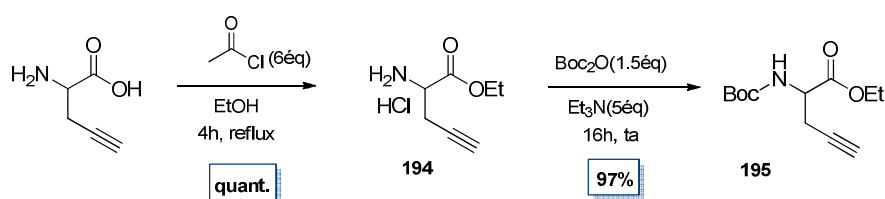
## 1.2. Fonctionnalisation avec des amino-acides

De la même manière, nous avons cherché à coupler la L,D-propargylglycine protégée (*Figure 160*). Après la déprotection de l'acide aminé, ce type de marqueur fluorescent pourrait être très facilement intégré sur une séquence peptidique, afin d'obtenir un oligopeptide fluorescent.



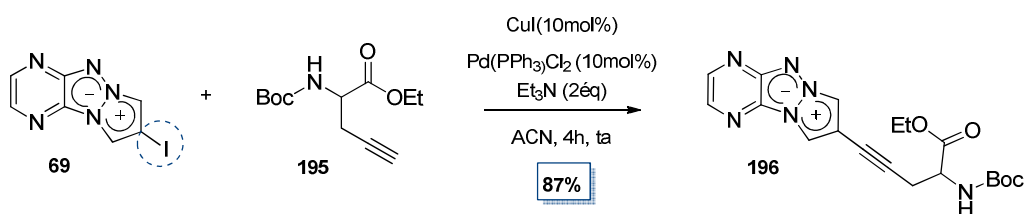
**Figure 159 :** Structures générales visées comportant un acide aminé terminal protégé (ici GP : groupement protecteur).

Pour préparer la L,D-propargylglycine protégée, nous avons suivi une méthode issue de la littérature.<sup>174</sup> La glycine attendue (**195**) est obtenue avec un excellent rendement de 97% sur deux étapes (*Schéma 124*).



**Schéma 124 :** Synthèse du L,D-propargyl glycine diprotégé.

Par la suite, ce composé est engagé efficacement dans un couplage de Sonogashira, aboutissant à la formation d'un composé jaune fluorescent (**196**) (*Schéma 125*).



**Schéma 125 :** Synthèse du composé (**196**).

Une fois de plus, la réaction a permis d'accéder aux composés désirés avec un excellent rendement en seulement 4h. Nous avons ensuite envisagé de réaliser quelques essais de réduction de la triple liaison (*Schéma 126*).

<sup>174</sup> Do, Q. Q. T. *et al.* Benzimidazole or indole amides as inhibitors of pin1. (2006) WO2006040646 (A1)

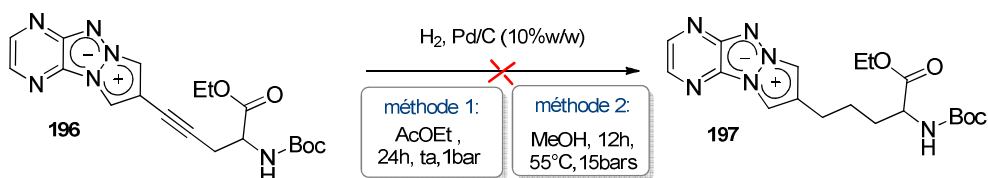
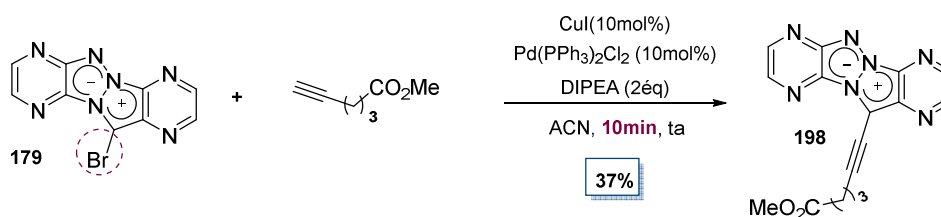


Schéma 126 : Essais de réduction de la triple liaison.

Les divers essais de réduction de la triple liaison par des voies classiques (catalysée par Pd/C en présence de H<sub>2</sub>, sous pression atmosphérique, ou dans une autoclave avec une pression de 15 bar à 55°C) n'ont pas permis de réduire l'alcyne. Dans les deux cas, seuls le produit de départ est récupéré.

### 1.3. Fonctionnalisation avec des esters

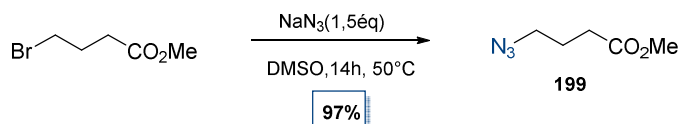
Le composé rouge (**179**) a ensuite été fonctionnalisé *via* le couplage de Sonogashira en présence du méthyle 5-hexynoate commercial (Schéma 127).

Schéma 127 : Obtention du composé (**198**).

La réaction est extrêmement rapide avec une conversion totale en moins de 10 min à température ambiante. Le composé souhaité (**198**) est obtenu avec un rendement modeste de 37%.

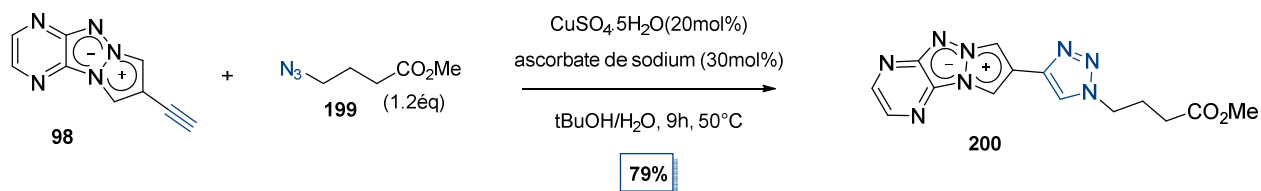
### 1.4. Réaction "click"

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'introduction des bras espaceurs *via* la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen. Le potentiel de cette réaction « click » a été brièvement exploré sur une de nos molécules comportant un alcyne vrai (**98**). Pour ce faire nous avons tout d'abord synthétisé l'azoture lié à une chaîne carbonée comportant un ester terminal (Schéma 128). L'azoture souhaité (**199**) est obtenu à partir de son analogue bromé commercial, et isolé avec un excellent rendement.<sup>175</sup>

Schéma 128 : Synthèse du méthyl 4-azidobutanoate (**199**).

<sup>175</sup> F. Narjes *et al.* Macrocyclic and 7-aminoalkyl-substituted benzoxazocines for treatment of hepatitis c infections. (2010) WO2010082050 (A1).

Une fois l'azoture obtenu, il est engagé dans la réaction de cycloaddition en présence du triazapentalène tricyclique (**98**). La réaction est réalisée en présence d'ascorbate de sodium et du sulfate du cuivre dans un mélange *tert*-butanol/eau (*Schéma 129*).<sup>176</sup> Le produit du couplage est isolé avec un rendement très satisfaisant de 79%.



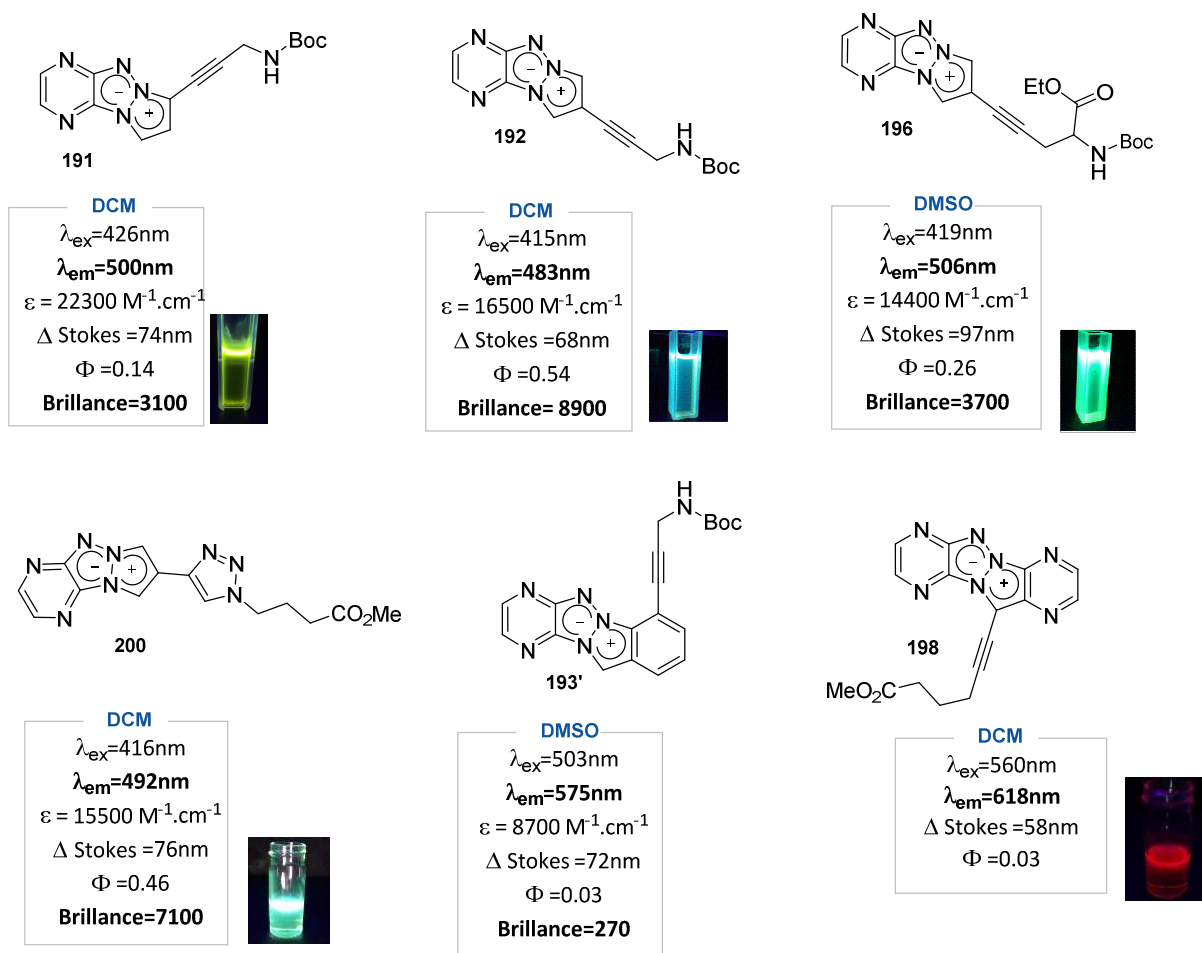
**Schéma 129** : Chimie « click » appliquée aux triazapentalènes.

Avec ce premier résultat nous avons validé la méthode pouvant être utilisée par la suite sur d'autres triazapentalènes comportant des alcynes vrais.

<sup>176</sup> Oba, M. *et al.* Helical Peptide-Foldamers Having a Chiral Five-Membered Ring Amino Acid with Two Azido Functional Groups. *J. Org. Chem.* **79**, 9125–9140 (2014).

## 2. Analyses photophysiques

Parmi les composés obtenus précédemment, nous disposons de 5 composés tricycliques émettant dans le vert (**191**, **192**, **196** et **200**) ainsi que deux structures tétracycliques émettant dans l'orange (**193'**) et une dans le rouge (**198**). Les résultats des analyses photophysiques réalisés dans le DMSO ou dans le DCM sont représentés dans la *Figure 160*.



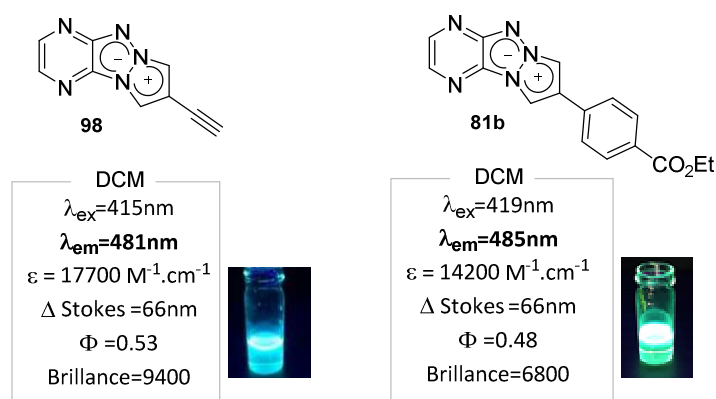
**Figure 160** : Exemples de marqueurs fluorescents pour les application dans la bioconjugaison.

Les composés tricycliques verts fluorescents montrent des longueurs d'onde d'émission comprises entre 483 nm et 506 nm, des déplacements de Stokes de 68 nm à 97 nm, et des valeurs de brillance comprises entre 3100 et 8900. Parmi ces quatre composés, les deux structures qui se distinguent sont la structure (**192**) avec le bras espaceur lié *via* un alcyne et la molécule (**200**) issue de la réaction « click ». Leurs caractéristiques photophysiques intéressantes montrent l'effet bénéfique de la triple liaison et du triazole. Il est donc préférable de ne pas réduire la triple liaison.

Quant aux deux composés tétracycliques, les mesures montrent d'excellents résultats en terme de longueurs d'onde d'émission, car nous obtenons une valeur de 575 nm pour le composé (**193'**) et 618 nm pour l'analogue polyazoté (**198**). En revanche, les autres paramètres comme le

rendement quantique et la brillance ont considérablement baissé. Ainsi, nous obtenons une brillance de seulement 270 pour le composé (**193'**) avec un rendement quantique de 3% dans les deux cas. Le coefficient d'extinction molaire du composé rouge (**198**) n'a pas pu être calculé par manque de produit. Malgré la baisse du rendement quantique des composés émettant dans le rouge, les résultats préliminaires montrent que ces composés ont un potentiel comme sondes fluorescentes. Les composés émettant dans le domaine du vert se montrent quant à eux brillants et stables.

D'autres composés synthétisés précédemment peuvent aussi servir pour d'éventuelles réactions de bioconjugaison (*Figure 161*).



**Figure 161 :** Autres sondes fluorescentes candidates pour la bioconjugaison.

Il s'agit notamment du composé (**98**) qui peut être engagé dans une réaction « click » en présence de biomolécules comportant des azotures, et le composé (**81b**) susceptible d'être transformé en ester activé

### Conclusion et Perspectives

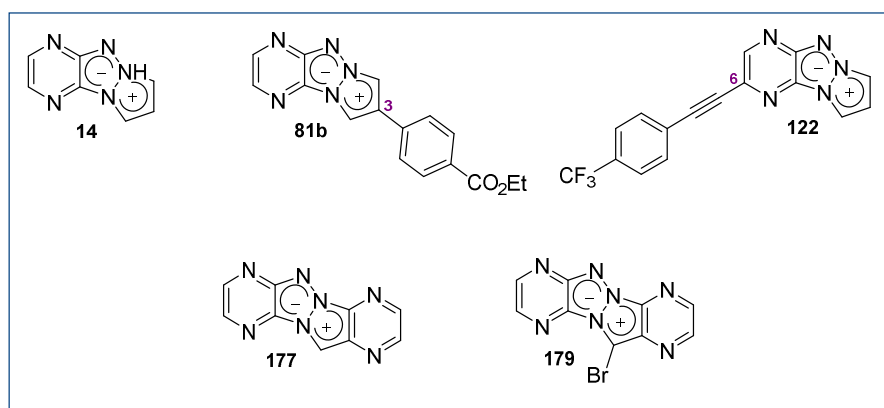
A l'aide de diverses techniques de synthèse, nous avons pu synthétiser quelques molécules fluorescentes comportant des points d'ancrages de type amine, ester et aminoacide sous leurs formes protégées. La prochaine étape du projet sera d'envisager leur déprotection pour pouvoir utiliser ces composés dans le marquage des biomolécules et d'étudier leur fluorescence *in vivo*.

## Chapitre 2: Application des triazapentalènes dans l'imagerie cellulaire

### 1. Quelques résultats en imagerie cellulaire

Les composés présentant à priori les meilleures propriétés spectroscopiques ont été sélectionnés pour réaliser des tests de fluorescence en milieu cellulaire. Les résultats présentés ci-après sont le fruit d'une collaboration avec l'équipe de Pr Stéphane Petoud et Dr Svetlana Eliseeva, les tests cellulaires ayant été réalisés au CBM par le Dr. Ivana Martinic.

Les quelques images reportées dans cette dernière partie sont obtenues avec les composés suivants :



**Figure 162 :** Composés retenus pour les tests de fluorescence *in cellulo*.

Nous avons choisi d'utiliser 3 composés émettant dans le vert de la série tricyclique des PyTAP. Il s'agit du composé tricyclique de référence pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène (**14**) ainsi que de ces deux analogues fonctionnalisés en C<sup>3</sup> (**81b**) et C<sup>6</sup> (**122**). Les deux derniers composés (**177** et **179**) retenus, appartiennent à la famille des structures tétracycliques émettant dans le rouge.

#### 1.1. La microscopie à épifluorescence

Les analyses de fluorescence sur les cellules ont été réalisées par microscopie à épifluorescence. Des cellules HeLa (Cellules du Cancer du Col de l'Utérus), lignée cellulaire obtenue chez ATCC (Molsheim, France) sont cultivées dans un milieu de culture DMEM, a supplémenté de 10 % de sérum de veaux fetal inactivé par la chaleur (FBS), 1% d'une solution des acides aminés non essentiels, 1% de L-glutamine (GlutaMAX) et 1% d'antibiotiques (streptomycine/ penicilline). Les cellules sont cultivées sur des lamelle compartimentée Nunc™ Lab-Tek™(Nunc, Dutsher S.A., Brumath, France) ensemence à une densité de  $6 \times 10^4$  cellules/compartiment et à 37°C dans une atmosphère de CO<sub>2</sub> humidifié à 5%.

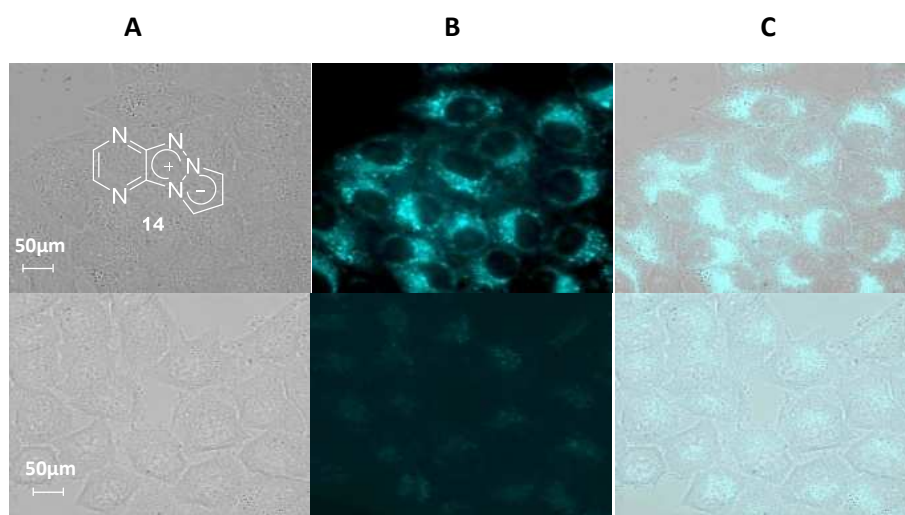
Après 24h, le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées 2 fois avec une solution de OPTIMEM (à température ambiante) et sont incubées avec les composés (**14**) (**81b**) (**122**) et (**179**)

pendant 1h30 et avec le composé (**177**) pendant 1h et 2h. Avant l'acquisition avec le microscope à épifluorescence, les cellules sont lavées 3 fois avec une solution OPTIMEM (à température ambiante). Les cellules ont été observées par un microscope à fluorescence inversé Zeiss Axio Observer Z1 équipé d'une caméra CDD à haute résolution Orca-R2 et le logiciel d'acquisition Axiovision. La source de lumière est une lampe Zeiss HXP 120 à halogénure de mercure, combinée avec des filtres correspondants.

Pendant les tests de photostabilité réalisés par microscopie à épifluorescence, les cellules cancéreuse HeLa marquées avec les fluorophores présentés dans la *figure 24* et le MitoTracker CH-H2XR0S) utilisé comme fluorophore de contrôle, ont été irradiées avec les lampes correspondantes pendant 8 min, les images étant capturés chaque 5 sec avec les filtres correspondants.

#### a) Résultats de l'imagerie cellulaire

L'analyse du composé (**14**) non fonctionnalisé et amphiphile dévoile une très bonne pénétration et distribution cellulaires, mais aussi un signal de fluorescence intense, convenable pour éclipser le signal d'auto-fluorescence (*Figure 164*).

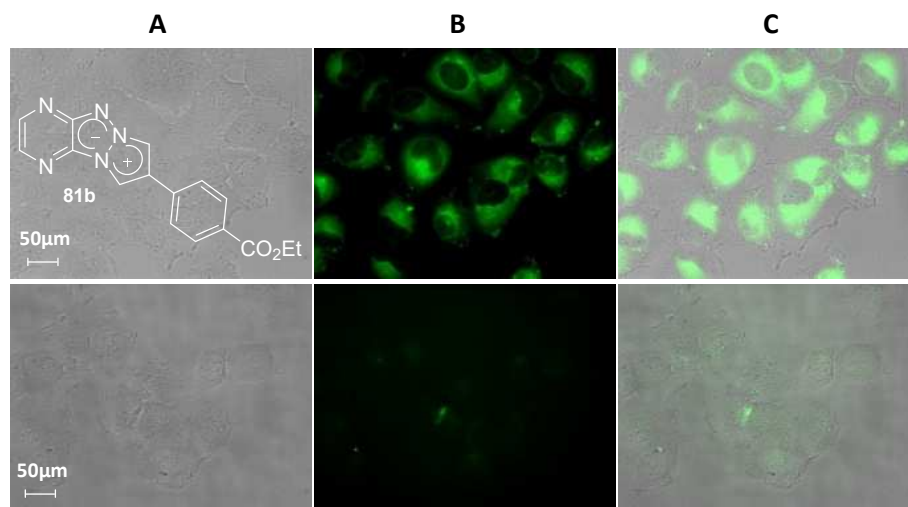


**Figure 163** : Résultats de la microscopie à épifluorescence sur des souches de cellules HeLa. (En haut) après 1h30 d'incubation avec une solution de (**14**) de 60µg/mL. (A) «Brightfield », (B) émission du composé (**14**) ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 417 nm / 60 nm ;  $\lambda_{\text{em}}$  = 536 nm / 40 nm, temps exposition de 1 s), (C) image fusionnée : émission du composé (**14**) et « brightfield ». (En bas) Les cellules non traitées. Objectif de 40x.

Les images montrent également une répartition du fluorophore (**14**) dans le cytoplasme et suggère une localisation dans les lysosomes. Pour confirmer cette observation, des tests de co-localisation avec des LysoTracker seraient indispensables. De plus, l'incubation en présence du pyrazino-1,3a-6a-triazapentalène à des concentrations comprises entre 30 à 60 µg/mL ne semble pas induire de modification dans la morphologie de cellules. Ceci pourrait se traduire par une bonne compatibilité avec les milieux biologiques et indiquer une faible toxicité de nos fluorophores.

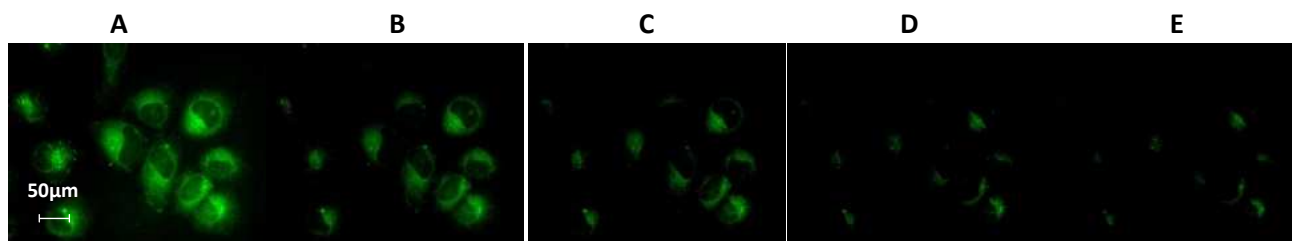


Le composé (**81b**) fonctionnalisé avec un phényle est aussi localisé dans le cytoplasme, la pénétration dans le noyau n'est pas constatée (*Figure 165*).



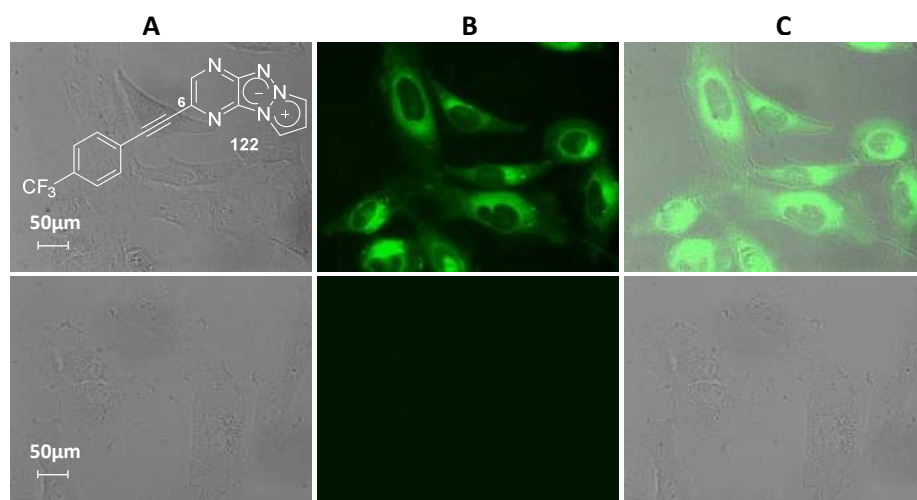
**Figure 164** : Résultats de la microscopie à épifluorescence sur des souches de cellules HeLa. (En haut) après 1h30 d'incubation avec une solution de (**81b**) de 30  $\mu\text{g/mL}$ . (A) «Brightfield », (B) émission du composé (**81b**) ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 414 nm / 46 nm ;  $\lambda_{\text{em}}$  = 536 nm / 40 nm, temps exposition de 500 ms), (C) image fusionnée : émission du composé (**81b**) et « brightfield ». (En bas) Les cellules non traitées. Objectif de 40x.

L'analyse de photostabilité du composé (**81b**) montre une perte de fluorescence significative au bout de 100 secondes. La perte quasi complète de l'intensité de fluorescence est constatée après 480 secondes d'irradiation continue (*Figure 166*).



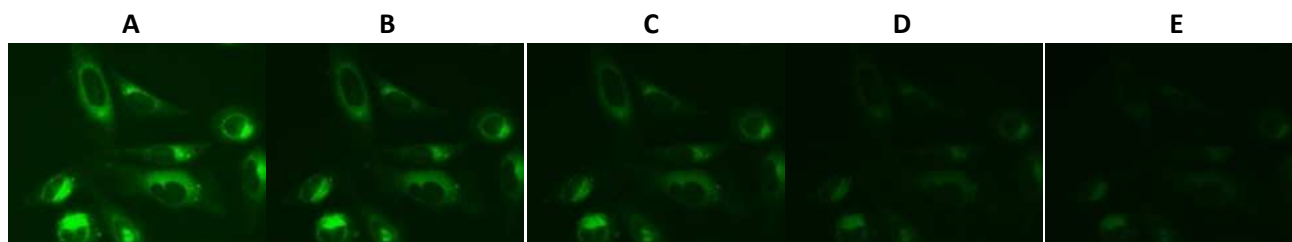
**Figure 165** : Résultats des tests de photoblanchiment sur des cellules HeLa après 1h30 d'incubation avec une solution de (**81b**) de 30  $\mu\text{g/mL}$  et après une irradiation continue à 414 nm, avec une fente de 46 nm à des temps différents : (A) 0 s, (B) 30 s, (C) 100 s, (D) 155 s, (E) 480 s. (**81b**) ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 414 nm / 46 nm ;  $\lambda_{\text{em}}$  = 536 nm / 40 nm, temps exposition de 500 ms), Objectif de 40x.

Alors que dans les deux premiers cas les cellules marquées ont été excités à des longueurs d'onde respectives de 417 nm et 414 nm, dans le cas du composé (**122**) l'excitation est réalisée à une longueur d'onde moins énergétique, soit à 485 nm (*Figure 167*). Ce décalage vers le rouge des longueurs d'onde d'excitation est bénéfique car moins dangereux pour les tissus biologiques et engendre de plus un faible signal d'auto fluorescence. Comme précédemment, le composé (**122**) est reparti dans le cytoplasme de manière homogène sans induire d'effets néfastes sur les cellules vivantes. Son caractère brillant constaté lors des analyses spectroscopiques en cellule de mesure est également un atout ici, car il est utilisé à de très faibles concentrations (10  $\mu\text{g/mL}$ , soit 3 fois et 6 fois moins importante que les deux cas précédents).



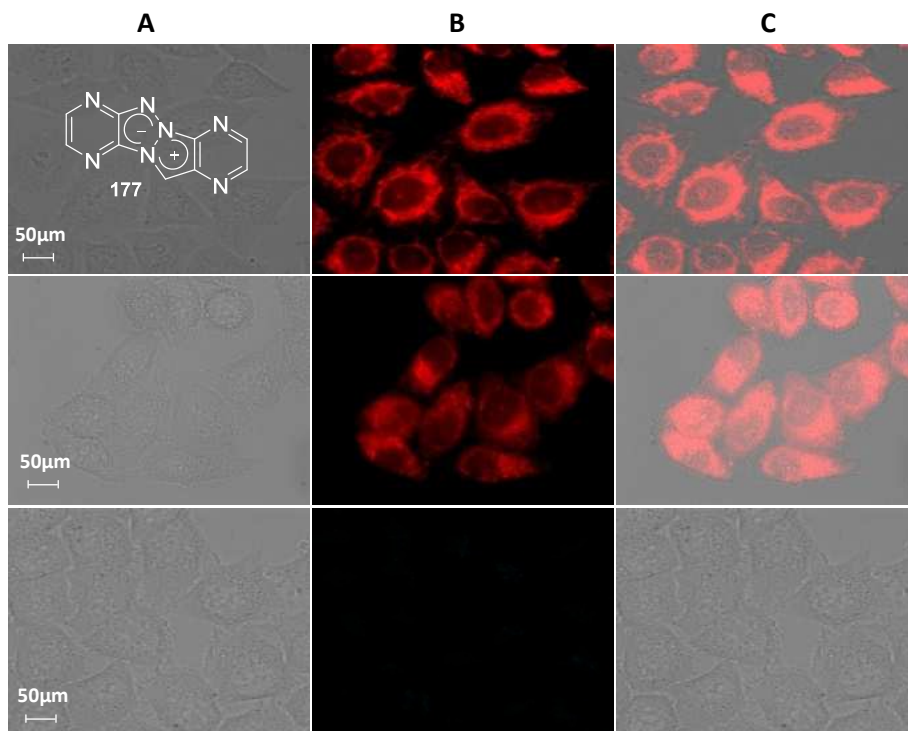
**Figure 166** : Résultats de la microscopie à épifluorescence sur des souches de cellules HeLa. (En haut) après 1h30 d'incubation avec une solution de (**122**) de 10µg/mL. (A) «Brightfield », (B) émission du composé (**122**) ( $\lambda_{\text{ex}}$ =485 nm/20 nm ;  $\lambda_{\text{em}}$ =525 nm/ 50nm, temps exposition de 300 ms), (C) image fusionnée : émission du composé (**122**) et « brightfield ». (En bas) Les cellules non traitées. Objectif de 40x.

Les analyses de photostabilité (*Figure 168*) montrent une perte de fluorescence avec une importante atténuation après 45s d'irradiation continue.



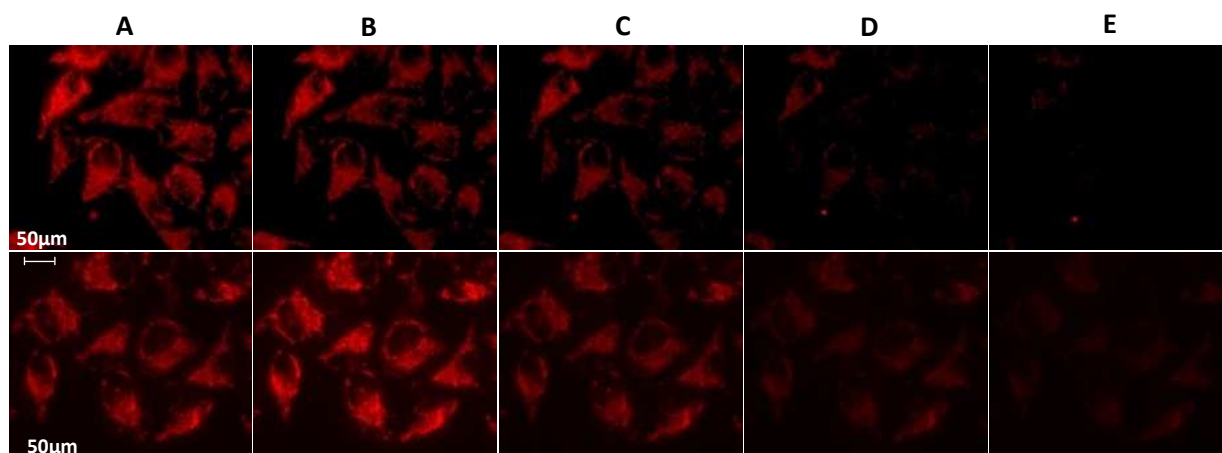
**Figure 167** : Résultats des tests de photoblanchiment sur des cellules HeLa après 1h30 d'incubation avec une solution de (**122**) de 10 µg/mL et après une irradiation continue à 485 nm, avec une fente de 20 nm à des temps différents : (A) 0 s, (B) 25 s, (C) 45 s, (D) 100 s, (E) 185 s. (**122**) ( $\lambda_{\text{ex}}$ =485 nm/20 nm ;  $\lambda_{\text{em}}$ = 525 nm/50nm, temps exposition de 300 ms), Objectif de 40x.

Des résultats plus intéressants sont obtenus lors de l'analyse du composé tétracyclique (**177**) émettant dans le rouge (*Figure 169*). Un signal de fluorescence bien marqué est constaté à une concentration assez basse de 20 µg/mL. Comme présenté dans la figure ci-dessous, il est intéressant de constater qu'après 1 h d'incubation (*Figure 169 : en haut*) le composé fluorescent semble être réparti essentiellement dans les mitochondries. Alors qu'après une incubation plus prolongée de 2h (*Figure 169 : au milieu*) le fluorophore migre dans les lysosomes. Comme précédemment, cette observation devra être confirmée par des tests complémentaires. Toutefois, ce résultat semble très intéressant car il montre la participation de ce fluorophore dans la dynamique cellulaire.



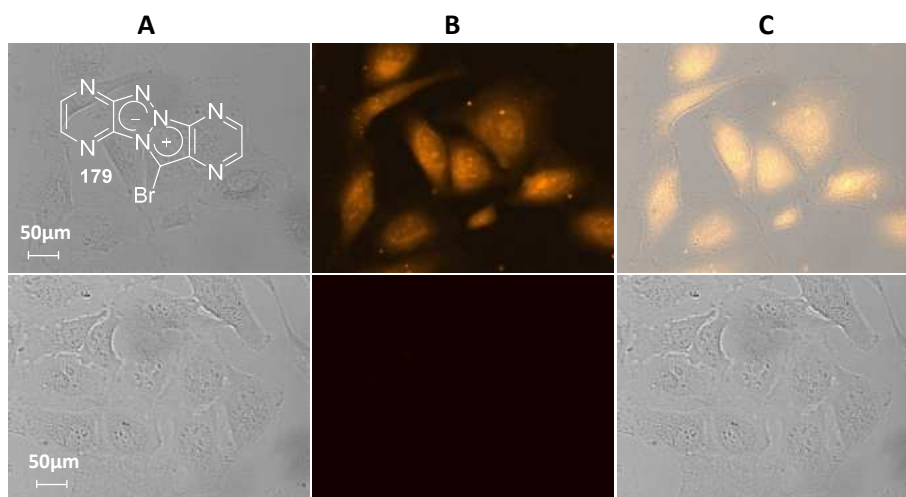
**Figure 168 :** Résultats de la microscopie à épifluorescence sur des souches de cellules HeLa. (En haut) après 1h d'incubation avec une solution de (**177**) de 20µg/mL. (Au milieu) après 2h d'incubation avec une solution de (**177**) de 20µg/mL. (A) «Brightfield », (B) émission du composé (**177**) ( $\lambda_{\text{ex}}$ = 550 nm/25 nm ;  $\lambda_{\text{em}}$ =605 nm/ 70nm, temps exposition de 1s), (C) image fusionnée : émission du composé (**177**) et « brightfield ». (En bas) Les cellules non traitées. Objectif de 40x.

Le test de photoblanchiment du composé (**177**) a été réalisé et comparé avec un MitoTracker commercial **CH-H2XROS** ayant des longueurs d'onde d'excitation et émission similaires à celles du composé analysé. Comme montré dans la *figure 31* la photostabilité des deux composés est quasi-équivalente. La perte quasi-totale de la fluorescence dans les deux cas est constatée après 75 secondes d'irradiation continue à 536 nm.



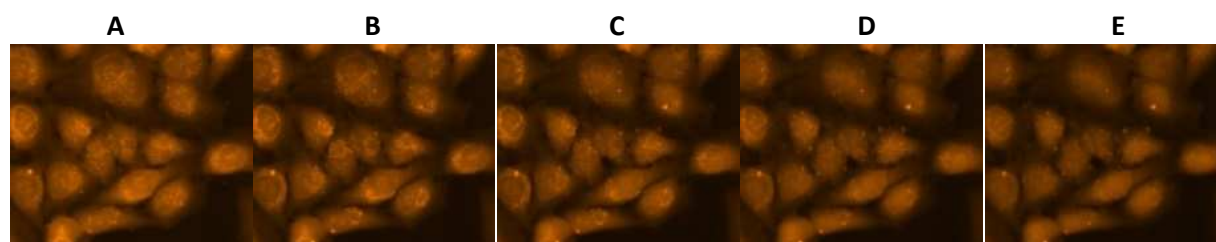
**Figure 169 :** Résultats des tests de photoblanchiment sur des cellules HeLa après 1h d'incubation avec une solution de (**177**) de 20 µg/mL (en haut) ou avec une solution de MitoTracker CH-H2XROS à 25 nM (en bas) après une irradiation continue à 536 nm, avec une fente de 40 nm à des temps différents : (A) 0 s, (B) 15 s, (C) 25 s, (D) 50 s, (E) 75 s. (**177**) et le MitoTracker CH-H2XROS : ( $\lambda_{\text{ex}}$ =550nm, fente de 25nm ;  $\lambda_{\text{em}}$ = 605 nm, fente de 70nm, temps exposition de 800 ms), Objectif de 63x.

Enfin, le dernier composé, le tétracycle bromé (**179**) contrairement aux autres cas, semble se répartir dans tous les compartiments de la cellule. La répartition relativement homogène suggère une pénétration cellulaire et non un recouvrement de la surface cellulaire. Une observation plus minutieuse montre une accumulation possible dans les nucléosomes (*Figure 171*). Pour confirmer ces hypothèses des tests de colocalisation ainsi que des analyses à l'aide d'un microscope confocal seraient nécessaires.



**Figure 170** : Résultats de la microscopie à épifluorescence sur des souches de cellules HeLa. (En haut) après 1h30 d'incubation avec une solution de (**179**) de 50 μg/mL. (A) «Brightfield », (B) émission du composé (**179**) ( $\lambda_{\text{ex}}$ = 536 nm/40 nm ;  $\lambda_{\text{em}}$ =593 nm/ 40nm, temps exposition de 800 ms), (C) image fusionnée : émission du composé (**179**) et « brightfield ». (En bas) Les cellules non traitées. Objectif de 40x.

En plus de leurs excellentes propriétés de diffusion cellulaire, ce composé présente une photostabilité remarquable (*Figure 172*). A titre de comparaison, l'Alexa Fluor 568 reconnu pour son excellente photostabilité, perd 50% de son caractère fluorescent en 5 minutes. Dans notre cas, les résultats préliminaires montrent une photostabilité quasi constante durant les 8 minutes d'expérience. Allié aux autres propriétés photophysiques, cette stabilité fait de ce composé un excellent candidat pour une valorisation en tant que biomarqueur. Des analyses supplémentaires sont en cours afin de quantifier précisément ces résultats.<sup>177</sup>



**Figure 171** : Résultats des tests de photoblanchiment sur des cellules HeLa après 1h30 d'incubation avec une solution de (**xx5**) de 50 μg/mL et après une irradiation continue à 536 nm, avec une fente de 40 nm à des temps différents : (A) 0 s, (B) 110 s, (C) 250 s, (D) 350 s, (E) 480 s. (**xx**) ( $\lambda_{\text{ex}}$ =436 nm, fente de 40 nm ;  $\lambda_{\text{em}}$ = 593 nm, fente de 40nm, temps exposition de 800 ms), Objectif de 40x.

<sup>177</sup> Mahmoudian, J. *et al.* Comparison of the Photobleaching and Photostability Traits of Alexa Fluor 568- and Fluorescein Isothiocyanate- conjugated Antibody. *Cell J.* **13**, 169–72 (2011).

### Conclusion

A travers ces résultats biologiques nous avons montré que les dérivés tricycliques ou tétracycliques des triazapentalènes synthétisés durant cette thèse sont des candidats prometteurs pour des applications dans l'imagerie cellulaire. Dans un premier temps, leur caractère amphiphile leur confère une excellente pénétration et diffusion dans différents compartiments de la cellule. De plus, aucun des composés analysés ne semble pas induire des effets de toxicité ou de modification de la morphologie cellulaire. Il a été également montré qu'en fonction de la structure du fluorophore utilisé leur distribution peut varier. Ainsi, nous avons obtenus des composés qui se sont diffusés dans le cytoplasme avec des localisations plus spécifiques dans les mitochondries ou les lysosomes, ou même dans le noyau cellulaire. Mais le plus important résultat concerne la photostabilité de ces composés. En effet, malgré une photostabilité moyenne dans quelques cas, un des composés (**179**) s'est montré extrêmement stable, un résultat très encourageant et qui pourrait être valorisé par la suite.



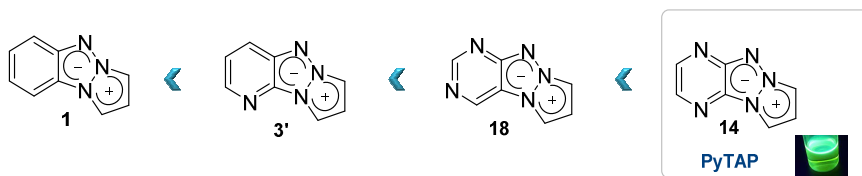
## Conclusion générale

Depuis une vingtaine d'années, la fluorescence est devenue un outil incontournable dans l'étude du vivant. Cette approche connaît de nombreuses applications dans divers domaines de la biologie, notamment en imagerie cellulaire. L'importance capitale de cette dernière a été illustrée par deux prix Nobel, en 2008 pour la découverte de la Green Fluorescent Protein (GFP), et en 2014, leurs avancées dans le domaine de la microscopie à fluorescence à très haute résolution.

Parmi les nombreux marqueurs fluorescents existants, les fluorophores organiques occupent une place importante dans l'imagerie cellulaire. Malgré les divers progrès et optimisation structurales, cette famille de fluorophores se heurte encore à quelques limitations, comme une faible résistance au photoblanchiment, de faibles déplacements de Stokes, une faible solubilité dans l'eau ainsi que des coûts élevés.

Dans notre quête pour la conception d'une nouvelle famille de fluorophores organiques inédits possédant des propriétés de fluorescence alternatives et/ou complémentaires aux fluorophores usuels nous nous sommes tournés vers la famille des azapentalènes.

Basés sur l'expérience du laboratoire dans la synthèse des hétérocycles polyazotés, nous nous sommes intéressés aux triazapentalènes fusionnés à des noyaux (hétéro)aromatiques. Après la synthèse de ces différents squelettes tricycliques, nous avons identifié le tricycle pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène (PyTAP) comme présentant le caractère fluorescent le plus prometteur.



**Figure 172 :** Evolution des propriétés de fluorescence en fonction du nombre et de la position d'azotes.

Nous avons montré que le PyTAP possède un rendement quantique de 15 % dans le DMSO et de 42% dans le DCM, ainsi qu'une longueur d'onde d'émission supérieure à 500nm. De plus, cette structure présente un caractère amphiphile marqué, un solvatochromisme positif et une bonne stabilité chimique.

Motivés par ces résultats, nous avons poursuivi nos études avec la fonctionnalisation de ce motif tricycliques *via* des réactions de couplage dans le but d'explorer tout le potentiel de ces composés. Les outils de la synthèse organique moderne comme les réactions métallo-catalysées ont permis au travers des réactions de couplage de type Suzuki-Miyaura, Sonogashira, d'obtenir une librairie avec de nouveaux fluorophores émettant dans le vert et jaune.

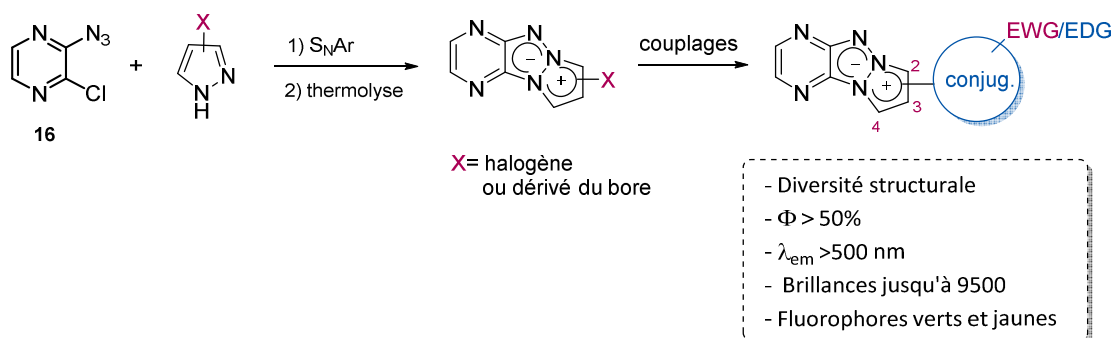


Figure 173 : Fonctionnalisation du PyTAP sur le noyau azolique.

Les meilleurs résultats photophysiques sont obtenus avec le noyau pyrazinotriazapentalène fonctionnalisés par un noyau aromatique ou par un alcyne. Dans les cas des aryl-PyTAPs les propriétés spectroscopiques sont fonction de la nature des aryles greffés sur la position  $C^3$  du PyTAP, avec des rendements quantiques qui varient de 16 à 52%. De bien meilleures brillances et rendements quantiques, entre 51 et 58 %, sont obtenus avec les dérivés d'alcynes. Dans cette partie, nous avons mis en évidence que la fonctionnalisation du pyrazino-1,3a,6a-triazapentalène avec une extension de la conjugaison sur le noyau azolique est bénéfique pour les propriétés de fluorescence.

Pour accéder aux noyaux tricycliques fonctionnalisés sur la pyrazine, il a été nécessaire de mettre au point la synthèse des PyTAP halogénés dans le but de procéder aux couplages organo-métalliques. Une fois en main, l'utilisation des couplages de Sonogashira, Suzuki-Miyaura et de Stille nous a permis de synthétiser une petite librairie de molécules inédites présentant des propriétés spectroscopiques.

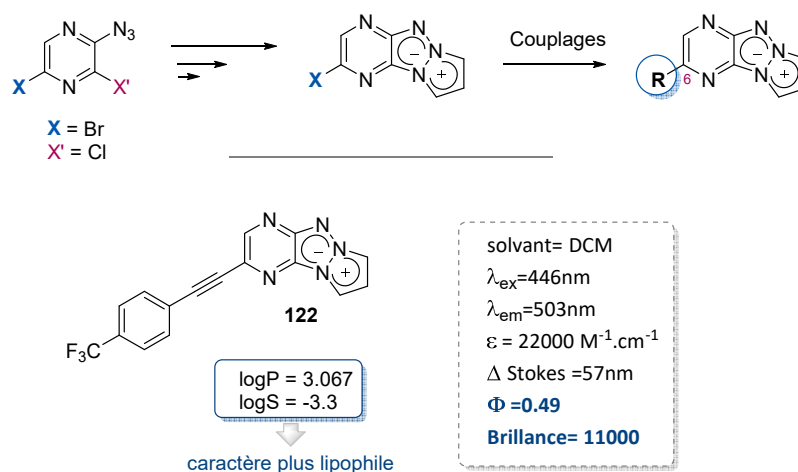


Figure 174 : Fonctionnalisation du PyTAP sur le noyau pyrazinique.

Sur l'ensemble des composés synthétisés, la meilleure brillance a été observée pour le composé (122). De plus, la présence d'atomes de fluor sur cette structure a pour effet de renforcer son caractère lipophile, qui pourrait être utile dans des applications *in vivo*.



Ayant en possession plusieurs fluorophores émettant dans le vert et le jaune, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux dérivés émettant dans le rouge, propriété encore plus adaptée pour l'imagerie cellulaire. Pour ce faire, nous nous sommes tournés vers l'extension de la conjugaison *via* la fusion d'un nouvel hétérocycle d'un côté ou de l'autre du noyau PyTAP. Ainsi, nous avons pu accéder à une large gamme de structures polyconjuguées.

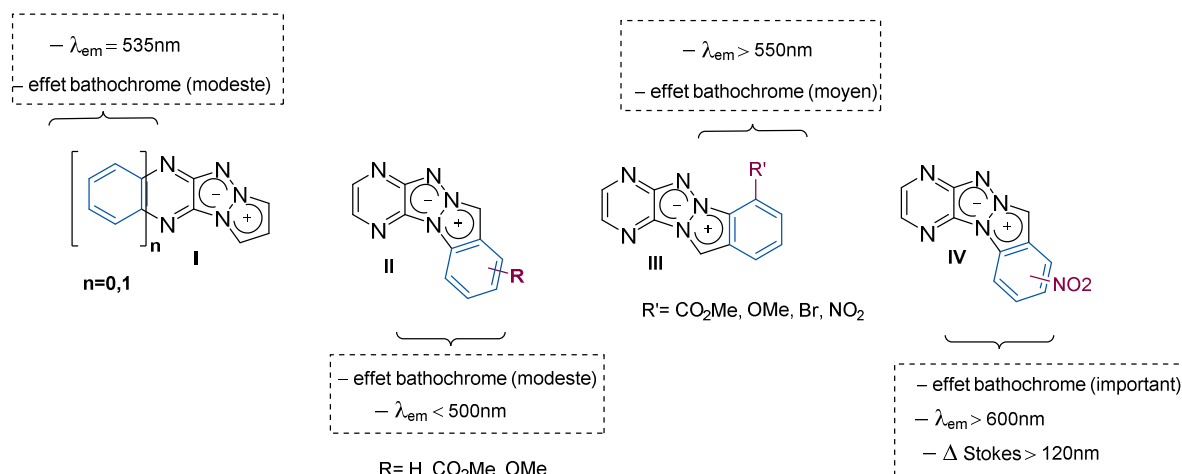


Figure 175 : Synthèse de fluorophores tétracycliques.

L'effet bathochrome recherché allant jusqu'à des longueurs d'ondes d'émissions supérieures à 550 nm est constaté pour les structures tétracycliques linéaires (III) et les structures coudées nitrées (IV). Les rendements quantiques restant modestes dans ces deux séries, nous avons décidé d'étudier l'effet de l'introduction d'une pyrazine à la place du noyau aromatique pour les séries (III) et (IV).

Cette orientation a nécessité le développement d'une méthodologie de synthèse du 4,7-diaza-1H-indazole et l'optimisation de l'étape de substitution nucléophile aromatique sur la 2-azido-3-chloropyrazine. Ces études nous ont permis d'obtenir les deux isomères (172) et (177) présentant des propriétés photophysiques distinctes.

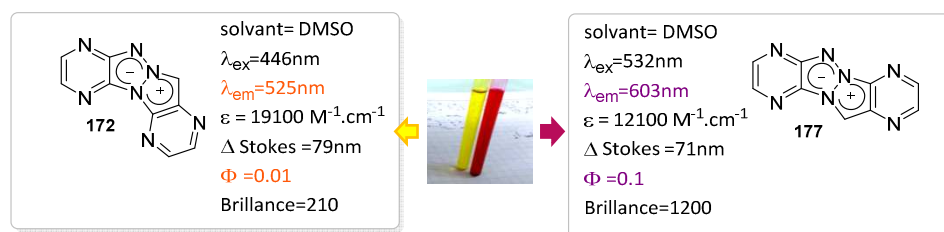
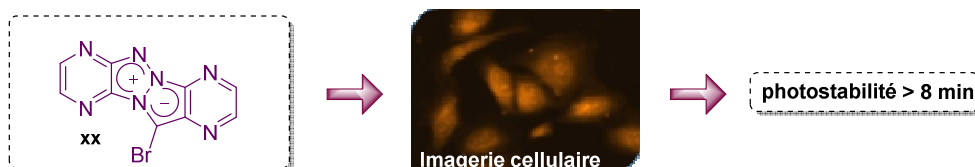


Figure 176 : Synthèse de fluorophores coudés et linéaires.

L'isomère linéaire (177) a révélé être un fluorophore remarquable, avec une émission dans le rouge, un rendement quantique de 10% dans le DMSO (67% dans le DCM), un caractère amphiphile marqué ainsi qu'une stabilité à différent pH. Ce nouveau « hit » nous a encouragés à étudier sa

réactivité vis-à-vis des réactions de bromation, de CH activation ainsi que des couplages organométalliques avec différents groupements aromatiques. Ces diverses modulations nous ont permis de déplacer la longueur d'onde d'émission au-delà de 630 nm, résultat très intéressant toutefois modéré par une diminution du rendement quantique.

Enfin, les composés présentant les meilleures propriétés spectroscopiques ont été sélectionnés pour réaliser des tests de fluorescence et de photostabilité en milieu cellulaire. Leur caractère amphiphile leur confère une excellente pénétration cellulaire ainsi qu'une excellente diffusion dans différents compartiments cellulaires, sans induire de toxicité apparente. Pour finir, le composé **(179)** s'est révélé être extrêmement photostable ( $t > 8\text{min.}$ ), critère d'une importance majeure dans la conception d'édifices fluorescents.



**Figure 177** : Meilleur candidat (photostable) pour l'imagerie cellulaire.

Cette thèse, située à l'interface de la chimie organique, théorique, de la spectroscopie et de la biologie représente le fruit de quelques collaborations qui ont permis de valoriser le potentiel très prometteur des triazapentalènes dans le domaine de la fluorescence. Le travail de cette thèse qui a débuté par la recherche d'un squelette fluorescent, puis sa modulation et enfin l'obtention de composés ayant une fluorescence dans le rouge et leur utilisation dans l'imagerie cellulaire fait l'objet d'un brevet déposé en 2015.

La librairie de molécules fluorescentes obtenues durant ce projet pourra être utilisée par la suite dans le marquage de protéines et d'autres biomolécules, dans la détection des cellules hypoxie avec l'utilisation des triazapentalènes nitrés, ou encore dans la préparation des complexes métalliques fluorescents en utilisant le triazapentalènes polyazotés comme ligands





## Partie expérimentale



### Calcul du rendement quantique : méthode comparative

Pour le calcul du rendement quantique, nous avons utilisé la méthode comparative, dont le principe est détaillé dans le chapitre traitant sur les principes fondamentaux de la fluorescence (partie A/chapitre 1). Ci-dessous est illustré l'équation permettant d'accéder à la valeur du rendement quantique et la représentation graphique de l'intégration de la bande d'émission en fonction de l'intensité d'absorption.

$$\Phi(x) = \Phi(\text{réf}) \frac{K(x)}{K(\text{réf})} \frac{n(x)^2}{n(\text{réf})^2}$$

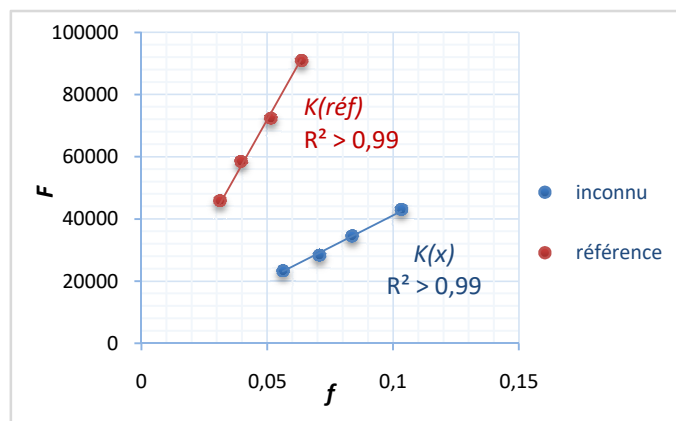


Figure 178 : Aire de la fluorescence en fonction de l'intensité d'absorption.

Avec :  $\Phi(x)$  et  $\Phi(\text{réf})$  : rendements quantique de l'échantillon et la référence ;  $K(x)$  et  $K(\text{réf})$  : valeurs des pentes obtenues en traçant les aires de fluorescence ( $F(x)$  et  $F(\text{réf})$ ) en fonction des intensités d'absorption ( $f(x)$  et  $f(\text{réf})$ ) ;  $n(x)$  et  $n(\text{réf})$  : indices de réfraction des solvants dans lesquels l'analyse a été réalisée.

Il est à noter l'importance de l'utilisation d'une référence dont la longueur d'onde d'excitation est proche de celle du composé analysé, avec de surcroît, une courbe d'émission recouvrant la même gamme. Afin de minimiser les effets de réabsorption,<sup>178</sup> les concentrations de deux fluorophore (analysé et de référence) sont ajustées afin d'obtenir des absorptions comprises entre 0,1 et 0,01.

<sup>178</sup>Dhami, S. et al. Phtalocyanine fluorescence at high concentration: Dimers or reabsorption effect ? *Photochem. Photobiol.* **61**, 341–346 (1995).

Pour le choix de fluorophores de référence, nous nous sommes basés essentiellement sur les travaux de Brouwer.<sup>179</sup> Les trois composés de référence qui ont été retenus pour la détermination des rendements quantiques de nos molécules sont : la *Coumarine 153* (pour les composés verts et jaunes fluorescents) et la *Rhodamine B* et le « Perylene Red » (pour les structures émettant dans la zone de l'orange et rouge) (figure 2).

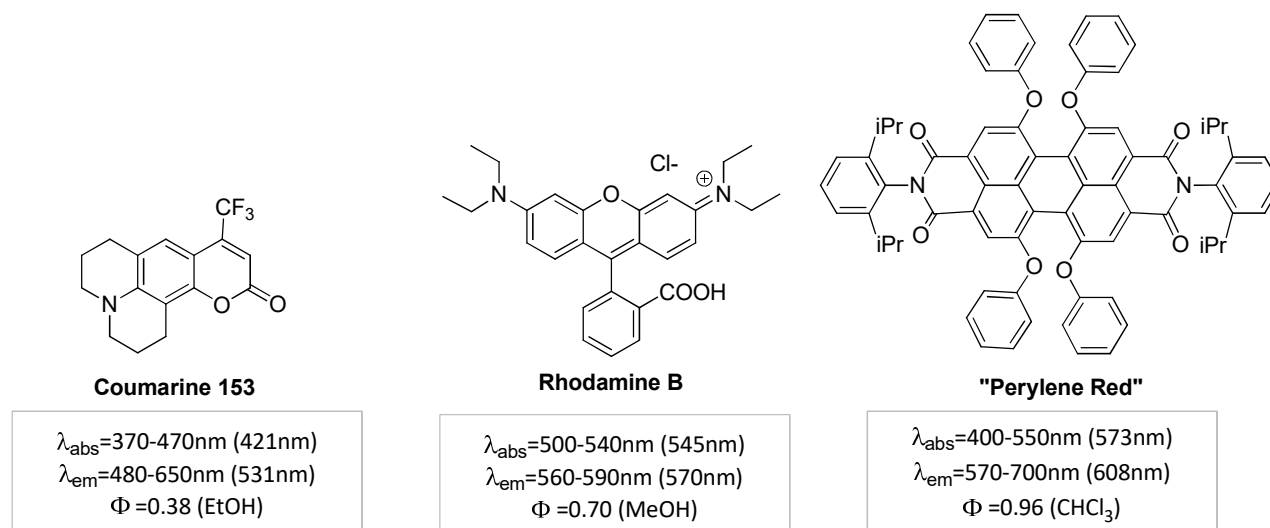
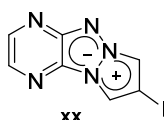


Figure 179 : Références utilisées pour le calcul du rendement quantique.

### ➤ L'incertitude sur la détermination du rendement quantique

Dans le but de montrer l'efficacité de la méthode comparative nous avons réalisé une expérience permettant de déterminer l'erreur expérimentale du rendement quantique. Pour ce faire, l'expérience permettant d'accéder au rendement quantique d'un composé synthétisé (composé choisi (**xx**)) fut réalisée 3 fois. Les résultats, ainsi que l'écart type sont présentés dans le *tableau xx*.

Tableau 29 : Détermination de l'erreur sur le rendement quantique.



	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3
$\Phi(\text{xx})$	0.276	0.273	0.260

Ecart type = 0.0085

Ainsi  $\Phi(\text{xx}) = 0.27 \pm 0.01$

<sup>179</sup>Brouwer, M. & Brouwer, A. M. Title Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report)\*. *Pure Appl. Chem* **83**, 2213–2228 (2011).



Ainsi, nous avons montré la fiabilité de la méthode comparative par une incertitude minimale (un écart type inférieur à 0.01, soit 3% de la valeur globale).

### Réactifs, solvants et gaz inerte

- Les analyses de fluorescence sont réalisées dans des solvants organiques (dichlorométhane, chloroforme, acétonitrile, acétone, méthanol, éthanol, diméthylsulfoxyde) de qualité spectrophotométrique disponibles chez Alfa Aesar. Les tampons utilisés pour des caractérisations spectrales ont le pH = 4.01, pH = 7.4 (PBS : tampon phosphate salin) et pH = 10.00, également disponibles chez Alfa Aesar (conservés à 4°C). Chaque solvant est dégazé pendant 30 minutes à 1 heure avec de l'argon avant l'utilisation pour des analyses photophysiques.
- Les références pour le calcul du rendement quantique sont procurées chez Aldrich (la *Coumarine 153* et la *Rhodamine B*) et chez TCI (« *Perylene Red* »).
- Tous les autres réactifs sont utilisés sans purification à partir des sources commerciales classiques (Aldrich, Strem Chemical, Acros, Alfa Aesar, ThermoFisher, Apollo Scientific, Fluorochem).
- Les solvants utilisés sont de qualité de synthèse sauf spécification contraire. Le dioxane est distillé sur hydroxyde de sodium et le dichlorométhane sur hydrure de calcium. Le toluène, l'acétonitrile et le tétrahydrofurane sont séchés par passage sur la colonne d'une station.
- L'hydrogène et l'argon sont disponibles en routine au laboratoire.

### Purifications et appareils divers

- Les spectres d'absorption sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre « Varian Cary 50 Scan Spectrophotometer » avec des micro-cuves en quartz (Hellma, 104-QS, 10 mm, 1.0 mL).
- Les spectres d'émission et d'excitation sont réalisés avec « Varian Cary Eclipse spectrophotometer » en utilisant des ultra-micro cuves (Hellma, 105.250-QS, 10 × 2 mm, 50 µL).
- Les réactions sous micro-ondes sont effectuées grâce à un appareil *Biotage Initiator System* (puissance maximale : 300W) et Anton Paar Monowave.
- Les chromatographies sur couche mince sont effectuées sur des plaques de silice Merck 60 F<sub>254</sub>, Alumine neutre (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), phase inverse (C<sub>18</sub>). Les plaques sont révélées sous irradiation UV (à 256nm et 360nm) ou par l'utilisation de révélateurs chimiques comme des solutions de permanganate de potassium, ninhydrine, p-anisaldéhyde et vaniline, et d'iode sur silice.

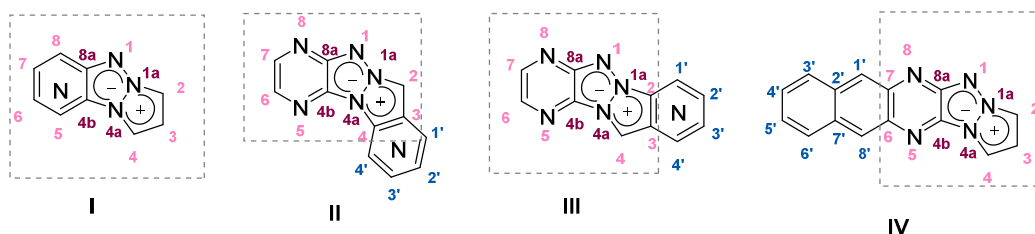
- Les purifications par chromatographie sont réalisées sur des colonnes de gel de silice 60Å (granulométrie : 230-400/ 0,040-0,063 mm).

### Analyses et détermination structurale

- Les analyses de spectroscopie infrarouge sont enregistrées sur un spectromètre Thermo Scientific Nicolet iS10.
- Les points de fusion sont obtenus avec Electrothermal IA 9100 à l'aide de tubes capillaires ouverts.
- Les analyses par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) sont effectuées sur un spectromètre Maxis Bruker 4G.
- Les spectres de résonance magnétique nucléaire  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (1D et 2D) sont réalisés sur un spectromètre Bruker Avance à 250 MHz ( $^{13}\text{C}$ , 62.9 MHz) ou 400 MHz ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz).

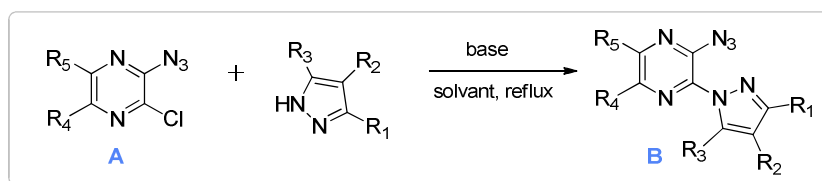
#### • Numérotation des composés

Les principales structures mésoioniques ont été numérotées comme ci-dessous (*figure 180*). Ces numérotations sont choisies pour faciliter l'écriture et ne correspondent pas aux règles IUPAC. Les tétracycles dipyraziniques n'ont pas pu avoir de nomenclature IUPAC, innattribution avec nos logiciels (ChemDraw, AccelrysDraw)

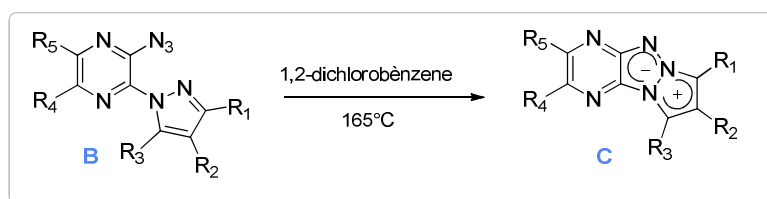


**Figure 180** : Numérotation des divers analogues polycycliques du 1,3a,6a-triazapentalène.

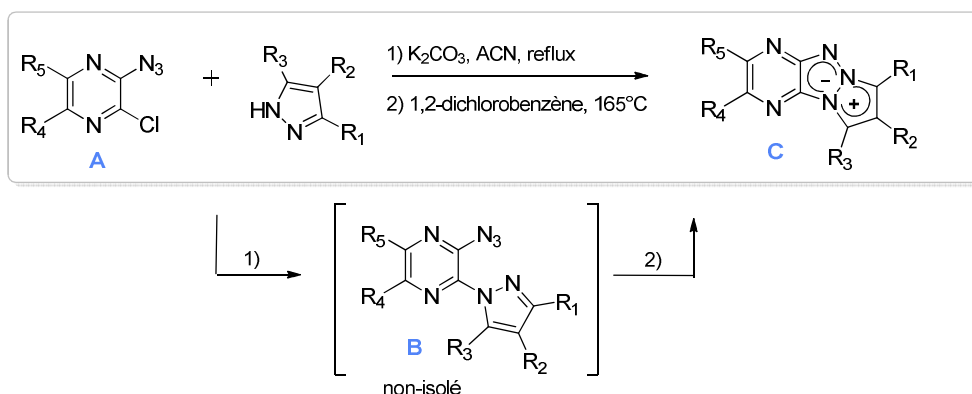
## Procédures générales

**Procédure générale A : Substitution Nucléophile Aromatique**

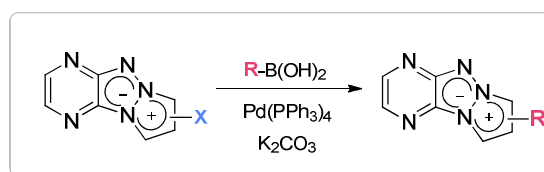
Dans un ballon, placé sous atmosphère d'argon, le nucléophile (1éq.) est solubilisé dans l'acétonitrile anhydre (concentration comprise entre 0.14 et 0.16M). Le carbonate de potassium (2éq.) est ensuite introduit. Après une purge à l'argon et 10 min d'agitation à température ambiante, le dérivé halogéné (**A**) (1éq.) est introduit par petites portions. La suspension obtenue est laissée sous agitation à reflux et sous atmosphère d'argon jusqu'à la consommation totale du dérivé halogéné. Le traitement et les méthodes de purification ont été choisis en fonction des caractéristiques physico-chimiques (polarité, solubilité, stabilité...) de chaque produit.

**Procédure générale B : Thermolyse**

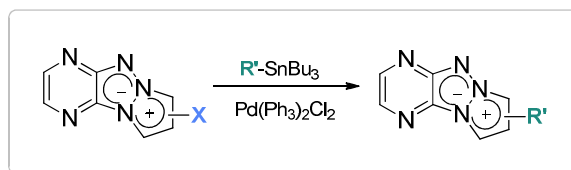
Une solution de l'intermédiaire (**B**) dans le 1,2-dichlorobenzène (concentration comprise entre 0.06 et 0.1M) placée sous atmosphère d'argon est chauffée à 165°C jusqu'à la consommation totale du réactif de départ. Après retour à température ambiante, le solvant est éliminé soit par évaporation sous pression réduite, soit par filtration sur gel de silice en utilisant des solvants apolaires comme l'éther de pétrole ou le cyclohexane. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice.

**Procédure générale C :  $SN_{Ar}$ /Thermolyse en « one-pot »**

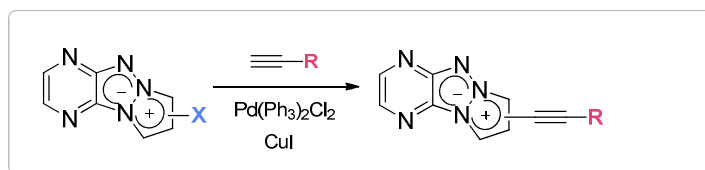
Dans un ballon, placé sous atmosphère d'argon, le nucléophile (1éq.) est solubilisé dans l'acétonitrile anhydre (concentration comprise entre 0.14 et 0.16M). Le carbonate de potassium (2éq.) est ensuite introduit. Le ballon est purgé avec de l'argon et est laissé sous agitation à température ambiante pendant 5min, puis le dérivé halogéné (**A**) (1éq.) est introduit par petites portions. La suspension obtenue est laissée sous agitation à reflux du solvant jusqu'à la consommation totale du 2-azido-3-chloropyrazine. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré et le résidu brut est repris dans le 1,2-dichlorobenzène (concentration comprise entre 0.06 et 0.1M). Après une purge d'argon, la suspension obtenue est chauffée à 165°C jusqu'à la consommation totale de l'intermédiaire (**B**). Après retour à température ambiante, le solvant est éliminé par filtration sur gel de silice en utilisant un solvant apolaire (ex : éther de pétrole) suivi par une élution du produit d'intérêt (**C**) avec des solvants plus polaires.

**Procédure générale D : Couplage de Suzuki**

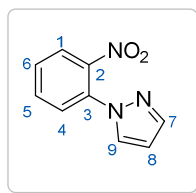
Dans un ballon (*ou tube scellé*) sec placé sous atmosphère d'argon, le dérivé halogéné (1éq.) est solubilisé dans un mélange 1,4-dioxane/ $H_2O$  (ou 1,4-dioxane/EtOH) (2.5/1 : v/v ; 30mM). Après l'introduction de l'acide boronique (1.5éq.) et du carbonate de potassium (6éq.), le milieu réactionnel est dégazé à l'argon pendant 5 à 10min. Le  $Pd(PPh_3)_4$  (0.05éq.) est introduit en dernier. La suspension obtenue est laissée sous agitation à reflux du solvant (*ou sous micro-ondes à 150°C*) jusqu'à la consommation totale du dérivé bromé. Après retour à température ambiante le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice.

**Procédure générale E : Couplage de Stille**

Dans un ballon (*ou tube scellé*) sec placé sous atmosphère d'argon, contenant une suspension de l'intermédiaire halogéné (1éq.) dans le toluène (0.25M), le dérivé stannylé (1éq.) est introduit goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est dégazé à l'argon pendant 10 min puis le  $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  (10mol%) est introduit. La suspension obtenue est laissée sous agitation à reflux du solvant jusqu'à la consommation totale du dérivé halogéné. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice et est ensuite précipité dans un mélange chloroforme/pentane.

**Procédure générale F : Couplage de Sonogashira**

Dans un tube scellé sec et sous argon, le dérivé halogéné (1éq.) est solubilisé dans l'acétonitrile (ou dans un mélange acétonitrile/DMF (4/1 : v/v, C=0.1M) si les substrats sont peu solubles). La triéthylamine distillée (ou la N,N-diisopropyléthylamine) (2éq.) et l'alcyne (2éq.) sont ensuite ajoutés. Le mélange réactionnel est dégazé à l'argon pendant 5 à 10min, puis le  $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  (10mol%) et le CuI (10mol%) sont introduits. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante sous atmosphère d'argon jusqu'à la consommation totale du dérivé halogéné. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation sous vide et le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice.

**1-(2-nitrophenyl)-1H-pyrazole (2)**

$C_9H_7N_3O_2$   
MM: 189,17g.mol<sup>-1</sup>

Le pyrazole (3g, 0.012mol, 1éq.), le 2-iodo-1-nitrobenzène (1.2g, 0.018mol, 1.5éq.), l'oxyde de cuivre(I) (0.17g, 0.001mol, 0.1éq.), le Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.9g, 0.024mol, 2éq.) et le DMF anhydre (25mL) sont introduits dans un ballon placé sous atmosphère d'argon. La suspension obtenue est laissée sous agitation à 100°C pendant 20h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec. Le résidu récupéré est repris à l'acétate d'éthyle et est lavé plusieurs fois avec une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et concentrée à sec. Le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 7/3 ; dépôt solide). Le produit **(2)** est obtenu avec un rendement de 75% (1.7g) sous forme d'une poudre jaune.

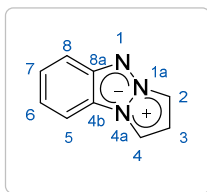
**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.88 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H), 7.62 – 7.57 (m, 1H), 7.56 – 7.47 (m, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 142.74, 133.43, 130.19, 128.80, 126.73, 125.48, 108.63

**SM (IC<sup>+</sup>)** : *m/z* 190 (M+H<sup>+</sup>), 212 (M+Na<sup>+</sup>).

**Numéro CAS** : 25688-17-9

**Référence bibliographique** : *Catal. Lett.*, **2015**, 145(5), 1113–1119.

**Benzo[d][1,2,3]triazolo[1,2-a][1,2,3]triazol-10-ium-9-ide (1)**

$C_9H_7N_3$   
MM: 157,17g.mol<sup>-1</sup>

Le 1-(2-nitrophenyl)-1H-pyrazole **(2)** (760mg, 4.02mmol, 1éq.) et le triéthylphosphite (15 mL, 87mmol, 22éq.) sont introduits dans un tube scellé sec et placé sous argon. Le milieu réactionnel est chauffé au micro-ondes à 176°C pendant 1h30. Après retour à température ambiante, le solvant est éliminé par évaporé sous pression réduite. Le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (2 paliers : éther de pétrole/acétate d'éthyle : 8/2 et 5/5; dépôt solide). Après

deux purifications successives, le composé (**1**) est obtenu avec un rendement de 24% (151mg) sous forme d'une poudre jaune clair.

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7.67 - 7.62 (m, 1H), 7.60 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 0H), 7.49 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.36 (ddd,  $J$  = 8.3, 7.1, 1.2 Hz, 1H), 6.96 (ddd,  $J$  = 8.1, 7.0, 1.0 Hz, 1H), 6.79 (t,  $J$  = 2.9 Hz, 1H)

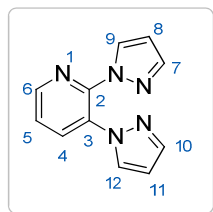
**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  126.26, 116.17, 112.93, 109.74, 108.91, 104.57, 103.77

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_6$  161.0570, mesuré 161.0570.

**Numéro CAS** : 1738-57-4

**Référence bibliographique** : *J.Het. Chem.*, **1965**, 2, 218–219.

**2,3-di(1H-pyrazol-1-yl)pyridine (**6**)**



$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_5$   
MM: 211,22g.mol $^{-1}$

Le CuI (2.3mg, 0.012mmol, 0.01éq.), le *trans*-1,2-diaminocyclohexane (15 $\mu\text{L}$ , 0.12mmol, 0.1éq.), le pyrazole (101mg, 1.47mmol, 1.2éq.), le  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (357mg, 2.58mmol, 2.1éq.), la 3-bromo-2-nitropyridine (250mg, 1.23mmol, 1éq.) et le dioxane (1.2mL) sont introduits dans un tube scellé sec et sous argon. La suspension obtenue est laissée sous agitation à 110°C pendant 23h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (7:3) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol : 97/3; dépôt solide). Le produit (**6**) est obtenu avec un rendement de 48% (124mg) sous forme d'un solide jaune.

**RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.58 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H,  $\text{H}_6$ ), 8.16 – 8.09 (m, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.73 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H,  $\text{H}_{10}$ ), 7.68 (dd,  $J$  = 4.8, 2.1 Hz, 2H,  $\text{H}_{7,9}$ ), 7.48 (dd,  $J$  = 8.0, 4.7 Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7.12 (dt,  $J$  = 2.5, 0.6 Hz, 1H,  $\text{H}_{12}$ ), 6.40 (t,  $J$  = 2.1 Hz, 1H,  $\text{H}_8$ ), 6.36 (ddd,  $J$  = 2.5, 1.9, 0.6 Hz, 1H,  $\text{H}_{11}$ )

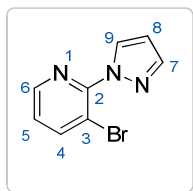
**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  148.07, 142.53, 141.92, 136.61, 130.92, 130.16, 123.93, 108.30, 108.00 (carbones quaternaires non visibles)

**SM (IC+)** :  $m/z$  212 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

**CAS** : 1893449-19-8

Référence bibliographique : *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 7727-7729.

**3-bromo-2-(1H-pyrazol-1-yl)pyridine (7)**



$C_8H_6BrN_3$   
MM: 224,06g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la procédure générale A à partir du 1H-pyrazole (117mg, 1.72mmol, 1éq.) et du 2-nitro-3-bromopyridine (350mg, 1.72mmol, 1éq.). Le temps de réaction est de 27h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (8:2) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec, le résidu brut est repris à l'eau et est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées à sec. Le résidu brut est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol : 97/3 ; dépôt solide) pour obtenir le composé **(7)** sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 53% (173mg).

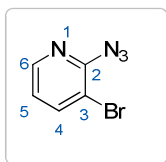
**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.49 (dd, *J* = 4.6, 1.5 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 8.12 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 8.10 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.81 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 7.21 (dd, *J* = 8.0, 4.6 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.51 – 6.48 (m, 1H, H<sub>8</sub>)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 149.61 (C<sub>q</sub>), 147.31, 143.88, 141.58, 130.44, 123.89, 113.22 (C<sub>q</sub>), 107.19

**SM (IC<sup>+</sup>)** : *m/z* 225 (M+H<sup>+</sup>).

**Numéro CAS** : 1249663-59-9

**2-azido-3-bromopyridine (9)**



$C_5H_3BrN_4$   
MM: 199,01g.mol<sup>-1</sup>

L'azoture de sodium (381 mg, 5.9 mmol, 10 éq.) est introduit dans un ballon sec contenant une solution de 3-bromo-2-nitropyridine (119 mg, 0.59mmol, 1éq.) dans le DMF anhydre (1 mL). La suspension jaune obtenue est laissée 5min sous agitation à température ambiante puis 3h à 80°C. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est repris à l'eau et est extrait trois fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de



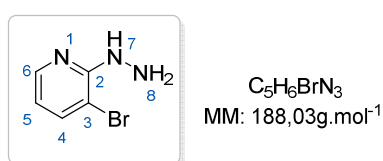
chlorure de sodium, séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées et concentrées à sec. Le composé (**9**) est obtenu sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement de 47% (55mg).

**IR** ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3110, 3075, 3024, 2918, 2850, 1945, 1847, 1738, 1651, 1621, 1530, 1505.

**RMN** ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.81 (dd,  $J$  = 6.8, 0.9 Hz, 1H), 7.89 (dd,  $J$  = 7.3, 0.9 Hz, 1H), 7.13 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 1H)

**Numéro CAS** : 1536547-72-4.

### 3-bromo-2-hydrazinylpyridine (**11**)



A une solution de 3-bromo-2-chloropyridine (2g, 10mmol, 1éq.) dans le dioxane (15mL) est ajoutée en plusieurs portions l'hydrazine monohydrate (7.7mL, 150mmol, 15éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à reflux pendant 21h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (9:1) comme éluant. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est repris dans un minimum d'éthanol froid et est filtré sur Milli-Pore pour donner le produit désiré (**11**) sous forme de cristaux blancs avec un rendement de 50% (952mg).

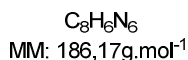
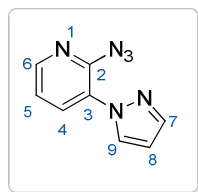
**P<sub>f</sub>** : 218°C

**RMN** ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.13 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.63 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.58 (dd,  $J$  = 7.1, 5.2 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.23 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 3.97 (s, 2H, H<sub>8</sub>)

**RMN** ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.33 (C<sub>q</sub>), 146.54 (C<sub>6</sub>), 139.93 (C<sub>4</sub>), 115.13 (C<sub>5</sub>), 104.69 (C<sub>q</sub>)

**Numéro CAS** : 54231-41-3

**Référence bibliographique** : WO2009/045753.

**2-azido-3-(1H-pyrazol-1-yl)pyridine (8)**

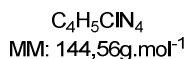
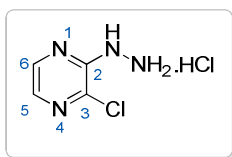
Le Cu<sub>2</sub>O (2mg, 0.014mmol, 0.05éq.), le 2-hydroxybenzaldehyde oxime (7.7mg, 0.056mmol, 0.2éq), le pyrazole (28.8mg, 0.41mmol, 1.5éq.), le Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (182mg, 0.56mmol, 2éq.), la 2-azido-3-bromopyridine **(16)** (55mg, 0.28mmol, 1éq.) et l'acétonitrile anhydre (1mL) sont introduits dans un tube scellé sec et sous argon. La suspension obtenue est laissée sous agitation à 40°C pendant 5h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (7:3) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est repris à l'eau et est extrait à l'acétate d'éthyle (x3). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées à sec. Le produit attendu **(8)** est obtenu avec un rendement de 83% (77mg) sous forme d'un solide marron.

IR (ν, cm<sup>-1</sup>) : 3348, 2927, 2224, 1617, 1570, 1447.

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.54 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 7.82 – 7.59 (m, 3H, H<sub>6,5,9</sub>), 6.69 (dd, J = 6.9, 1.6 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.50 – 6.36 (m, 1H, H<sub>8</sub>)

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.07(C<sub>q</sub>), 150.74 (C<sub>q</sub>), 142.51, 141.34, 127.29, 111.21, 108.15, 108.10

HRMS (ESI) : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>6</sub> 188.0679, mesuré 188.0678

**(3-chloropyrazin-2-yl)hydrazine (17)**

L'hydrazine monohydrate (6.84mL, 138.2mmol, 2.1éq.) est introduite goutte-à-goutte dans un ballon contenant une solution de 2,3-dichloropyrazine (10.0g, 65.8mmol, 1éq.) dans l'éthanol (400mL). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant 6h. Afin de consommer la quantité restante du 2,3-dichloropyrazine une quantité supplémentaire d'hydrazine (1.71mL, 34.6mmol, 0.25éq.) est ajoutée. Après 1h à reflux et retour à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite. Le solide cristallin obtenu est repris dans un minimum d'éthanol froid et est filtré sur Milli-Pore pour donner le produit désiré **(17)** sous forme d'un solide cristallin jaune pâle avec un rendement quantitatif (14.9 g).

**RMN ( $^1\text{H}$ , 250MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.03 (dd,  $J = 2.8, 0.4$  Hz, 1H), 7.69 (dd,  $J = 2.8, 0.4$  Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 3.97 (s, 2H)

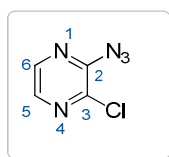
**RMN ( $^1\text{H}$ , 400MHz, MeOD)**  $\delta$  8.04 (d,  $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.58 (dd,  $J = 2.8$ Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101MHz, MeOD)**  $\delta$  154.3, 141.9, 134.8, 131.9

**Numéro CAS :** 63286-28-2

**Référence bibliographique :** *Synlett*, **2009**, 1318-1320

**2-azido-3-chloro-pyrazine (16)**



$\text{C}_4\text{H}_2\text{ClN}_5$   
MM: 155,55g.mol $^{-1}$

La (3-chloropyrazin-2-yl)hydrazine (**12**) (5g, 27.6mmol, 1éq.) est solubilisée dans une solution aqueuse d'acide acétique à 10% (100mL). Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C, puis une solution de nitrite de sodium (2.1g, 30mmol, 1.1éq.) dans l'eau distillée (7 mL) est ajoutée goutte-à-goutte. Après 30min d'agitation à 0°C, le milieu réactionnel est extrait à l'acétate d'éthyle (x2). Les phases organiques sont rassemblées et neutralisées avec une solution de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  à 5%, puis lavées avec une solution saturée en NaCl, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrées à sec. Le résidu brut est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane 100% ; dépôt solide) pour obtenir le composé (**16**) sous la forme d'une poudre jaune pâle avec un rendement de 73% (3.12g).

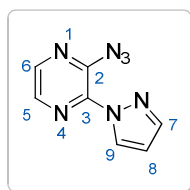
**RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.75 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_5$ ), 8.13 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_6$ )

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  144.42, 134.18, 118.35

**SM ( $\text{IC}^+$ ) :**  $m/z$  156 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 128 ( $\text{M}+\text{H}^+-\text{N}_2$ )

**Numéro CAS :** 1172608-10-4

**Référence bibliographique :** *Synlett.*, **2009**, 1318-1320

**2-azido-3-(1H-pyrazol-1-yl)pyrazine (15)**

$C_7H_5N_7$   
MM: 187,16g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la procédure générale A avec le 1H-pyrazole comme nucléophile. Le temps de réaction est de 3h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (7/3) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec, le résidu brut est repris à l'eau et est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées à sec pour donner le produit désiré **(15)** avec un rendement de 81% (145mg) sous forme d'une poudre jaune.

IR ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) : 2919, 2123, 1728, 1597, 1575, 1522.

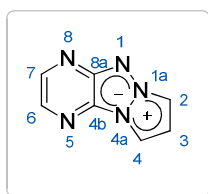
RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.16 (dd,  $J$  = 2.8, 0.5 Hz, 1H), 8.68 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 8.18 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 8.07 (d,  $J$  = 1.2 Hz, 1H), 6.70 (dd,  $J$  = 2.8, 1.6 Hz, 1H)

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  146.47, 132.41, 131.91, 116.77, 111.26

SM (IC+) :  $m/z$  188 (M+H<sup>+</sup>), 160 (M+H<sup>+</sup>-N<sub>2</sub>)

CAS : 1172608-11-5

Référence bibliographique : *Synlett.*, **2009**, 1318-1320.

**Pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (14)**

$C_7H_5N_5$   
MM: 159,15g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé a été préparé selon la Procédure générale B : une solution de 2-azido-3-(1H-pyrazol-1-yl)pyrazine **(15)** (100mg, 0.54mmol, 1éq.) dans le 1,2-dichlorobenzène (5mL) placé sous argon est chauffé à 165° pendant 1h30. Le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane

/méthanol 98/2 ; dépôt liquide) pour obtenir le produit désiré (**14**) avec un rendement de 79% (67mg) sous forme d'une poudre jaune.

**R<sub>f</sub>** : (DCM/AcOEt/MeOH: 80/19/1) 0.35

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.44 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.93 (t, *J* = 2.9 Hz, 1H)

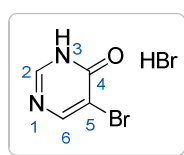
**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 151.64, 142.43, 129.02, 109.32, 108.80, 108.13

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>5</sub> 160.0618, mesuré 160.0615

**Numéro CAS** : 1172608-17-1

**Référence bibliographique** : *Synlett*, **2009**, 1318-1320

**5-bromopyrimidin-4(3H)-one(22)**



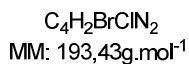
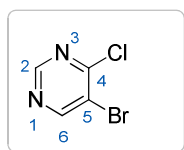
C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>BrN<sub>2</sub>O  
MM: 174,98g.mol<sup>-1</sup>

Dans une solution de 4-pyrimidinol (750mg, 7.8mmol, 1éq.) dans l'acide acétique glacial (11mL) refroidie à 10°C, le dibrome (0.4mL, 7.8mmol, 1éq.) est ajouté goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est ensuite agité à température ambiante pendant 5h30, puis concentré à sec. Une co-évaporation au toluène permet ensuite d'éliminer tout résidu d'acide acétique. Le solide jaune obtenu est repris à l'éther (20mL) et est laissé sous agitation lente pendant 1h. Le précipité formé est filtré sur Milli-Pore pour obtenir le produit désiré (**22**) avec un rendement quantitatif (1.36g) sous forme d'une poudre jaune.

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, DMSO)** δ 12.12 (se, 3H), 8.34 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H)

**Numéro CAS** : 19808-30-1

**Référence bibliographique** : WO2012/135631

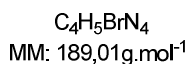
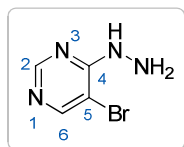
**5-bromo-4-chloropyrimidine (21)**

Une solution de 5-bromopyrimidin-4(3H)-one (**22**) (1.40g, 7.78mmol, 1éq.) dans le trichlorure de phosphore (6.5mL) est agitée à 100°C pendant 16h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est neutralisé avec une solution de bicarbonate de potassium (jusqu'à l'obtention d'un pH basique). Le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle, puis la phase organique est lavée avec une solution de NaCl et est séché sur  $\text{MgSO}_4$ . Le composé (**21**) est obtenu avec un rendement de 23% (412mg) sous forme d'un solide marron et est engagé directement dans l'étape suivante sans purification sur gel de silice (le composé obtenu se dégrade rapidement au contact de l'air et sur gel de silice).

RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.80 (s, 1H), 8.73 (s, 1H)

Numéro CAS : 56181-39-6

Référence bibliographique: WO2012/135631

**5-bromo-4-hydrazinylpyrimidine (23)**

A une solution de 5-bromo-4-chloropyrimidine (xx) (302mg, 1.56mmol, 1éq.) dans l'éthanol (10 mL) est ajouté goutte-à-goutte l'hydrazine monohydrate (166 $\mu\text{L}$ ). Le mélange réactionnel est porté au reflux du solvant pendant 4h30. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/méthanol (95/5) comme éluant. Après retour à température ambiante, le solvant est évaporé et le résidu brut est rincé à l'éther diéthylique. Le composé (**23**) est obtenu avec un rendement quantitatif sous la forme d'un solide jaune.

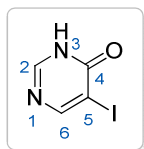
RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.58 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 6.59 (s, 1H, NH), 4.05 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ )

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  157.01, 155.50 (carbones quaternaires non visibles)

Numéro CAS : 859206-99-8.

Référence bibliographique : WO2010/088518

**5-Iodo-3H-pyrimidin-4-one (26)**



$C_4H_3IN_2O$   
MM: 221,98g.mol<sup>-1</sup>

Dans un ballon sec placé sous atmosphère d'argon, contenant une solution de 4-(3H)-pyrimidinone (750mg, 7.81mmol, 1éq.) dans l'acide acétique glacial (27mL), le *N*-iodosuccinimide (2.04g, 8.61mmol, 1.1éq.) est introduit par petites portions. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 50°C pendant 4h. Après retour à température ambiante, la solution est refroidie à 0°C à l'aide d'un bain de glace. Le précipité formé est filtré, lavé à l'eau froide et est rincé à l'éthanol. Le produit désiré **(26)** est obtenu sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement de 89% (1.74g).

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO) δ 12.94 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.18 (s, 1H)

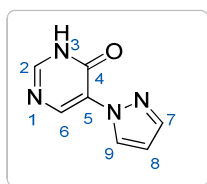
RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, DMSO) δ 206.76, 160.00, 159.02, 150.23, 90.99

SM (IC+) : *m/z* 223 (M+H<sup>+</sup>)

Numéro CAS : 4349-07-9

Référence bibliographique : WO2011/019405 (A1).

**5-Pyrazol-1-yl-3H-pyrimidin-4-one (25)**



$C_7H_6N_4O$   
MM: 162,15.mol<sup>-1</sup>

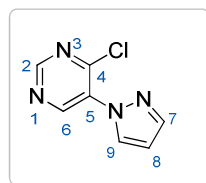
Le Cu<sub>2</sub>O (11.2mg, 0.078mmol, 0.05éq.), le 2-hydroxybenzaldehyde oxime (42.8mg, 0.312mmol, 0.2éq.), le pyrazole (163.5mg, 2.35mmol, 1.5éq.), le Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.02g, 3.12mmol, 2éq.), le 5-iodopyrimidin-4-ol **(26)** (350mg, 1.56mmol, 1éq.) et le *N,N*-diméthylformamide anhydre (1.75mL) sont introduits dans un tube scellé sec placé sous argon. La suspension obtenue est chauffée au micro-ondes à 170°C pendant 1h10. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol 100/0, 97/3, 95/5 puis 90/10; dépôt solide). Le produit attendu **(25)** est obtenu avec un rendement de 95% (239mg) sous la forme d'une poudre jaune pâle.

**RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz, DMSO)**  $\delta$  8.59 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.74 (d,  $J$  = 1.2 Hz, 1H), 6.61 – 6.38 (m, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz, DMSO)**  $\delta$  147.53, 140.65, 131.16, 106.89

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_4\text{O}$  163.0614, mesuré 163.0612.

#### 4-Chloro-5-pyrazol-1-yl-pyrimidine (24)



$\text{C}_7\text{H}_5\text{ClN}_4$   
MM: 180,59g.mol $^{-1}$

Une solution de 5-pyrazol-1-yl-3H-pyrimidin-4-one (**25**) (53mg, 0.33mmol, 1éq.) dans le trichlorure de phosphore (0.61mL, 6.54mmol, 20éq.) est chauffée à 110°C pendant 1h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est repris à l'eau et est extrait deux fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  à 5% et avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées et concentrées à sec. Le produit désiré (**24**) est obtenu avec un rendement de 93% (55mg) sous la forme d'un solide marron. Ce produit est engagé directement dans l'étape suivante (produit peu stable).

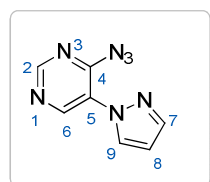
**R<sub>f</sub>**: (éther de pétrole/acétate d'éthyle:7/3) 0.53

**RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  9.05 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.08 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 7.84 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 6.59 (dd,  $J$  = 2.5, 1.9 Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  156.31, 154.42, 142.69, 131.13, 108.52

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_4$  181.0276, mesuré 181.0276

#### Azoture de 5-pyrazol-1-yl-pyrimidine (19)



$\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_7$   
MM: 187,16g.mol $^{-1}$



L'azoture de sodium (72mg, 1.11mmol, 2éq.) est introduit dans un tube scellé sec sous atmosphère d'argon contenant une solution de 4-chloro-5-pyrazol-1-yl-pyrimidine (**24**) (100mg, 0.55mmol, 1éq.) dans le N,N-diméthylformamide anhydre (1.7 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 15h à 50°C et 2h à 70°C. Après retour à température ambiante, le mélange brut est repris à l'eau et est extrait trois fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée en chlorure de sodium, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées à sec. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2; dépôt solide). Le produit (**19**) est obtenu avec un rendement de 22% (23mg) sous forme d'une poudre blanche.

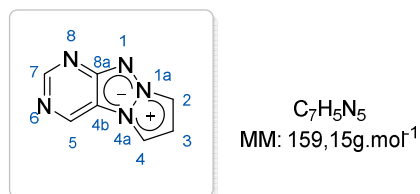
**IR (ν, cm<sup>-1</sup>)** : 3348, 2928, 2224, 1617, 1571, 1570, 1518.

**R<sub>f</sub>**: (éther de pétrole/acétate d'éthyle:7/3) 0.70

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 9.58 (s, 1H), 9.21 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 9.08 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.66 (dd, *J* = 2.7, 1.8 Hz, 1H)

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>7</sub> 188.0679, mesuré 188.0680

***pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-9-ium-10-ide (18)***

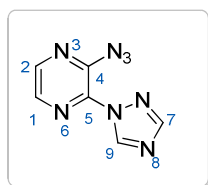


Ce composé est préparé selon la Procédure générale B: une solution de (**19**) (18mg, 0.096mmol, 1éq.) dans le 1,2-dichlorobenzène (0.75mL) placé sous argon est chauffée à 165°C pendant 20min. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (3 paliers : éther de pétrole 100%, dichlorométhane /méthanol 100/0 puis 95/5; dépôt solide). Le produit (**18**) est obtenu avec un rendement de 66% (15mg) sous forme d'une poudre beige.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.91 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.93 (se, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 160.88, 156.43, 136.24, 113.86, 111.40, 109.73, 109.40

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>5</sub> 160.0618, mesuré 160.0619

**2-azido-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pyrazine (27a)**

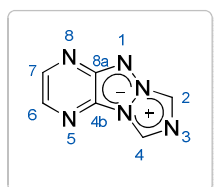
$C_6H_4N_8$   
MM: 188,15g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale A avec le (1H)-1,2,4-triazole comme nucléophile. Le temps de réaction est de 3h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (8:2) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré et rincé au chloroforme. Le solide blanc est repris dans un mélange dichlorométhane/eau, agité puis filtré pour donner le produit **(27a)** avec un rendement de 81% (1.46g) sous forme d'une poudre blanche.

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.85 (s, 1H), 8.82 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.28 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H).

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.92, 145.66, 131.81, 117.96.

SM (IC+) : *m/z* 189 (M+H<sup>+</sup>), 161 (M+H<sup>+</sup>-N<sub>2</sub>).

**[1,2,4]triazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (28)**

$C_6H_4N_6$   
MM: 160,14g.mol<sup>-1</sup>

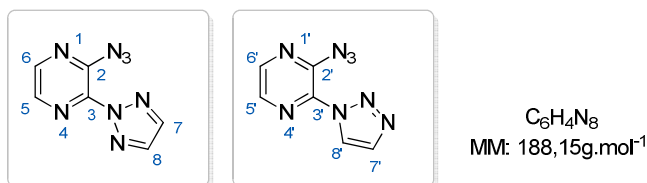
Ce composé est préparé selon la Procédure générale B à partir du composé **(27a)** (470mg, 2.50mmol, 1éq.) dans le 1,2-dichlorobenzène (37mL). Le temps de réaction est de 3h. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (2 paliers: éther de pétrole 100% puis dichlorométhane/méthanol 97/3). Le produit désiré **(28)** est obtenu avec un rendement de 60% (238mg) sous forme d'une poudre jaune.

P<sub>f</sub>: 185°C

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.80 (s, 1H), 8.58 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H)

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.79, 145.45, 131.68, 123.44, 119.38

HRMS (ESI) : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>N<sub>6</sub> 161.0570, mesuré 161.0568

**2-azido-3-(2H-1,2,3-triazol-2-yl)pyrazine(29a) et 2-azido-3-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyrazine (29b)**

Ces composés sont préparés selon la *Procédure générale A* avec le (1H)-1,2,3-triazole (82μL, 1.41mmol, 1.1éq.) et de la 2-azido-3-chloropyrazine (200mg, 1.28mmol, 1éq.). Le temps de réaction est de 3h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (7/3,  $R_f=0.59$ ) comme éluant. Après extraction, les deux isomères **(29a)** et **(29b)** sont obtenus avec un rendement global de 95% (170mg) sous forme d'une poudre jaune pâle avec des proportions respectives de 59% et 41% déterminées par spectroscopie de RMN. Une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/MeOH 97/3) permet d'isoler une fraction pure d'isomère **(29a)**.

**Isomère 29a**

$P_f$ : 226°C

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.83 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 8.31 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 8.23 (s, 2H)

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 140.08 (2C), 131.96, 118.47

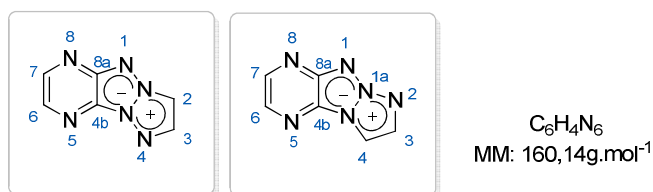
SM (IC<sup>+</sup>) :  $m/z$  161 ( $M+H^+-N_2$ ), 189 ( $M+H^+$ ), 211 ( $M+Na^+$ )

**Isomère 29b**

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.18 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 8.87 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 8.33 (d, 1H,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 8.02 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H).

SM (IC<sup>+</sup>) :  $m/z$  161 ( $M+H^+-N_2$ ), 189 ( $M+H^+$ ), 211 ( $M+Na^+$ )

**[1,2,3]triazolo[2',1':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-9-ium-10-ide(30) et  
[1,2,3]triazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (31)**



Ces composés sont préparés selon la *Procédure générale B* à partir du mélange des deux isomères (**29a**) et (**29b**) (0.56mmol, 1éq.) dans le 1,2-dichlorobenzène (7mL). Le temps de réaction est de 2h. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (2 paliers: éther de pétrole 100% puis dichlorométhane/acétate d'éthyle 9/1). Le produit (**30**) est obtenu avec un rendement de 47% (41mg) sous la forme d'une poudre jaune clair. L'isomère (**31**) est isolé avec un rendement de 1% (1mg) sous forme d'une poudre jaune.

### Isomère 30

$P_f$ : 210-220°C (décomposition exothermique)

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.72 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 8.35 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 8.22 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H), 8.02 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150.92, 144.68, 138.32, 135.51, 127.36, 104.83

HRMS (ESI) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_6$  161.0570, mesuré 161.0565

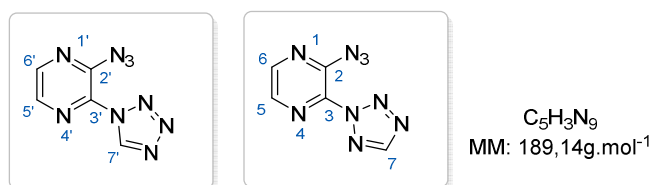
### Isomère 31

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.75 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 8.31 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 8.26 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.94 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  145.29, 135.15, 132.91, 106.67 (carbones quaternaires non visibles)

HRMS (ESI) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_6$  161.0570, mesuré 161.0565

### 2-azido-3-(1H-tetrazol-1-yl)pyrazine (32a) et 2-Azido-3-(2H-tetrazol-2-yl)pyrazine (32b)



Ces composés sont préparés selon la *Procédure générale A* à partir du 1H-tétrazole (76mg, 1.07mmol, 1.1éq.) et de la 3-azido-2-chloropyrazine (**16**) (151mg, 0.96mg, 1éq.). Le temps de réaction est de 1h30. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (7:3) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré, le résidu brut est repris à l'eau puis extrait quatre fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées et concentrées à sec. Le mélange brut comporte les deux formes **32a** et **32b** avec un

rapport de 1:0.25 et un rendement global de 88% (161mg). La purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 9/1; dépôt solide) permet d'isoler uniquement l'isomère majoritaire (**32aou 32b**) sous forme d'une poudre jaune pâle.

### Isomère majoritaire

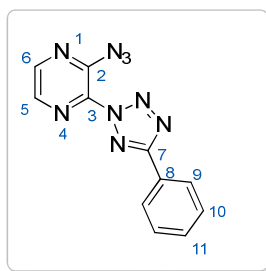
$P_f$  : 188°C (décomposition exothermique)

RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  10.14 (s, 1H), 9.13 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 8.37 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  144.21, 132.49, 121.68

HRMS (ESI) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_9$  190.0584, mesuré 190.0585

### **2-Azido-3-(5-phenyl-2H-tetrazol-2-yl)pyrazine (34)**



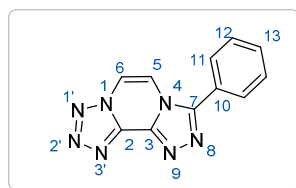
$\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_9$   
MM: 265,23g.mol $^{-1}$

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale A* à partir du 5-phenyl-1H-tétrazole (188mg, 1.28mmol, 1éq.) et le 3-azido-2-chloropyrazine (**16**) (200mg, 1.28mg, 1éq.). Le temps de réaction est de 7h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (7:3) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré, le résidu brut est repris à l'eau et est extrait trois fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées et concentrées à sec. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 7/3; dépôt solide). Le produit (**34**) est obtenu avec un rendement de 88% (300mg) sous la forme d'un solide orange pâle.

IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3083, 2964, 1980, 1682, 1572, 1524.

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  8.37 (d,  $J = 6.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_5$  ou  $\text{H}_6$ ), 8.05 (d,  $J = 6.1$  Hz, 1H  $\text{H}_5$  ou  $\text{H}_6$ ), 7.97 – 7.85 (m, 2H), 7.70 (m, 3H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  132.31 (1C,  $\text{C}_{Ar}$ ), 130.52 (2C,  $\text{C}_{Ar}$ ), 129.78 (2C,  $\text{C}_{Ar}$ ), 115.16 ( $\text{C}_5$  ou  $\text{C}_6$ ), 113.61 ( $\text{C}_5$  ou  $\text{C}_6$ ) ; (carbones quaternaires non visibles)

**8-Phenyltetrazolo[1,5-a][1,2,4]triazolo[3,4-c]pyrazine (36)**

$C_{11}H_7N_7$   
MM: 237,22 g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale B* à partir du composé **(34)** (50mg, 0.19mmol, 1éq.) dans le 1,2-dichlorobenzène (3.5mL). Le temps de réaction est de 24h. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (2 paliers: éther de pétrole 100% ; dichlorométhane/méthanol 97/3 puis 95/5). Le produit désiré **(36)** est obtenu avec un rendement de 77% (35mg) sous forme d'une poudre jaune pâle.

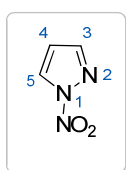
**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CD<sub>3</sub>CN)** δ 8.37 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.92 – 7.83 (m, 2H), 7.69 (d, *J* = 4.3 Hz, 3H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CD<sub>3</sub>CN)** δ 151.74 (C<sub>q</sub>), 142.44 (C<sub>q</sub>), 141.17 (C<sub>q</sub>), 132.35, 130.51, 129.78, 126.05 (C<sub>q</sub>), 115.16 (C<sub>5</sub> ou C<sub>6</sub>), 113.61 (C<sub>5</sub> ou C<sub>6</sub>)

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>7</sub> 238.0836, mesuré 238.0834

**Numéro CAS** : 1020269-29-7

**Référence bibliographique** : *Russ. Chem. Bull.* **2007**, 56, 345–350

**1-Nitro-1H-pyrazole (37)**

$C_3H_3N_3O_2$   
MM: 113,07g.mol<sup>-1</sup>

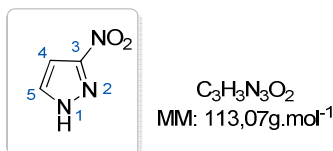
L'acide nitrique fumant (1.5mL, 0.036 mol, 1.2 éq.) est ajouté goutte-à-goutte à une suspension de pyrazole (2g, 0.03mol, 1éq.) dans l'acide acétique (6mL) à 0°C. L'anhydride acétique (4mL, 0.041mol, 1.4éq.) est ajouté en dernier. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 30min à 0°C puis pendant 17h à température ambiante. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (7/3) comme éluant. 35 mL d'eau froide est ensuite ajouté dans le milieu. Le précipité formé est récupéré par filtration et lavé à l'eau glacée. Le produit attendu **(37)** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 86% (2.9g).

RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz, DMSO)  $\delta$  7.97 (dd,  $J = 3.0, 0.8$  Hz, 1H), 7.06 (dd,  $J = 1.7, 0.9$  Hz, 1H), 5.88 (dd,  $J = 3.0, 1.7$  Hz, 1H)

Numéro CAS : 7119-95-1

Référence bibliographique : *J. Org. Chem.*, **1973**, 38 (10), 1777–1782.

### 3-Nitro-1H-pyrazole (38a)



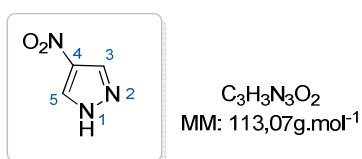
Une solution de 1-nitropyrazole (**37**) (2.9g, 0.026mol, 1éq.) dans 36mL de benzonitrile est chauffée à 180°C pendant 5h. Après retour à température ambiante, l'heptane (100mL) est ajouté. Le précipité blanc formé est récupéré par filtration et rincé à l'heptane pour donner le produit (**38a**) sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 58% (1.7g).

RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz, DMSO)  $\delta$  13.14 (1H, s, H), 8.03(1H, d,  $J=2.5$ Hz, H<sub>5</sub>), 7.03(1H, d,  $J=2.5$ Hz, H<sub>4</sub>)

Numéro CAS : 26621-44-3

Référence bibliographique : *J. Org. Chem.*, **1973**, 38 (10), 1777–1782

### 4-Nitro-1H-pyrazole (39)



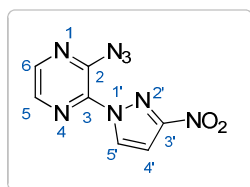
Dans un ballon contenant l'acide sulfurique à 95% (22mL) refroidi à 0°C, le pyrazole (3g, 43.9mmol, 1éq.) est introduit par petites portions. Après 5 min d'agitation à froid, la température du milieu réactionnel est augmentée jusqu'à 55°C. L'acide nitrique (3.2mL, 48.3mmol, 1.1éq.) est ensuite ajouté goutte-à-goutte tout en maintenant la température constante de 55°C. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à cette température pendant 3h. Après retour à température ambiante, du carbonate de sodium solide est ajouté au milieu réactionnel, qui est ensuite extrait trois fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée en chlorure de sodium, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées à sec. Le 4-nitro-(1H)-pyrazole (**39**) est obtenu sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement de 89% (4,4g).

RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz, DMSO)  $\delta$  13.91 (se, 1H), 8.54 (se, 2H)

Numéro CAS : 2075-46-9

Référence bibliographique : *J. Het. Chem.*, **2014**, 51 (6), 1621-1627.

**2-azido-3-(3-nitro-1H-pyrazol-1-yl)pyrazine (40)**



$\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_8\text{O}_2$   
MM: 232,16g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale A avec le 3-nitro-1H-pyrazole comme nucléophile et le dichlorométhane anhydre comme solvant. Le temps de réaction est de 3h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/méthanol (95:5) comme éluant. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est filtré, le résidu brut est repris à l'eau et extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées et concentrées à sec. Le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol 95/5; dépôt solide). Le produit attendu (**40**) est obtenu avec un rendement de 27% (384mg) sous la forme d'une poudre jaune.

$R_f$ : (dichlorométhane/méthanol 95/5) 0.6.

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz, DMSO)  $\delta$  9.57 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H), 8.23 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H), 8.41 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H), 7.51 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz, DMSO)  $\delta$  158.5, 140.8, 134.7, 131.4, 120.1, 105.6

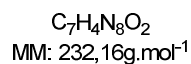
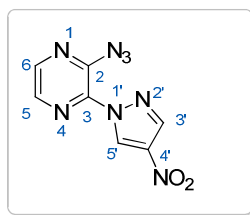
SM (IC<sup>+</sup>) :  $m/z$  233( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 205 ( $\text{M}+\text{H}^+-\text{N}_2$ )

Numéro CAS : 1172608-12-6

Référence bibliographique : *Synlett.*, **2009**, 1318-1320

**2-azido-3-(4-nitro-1H-pyrazol-1-yl)pyrazine (41)**





Ce composé est préparé selon la *Procédure générale A* avec le 4-nitro-1H-pyrazole comme nucléophile. Le temps de réaction est de 4h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/méthanol (95/5) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré, le résidu brut est repris à l'eau et est extrait trois fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées et concentrées à sec. Le produit attendu (**41**) est obtenu avec un rendement de 76% (840mg) sous la forme d'une poudre jaune.

**R<sub>f</sub>** : (dichlorométhane/méthanol 95/5) 0.45

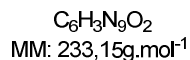
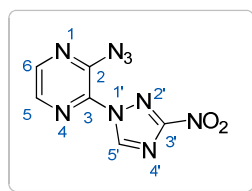
**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, DMSO)**  $\delta$  9.81 (d,  $J = 0.7$  Hz, 1H), 9.51 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 8.82 (d,  $J = 0.7$  Hz, 1H), 8.36 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H)

**SM (IC<sup>+</sup>)** :  $m/z$  233( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 205 ( $\text{M}+\text{H}^+-\text{N}_2$ )

**Numéro CAS** : 1172608-13-7

**Référence bibliographique** : *Synlett.*, **2009**, 1318-1320

**2-azido-3-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-yl)pyrazine (42)**



Ce composé est préparé selon la *Procédure générale A* avec le 3-nitro-1H-1,2,4-triazole comme nucléophile. Le temps de réaction est de 1h30. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (7:3) comme éluant. Le milieu réactionnel est concentré, le résidu est repris à l'eau et extrait trois fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées et concentrées à sec. Le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice

(dichlorométhane/acétate d'éthyle 7/3; dépôt solide). Le produit attendu **(42)** est obtenu avec un rendement de 93% (140mg) sous la forme d'une poudre jaune pâle.

$P_f$ : 199°C

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.98 (s, 1H), 8.98 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 8.42 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H)

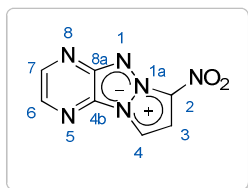
RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  146.86, 131.35, 118.93

SM (IC $^+$ ) :  $m/z$  206 ( $\text{M}+\text{H}^+-\text{N}_2$ ), 234 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 256 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ )

Numéro CAS : 1172608-15-9

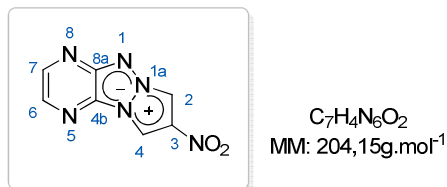
Référence bibliographique : *Synlett.*, **2009**, 1318-1320

**7-nitropyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (43)**



Référence bibliographique : *Synlett.*, **2009**, 1318-1320.

**8-nitropyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (44)**



Ce composé est préparé selon la *Procédure générale B* : une solution de 2-azido-3-(4-nitro-1H-pyrazol-1-yl)pyrazine (**41**) (840mg, 3.63mmol, 1éq) dans le 1,2-dichlorobenzène (37mL), placé sous argon est chauffée à 165°C pendant 4h. Le solvant est éliminé par distillation sous vide. Le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (3 paliers : dichlorométhane/acétate d'éthyle 9/1, dichlorométhane/méthanol 98/2 puis 95/5). Afin d'isoler le produit pur, plusieurs purifications successives ont été réalisées. Le produit désiré (**44**) est obtenu avec un rendement de 69% (513mg) sous la forme d'une poudre jaune.

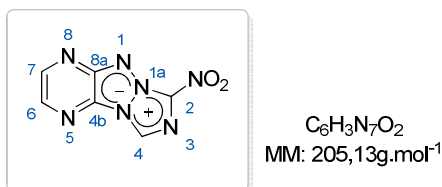
RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.71 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 8.58 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H)

HRMS (ESI) : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> 205.0468, mesuré 205.0468

Numéro CAS : 1172608-19-3

Référence bibliographique : *Synlett.*, **2009**, 1318-1320.

**7-nitro-[1,2,4]triazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (45)**



Ce composé est préparé selon la *Procédure générale B* : une solution de 2-azido-3-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-yl)pyrazine (**42**) (130mg, 0.56mmol, 1éq) dans le 1,2-dichlorobenzène (7.5mL) placé sous argon est chauffée à 165°C pendant 3h. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (4 paliers: éther de pétrole: 100% ; dichlorométhane/acétate d'éthyle : 100/0, 98/2 et 95/5; dépôt liquide). Le produit désiré (**45**) est

obtenu avec un rendement de 14% (16mg). (Rendement total de 13% sur l'étape de substitution et thermolyse).

Ce composé est également préparé selon la *Procédure générale C* : sous atmosphère d'argon, une suspension de la 2-azido-3-chloro-pyrazine (**16**) (100mg, 0.64mmol, 1éq), du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (177mg, 1.3 mmol, 2éq) et du 1H-1,2,4-triazole (84mg, 0.74mmol, 1.1éq) dans l'acétonitrile anhydre (3.5mL) est portée à reflux du solvant pendant 4h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est repris dans le 1,2-dichlorobenzène (3.5mL) et est chauffé 1h à 165°C. Après refroidissement, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (3 paliers: éther de pétrole: 100% ; dichlorométhane/acétate d'éthyle: 10/0,8/2). Après une précipitation au chloroforme/pentane et des lavages au pentane, le produit (**45**) est obtenu avec un rendement de 18% (12mg) sous forme d'une poudre orange.

P<sub>f</sub> : 209°C

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.98 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.54 (d, J = 2.4 Hz, 1H)

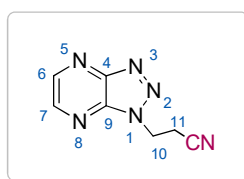
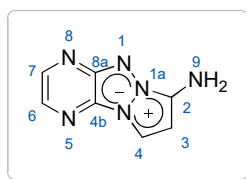
RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 147.70, 138.71, 120.76

SM (IC<sup>+</sup>) : m/z 206 (M+H<sup>+</sup>)

Numéro CAS : 1172608-21-7

Référence bibliographique : *Synlett.*, 2009, 1318-1320.

**7-aminopyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (46) et 3-{1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-1-yl}propanenitrile (47)**



C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>  
MM: 174,16g.mol<sup>-1</sup>

Le Pd/C (7.5mg, 10% en masse) est ajouté à une solution du composé (**43**) (75mg, 0.38 mmol, 1éq.) dans l'éthanol (5mL). Le milieu est dégazé tout d'abord à l'argon puis placé sous atmosphère d'hydrogène (grâce à une boudruche) et est laissé sous agitation à température ambiante pendant 2 jours. Le brut réactionnel est ensuite filtré sur célite et abondamment rincé à l'éthanol. Le filtrat est concentré puis purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol 97/3 puis 95/5). Le composé (**46**) et (**47**) sont obtenus avec des rendements respectives de 11% et 65%.

**Produit PyTAP 46**

RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.19 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.90 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 7.60 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H), 6.33 (d,  $J = 3.4$  Hz, 2H), 4.61 (s, 2H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  141.90, 127.04, 111.68, 98.04 (carbones quaternaires non visibles)

SM (IC+) :  $m/z$  175 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )

**Produit Cyano 47**

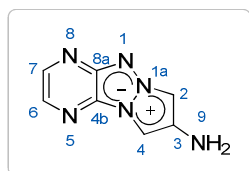
IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3076, 2964, 2935, 2255, 1966, 1588, 1551.

RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.82 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 8.71 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 5.08 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 3.26 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H)

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz, MeOD)  $\delta$  8.82 (s, 1H), 5.12 (t,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 3.35 (t,  $J = 6.6$  Hz, 1H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz, MeOD)  $\delta$  150.14 (Cq), 146.82, 145.18, 139.83 (Cq), 118.11 (Cq), 44.38, 18.69

SM (IC+) :  $m/z$  175 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )

**8-aminopyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (48)**

$\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_6$   
MM: 174,16g.mol $^{-1}$

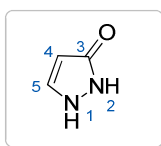
Une solution aqueuse de Nickel de Raney (10 gouttes) est ajoutée à une solution du composé (**44**) (20mg, 0.10mmol, 1éq.) dans le méthanol. La suspension obtenue est dégazée à l'argon puis est placée sous atmosphère d'hydrogène (grâce à un ballon de baudruche) et est laissée sous agitation à température ambiante pendant 4h. Le brut réactionnel est ensuite filtré sur célite et abondamment rincé au méthanol. Le filtrat est concentré puis purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol 97/3). Le composé (**48**) est obtenu avec un rendement de 18% (3mg) sous forme d'une poudre orange.

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.35 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.85 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 3.53 (s, 2H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  142.03, 129.91, 101.69, 97.44

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_7H_7N_6$  175.0727, mesuré 175.0727.

**1H-Pyrazol-3(2H)-one (52)**



$C_3H_4N_2O$   
MM: 84,08g.mol<sup>-1</sup>

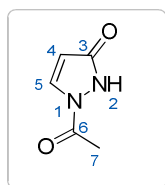
L'hydrazine monohydrate (2.7mL, 55mmol, 1.1éq.) est ajoutée goutte-à-goutte à une solution de (*E*)-méthoxyacrylate (5.5mL, 51mmol, 1éq.) dans méthanol (5mL). Le mélange obtenu est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant 1h30. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/méthanol (95:5) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec pour donner le produit désiré **(52)** sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement quantitatif (4.68g). Le produit est engagé dans la réaction suivante sans purification.

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, DMSO)**  $\delta$  10.30 (s, 1H), 7.34 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 5.43 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H)

**Numéro CAS :** 137-45-1

**Référence bibliographique :** WO2011/026937

**1-Acetyl-3-hydroxy-1H-pyrazole (53)**



$C_5H_6N_2O_2$   
MM: 126,11g.mol<sup>-1</sup>

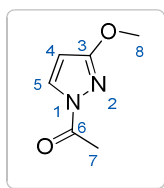
Un mélange d'anhydride acétique (5.3mL, 0.06mol, 1.1éq.) dans la pyridine (11 mL) est ajoutée goutte-à-goutte pendant 15 min. à une solution de 1H-pyrazol-3(2H)-one **(52)** (4.5g, 0.05mol, 1éq.) dans la pyridine (22mL), préchauffée à 95°C. La solution obtenue est laissée sous agitation à 95°C pendant 1h (coloration du milieu du jaune clair vers marron). Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/méthanol (95/5) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec puis co-éaporé au toluène afin d'éliminer la pyridine résiduelle. Le précipité obtenu est repris à l'éther et est laissé sous agitation à température ambiante pendant 1h. Le solide est récupéré par filtration, rincé puis séché pour donner le produit désiré **(53)** sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement de 79% (5g). Le produit est engagé dans l'étape suivante sans purification sur colonne de silice.

RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz, DMSO)  $\delta$  10.94 (s, 1H), 8.12 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 6.00 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 2.48 (s, 3H)

Numéro CAS : 852471-15-9

Référence bibliographique : WO2015/095792

**1-(3-methoxypyrazol-1-yl)ethanone (54)**



$\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$   
MM: 140,14g.mol $^{-1}$

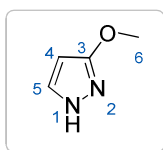
Le 1-acétyl-3-hydroxy-1H-pyrazole (**53**) (300mg, 2.4mmol, 1éq.), le carbonate de potassium (658mg, 4.8mmol, 2éq.) et le *N,N*-diméthylformamide anhydre (6mL) sont introduits dans un ballon placé sous atmosphère d'argon. Le *p*-toluènesulfonate de méthyle (444mg, 2.4mmol, 1éq.) est ajouté au mélange en dernier. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante et sous atmosphère d'argon pendant 15h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole (7/3) comme éluant. Le milieu réactionnel est repris à l'acétate d'éthyle et est lavé à l'eau, puis avec une solution saturée en chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et concentrée à sec pour donner le produit désiré sous la forme d'une huile jaune. Le composé brut est ensuite purifié sur colonne de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1/9 ; dépôt liquide) pour donner le composé (**54**) sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 42% (140mg).

RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.05 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 5.95 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 2.59 (s, 3H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.15, 166.29, 130.42, 99.67, 56.77, 21.90

Numéro CAS : 1934529-76-6

Référence bibliographique : *Synthesis*, **2016**, 48(17), 2739-2756.

**3-Methoxy-1H-pyrazole(50)**

$C_4H_6N_2O$   
MM: 98,10g.mol<sup>-1</sup>

L'hydroxyde de potassium solide (120mg, 2.14mmol, 3éq.) est ajouté à une solution de 1-(3-methoxypyrazol-1-yl)éthanone (**54**) (100mg, 0.71mmol, 1éq.) dans un mélange éthanol/eau (1mL/0.5mL). La solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 2h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (95/5) comme éluant. Le milieu réactionnel est repris à l'eau et est extrait à l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est extraite trois fois avec un mélange dichlorométhane/isopropanol (95/5). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées à sec pour donner le produit (**50**) avec un rendement de 61% (43mg).

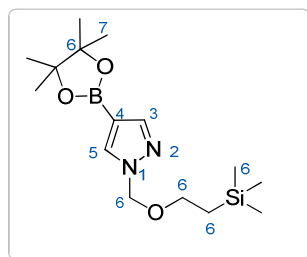
RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.80 (se, 1H), 7.36 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H)

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.10, 129.84, 89.63, 55.88.

Numéro CAS : 215610-30-3

Référence bibliographique : WO2009/053737

**4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1H-pyrazole (55)**



$C_{15}H_{29}BN_2O_3Si$   
MM: 324,30g.mol<sup>-1</sup>

A une solution de 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazole (2.06g, 11.4 mmol, 1éq.) dans le THF anhydre, sous argon et à 0°C, est ajouté par petites portions le NaH (0.70 g, 29.3mmol, 2.5éq.). Le chlorure de 2-(triméthylsilyl)éthoxyméthyle (2.55 mL, 13.7mmol, 1.2éq.) est ajouté après 10 min d'agitation à froid. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 14h avec un retour à température ambiante suivie d'une hydrolyse par NH<sub>4</sub>Cl aqueux. Le milieu est repris à l'acétate d'éthyle et est extrait deux fois. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution de NaCl puis séchées sur MgSO<sub>4</sub>, concentrées et purifiées par chromatographie sur gel



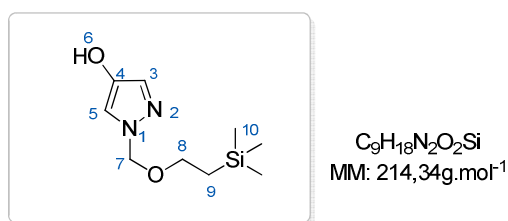
de silice (DCM/AcOEt 8/2). Le composé **(55)** est obtenu avec un rendement de 85% sous forme d'une huile jaune.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.83 – 7.67 (m, 2H), 5.39 – 5.31 (m, 2H), 3.48 (dddd, *J* = 11.0, 6.7, 2.5, 1.3 Hz, 2H), 1.26 – 1.20 (m, 12H), 0.87 – 0.77 (m, 2H), -0.09 – -0.16 (m, 9H)

**Numéro CAS :** 894807-98-8

**Référence bibliographique :** WO2016/025918

**1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1H-pyrazol-4-ol (56)**

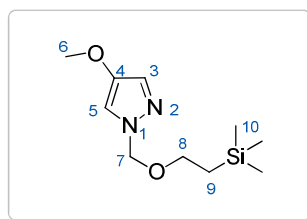


Une solution de NaOH (2M, 2.5mL) est ajoutée à une solution de composé **(55)** (0.4 g, 1.24 mmol, 1 éq.) dans le THF (5 mL). Le mélange est refroidi à 0°C puis une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%, 0.94 mL) est ajoutée goutte-à-goutte. La réaction agitée pendant 1h avec retour à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite dilué à l'eau (10mL) et extrait trois fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution de NaCl puis séchées sur MgSO<sub>4</sub>, concentrées et purifiées par chromatographie sur gel de silice (DCM/AcOEt 8/2). Le composé **(56)** est obtenu avec un rendement de 98% sous forme d'une huile incolore.

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.21 (dd, *J* = 2.6, 1.0 Hz, 2H), 5.28 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H), 3.50 (ddt, *J* = 8.2, 7.2, 1.1 Hz, 2H), 0.93 – 0.83 (m, 2H), -0.05 (s, 9H)

**Numéro CAS :** 220299-50-3

**Référence bibliographique :** WO2014/008197

**4-methoxy-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1H-pyrazole (57)**

$C_{10}H_{20}N_2O_2Si$   
MM: 228,36g.mol<sup>-1</sup>

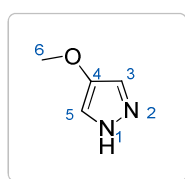
A une solution de composé **(56)** (0.35g, 1.63mmol, 1éq.) dans le THF anhydre (8mL) placée sous atmosphère d'argon, sont ajoutés le  $Cs_2CO_3$  (1.06g, 3.27mmol, 2éq.) et le  $CH_3I$  (0.21mL, 3.26mmol, 2éq.). La suspension obtenue est laissée sous agitation à température ambiante pendant 3h. Le mélange réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle (20mL), filtré sur Milli-Pore et concentré. Le composé **(57)** est obtenu avec un rendement de 73% sous la forme d'une huile incolore.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.28 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H), 7.22 (t,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.52 (ddd,  $J = 9.4, 7.5, 0.8$  Hz, 2H), 0.92 – 0.82 (m, 2H), 0.02 (s, 9H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 127.98, 113.52, 66.63, 58.96, 17.93, 1.30

**Numéro CAS :** 1533442-47-5

**Référence bibliographique :** WO2015/095767

**4-methoxy-1H-pyrazole (51)**

$C_4H_6N_2O$   
MM: 98,10g.mol<sup>-1</sup>

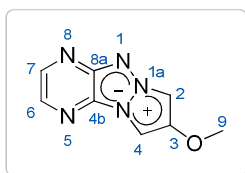
Le composé **(57)** (0.20g, 0.8 mmol, 1éq.) est solubilisé dans un mélange de triéthylsilane/acide trifluoroacétique (1/2, 10mL). Après 1h d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/MeOH 95/5). Le composé **(51)** est obtenu avec un rendement de 85% sous la forme d'une huile incolore.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 12.33 (s, 3H), 7.61 (s, 2H), 3.86 (d,  $J = 1.4$  Hz, 3H), 1.26 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 162.65, 162.26, 119.15, 59.47, 24.83

Numéro CAS : 14884-01-6

Référence bibliographique : WO2014/008197

**8-methoxypyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (59)**

$C_8H_7N_5O$   
MM: 189,17g.mol<sup>-1</sup>

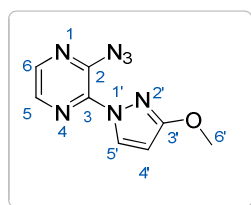
Ce composé est préparé selon la Procédure générale C à partir du 2-azido-3-chloro-pyrazine (**16**), du  $K_2CO_3$  et du 4-methoxy-1H-pyrazole (**51**) (110mg, 0.59mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile anhydre (12mL). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 18h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est repris dans le 1,2-dichlorobenzène (12mL) et est chauffé 2h à 165°C. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (2 paliers: éther de pétrole 100% puis dichlorométhane/acétate d'éthyle 8/2). Le produit (**59**) est obtenu avec un rendement de 40% (39mg) sous la forme d'une poudre jaune.

$P_f$ : 220°C (décomposition exothermique)

RMN ( $^1H$ , 400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.40 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.89 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.66 (s, 1H)

RMN ( $^{13}C$ , 101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  142.33, 130.28, 99.58, 94.93, 58.98 (carbones quaternaires non visibles)

SM (IC+) :  $m/z$  190 ( $M+H^+$ ).

**2-azido-3-(3-methoxy-1H-pyrazol-1-yl)pyrazine (60)**

$C_8H_7N_7O$   
MM: 217,19g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale A avec le 3-méthoxy-1H-pyrazole (**50**) comme nucléophile. Le temps de réaction est de 2h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole (5:5) comme éluant. Le milieu réactionnel est concentré, le résidu est repris à l'eau et est extrait deux fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont

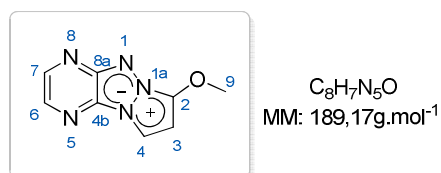
rassemblées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées et concentrées à sec. Le produit attendu **(24)** est obtenu avec un rendement de 82% (324mg) sous la forme d'une poudre blanche.

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  9.27 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 8.54 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 8.15 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 6.21 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 4.15 (s, 3H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  135.33, 132.83, 114.90, 100.91, 57.44

**SM (IC+)** :  $m/z$  190 ( $\text{M}+\text{H}^+-\text{N}_2$ ), 218 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 240 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ).

**7-methoxypyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (61a)**



Ce composé est préparé selon la Procédure générale B: une solution de **(60)** (320mg, 1.47mmol, 1éq) dans le 1,2-dichlorobenzène (15mL) placé sous argon est chauffée à 165°C pendant 2h. Après retour à température ambiante, le solvant est éliminé par distillation sous vide et le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol 97/3; dépôt solide). Le produit désiré **(61a)** est obtenu avec un rendement de 51% (142mg) sous la forme d'une poudre marron.

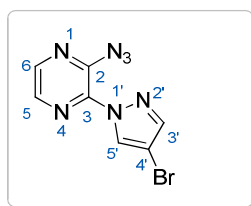
**IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )** : 3115, 3097, 1615, 1583, 1532, 1506.

**P<sub>f</sub>** : 180°C

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.32 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 7.96 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.48 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 4.24 (s, 3H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  143.10, 142.65, 128.35, 110.29, 95.74, 60.15

**SM (IC+)** :  $m/z$  190 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

**2-azido-3-(4-bromo-1H-pyrazol-1-yl)pyrazine (62)**

$C_7H_4BrN_7$   
MM: 266,06g.mol<sup>-1</sup>

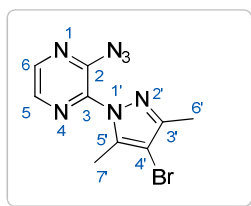
Ce composé est préparé selon la *Procédure générale A* avec le 4-bromo-1H-pyrazole comme nucléophile. Après 8h d'agitation à reflux du solvant, une quantité supplémentaire de 4-bromo-1H-pyrazole (0.05éq.) est ajoutée dans le milieu. Le temps de réaction totale est de 9h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (6/4) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec, le résidu obtenu est repris à l'eau et est laissé sous agitation à 0°C pendant 20min. La suspension est filtrée pour donner le produit désiré **(62)** avec un rendement de 96% (3,3g) sous la forme d'une poudre blanche.

$P_f$ : 240°C (décomposition exothermique)

RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.16 (s, 1H), 8.71 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 8.17 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H)

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 146.47, 131.72, 130.93, 116.82, 100.19

HRMS (ESI) : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>7</sub> 265.9784, mesuré 265.9784

**2-azido-3-(4-bromo-3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)pyrazine (63)**

$C_9H_8BrN_7$   
MM: 294,11g.mol<sup>-1</sup>

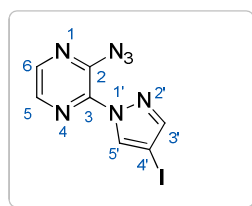
Ce composé est préparé selon la *Procédure générale A* à partir de 2-azido-3-chloro-pyrazine (0,20g, 1,3mmol, 1éq.), de 4-bromo-3,5-diméthyl-1H-pyrazole (0,248 g, 1,4mmol, 1,1éq.) et de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,36g, 2,6mmol, 2éq.). Une fois le composé de départ entièrement consommé, le résidu est dissout dans un minimum de dichlorométhane et le produit désiré est précipité par ajout d'éther de pétrole. Le précipité est ensuite filtré sur Büchner et lavé à l'éther de pétrole pour donner 0,286 g (0,97mmol, 76%) du produit attendu **(63)** sous la forme d'une poudre jaune pâle.

RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.67 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 8.09 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.44 (s, 3H).

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 152.67, 143.82, 141.36, 140.09, 130.94, 116.50, 102.75, 13.88, 13.16.

**HRMS (IC+)** :  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_9H_9BrN_7$  294.0097, mesuré 294.0097.

**2-azido-3-(4-iodo-1H-pyrazol-1-yl)pyrazine (64)**



$C_7H_4IN_7$   
MM: 313,06g.mol<sup>-1</sup>

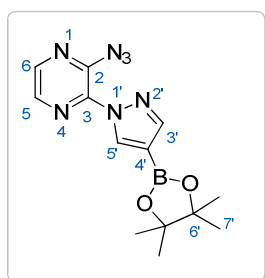
Ce composé est préparé selon la Procédure générale A avec le 4-bromo-1H-pyrazole comme nucléophile. Le temps de réaction est de 2h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (8/2) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec, le résidu est repris à l'eau distillée et est laissé sous agitation à 0°C pendant 20min. La suspension est filtrée puis rincée à l'acétonitrile pour obtenir le produit désiré **(64)** avec un rendement de 93% (2,8g) sous forme d'une poudre blanche.

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, DMSO)** δ 9.35 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 9.13 (s, 1H), 8.26 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 8.19 (s, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, DMSO)** δ 149.21, 140.62, 139.20, 134.98, 131.50, 118.53, 64.59

**SM (IC+)** :  $m/z$  286 ( $M+H^+-N_2$ ), 314 ( $MH^+$ ), 335 ( $M+Na^+$ ).

**2-azido-3-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazol-1-yl)pyrazine (65)**



$C_{13}H_{16}BN_7O_2$   
MM: 313,12g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale A avec l'estér pinacolique de l'acide 4-pyrazoleboronique comme nucléophile. Le temps de réaction est de 3h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/méthanol (98:2) comme éluant. Le milieu réactionnel est filtré à chaud et est rincé avec de l'acétonitrile. Le filtrat est concentré sous pression réduite et le solide obtenu est solubilisé dans quelques gouttes de chloroforme et est précipité dans le pentane. Le précipité est éliminé par filtration, le filtrat est concentré et est filtré sur silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 8/2). Après quelques lavages au pentane le produit désiré **(65)** est obtenu avec un rendement de 87% (210mg) sous la forme d'une poudre blanche.

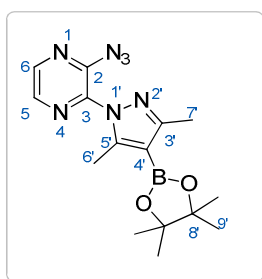
$P_f$ : 294°C (fusion/décomposition)

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.43 (s, 1H), 8.69 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.17 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 1.37 (s, 12H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150.31, 141.66, 138.52, 138.12, 131.62, 116.13, 83.90, 24.67

SM (IC+) :  $m/z$  314 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

**2-azido-3-(3,5-dimethyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazol-1-yl)pyrazine (66)**



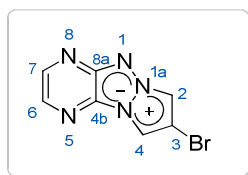
$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{BN}_7\text{O}_2$   
MM: 341,18g.mol $^{-1}$

Ce composé est préparé selon la Procédure générale A avec l'ester pinacolique de l'acide 3,5-diméthyl-4-pyrazoleboronique comme nucléophile. Le temps de réaction est de 3h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange dichlorométhane/méthanol (98:2) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré et le filtrat est concentré. Le résidu brut est filtré sur silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 8/2). Après quelques lavages au pentane le produit désiré **(66)** est obtenu avec un rendement de 87% (210mg) sous la forme d'une poudre blanche.

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.64 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 8.10 (d,  $J = 4.3$  Hz, 1H), 2.83 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 1.34 (s, 12H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.67 (Cq), 152.05 (Cq), 144.24 (Cq), 140.57 (Cq), 131.10, 116.26, 83.33 (Cq), 25.07, 14.78, 14.47

SM (IC+) :  $m/z$  341 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 313 ( $\text{M}+\text{H}^+-\text{N}^2$ ).

**8-bromopyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (67)**

$C_7H_4BrN_5$   
MM: 238,04g.mol<sup>-1</sup>

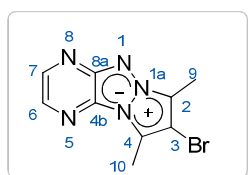
Ce composé est préparé selon la Procédure générale B à partir du composé **(62)** (5.6mmol) dans le 1,2-dichlorobenzène (90mL). Après 20 minutes de réaction, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole 100%, dichlorométhane/acétate d'éthyle 10/0 puis 9/1; dépôt solide). Le produit **(67)** est obtenu avec un rendement de 97% (1.34g) sous la forme d'une poudre jaune.

$P_f > 260^\circ C$

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.50 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, H), 8.11 (s, 1H), 7.97 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H), 7.87 (s, 1H).

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 151.48 (C<sub>q</sub>), 143.86, 131.27, 128.87(C<sub>q</sub>), 110.12, 109.50, 98.49.

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>5</sub> 237.9723, mesuré 237.9722

**8-bromo-7,9-dimethylpyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (68)**

$C_9H_8BrN_5$   
MM: 266,10g.mol<sup>-1</sup>

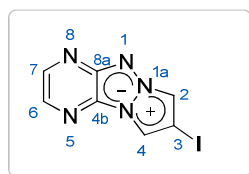
Ce composé est préparé selon la Procédure générale B à partir du composé **(63)** (0,51 mmol) dans le 1,2-dichlorobenzène à 160°C pendant une heure. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole 100%, dichlorométhane/acétate d'éthyle 10/0 puis 8/2; dépôt liquide). Le produit **(68)** est obtenu avec un rendement de 90% (122mg) sous la forme d'une poudre jaune.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.33 (s, 1H), 7.78 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 2.84 (d,  $J = 1.2$  Hz, 2H), 2.62 (s, 3H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 152.24, 142.63, 131.08, 129.13, 122.36, 118.84, 98.73, 10.28, 9.83

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>5</sub> 266.0036, mesuré 266.0035



**8-iodopyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (69)**

$C_7H_4IN_5$   
MM: 285,05g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale B* à partir du composé **(64)** (7.67mmol) dans le 1,2-dichlorobenzène (120mL). Après 20 min à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole 100%, dichlorométhane/acétate d'éthyle 10/0 puis 8/2 ; dépôt liquide). Le produit **(69)** est obtenu avec un rendement de 93% (2.03g) sous forme d'une poudre jaune-orange.

Ce composé est également préparé selon la *Procédure générale C* à partir du 2-azido-3-chloro-pyrazine **(16)**, de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et du 4-iodo-1H-pyrazole (2.12g, 10.9mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile anhydre (75mL). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 3h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est repris dans le 1,2-dichlorobenzène (75mL) et est chauffé 40min à 165°C. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (2 paliers : éther de pétrole 100%, dichlorométhane/acétate d'éthyle 8/2). Le produit **(69)** est obtenu avec un rendement de 86% (2.35g) sous forme d'une poudre jaune.

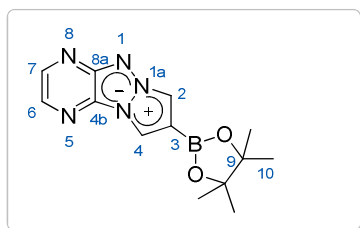
R<sub>f</sub> : (DCM/AcOEt/MeOH : 80/19/1) 0.32

P<sub>f</sub> : 255°C (décomposition)

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.50 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.96 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.87 (s, 1H).

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150.91, 142.91, 130.07, 127.73, 113.37, 112.02.

HRMS (ESI) : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>IN<sub>5</sub> 285.9584, mesuré 285.9582

**8-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (70)**

$C_{13}H_{16}BN_5O_2$   
MM: 285,11g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale B* à partir du composé **(65)** (0.36mmol) dans le 1,2-dichlorobenzène (5mL). Le temps de réaction est de 45min. Le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré. Le résidu brut obtenu est solubilisé dans un minimum de chloroforme et est dilué dans le pentane (précipitation des impuretés). Le filtrat est concentré puis coévaporé au chloroforme. Le produit **(70)** est obtenu avec un rendement de 65% (67mg) sous la forme d'une poudre jaune.

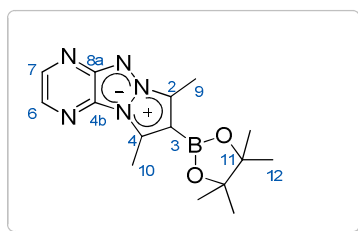
**P<sub>f</sub>** : 180°C

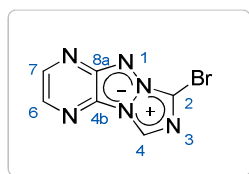
**RMN (<sup>1</sup>H, 400MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.38 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 1.34 (s, 12H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 153.31, 143.53, 129.86, 129.12, 116.15, 113.31, 84.71, 24.90

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>BN<sub>5</sub>O<sub>2</sub> 286.1472, mesuré 286.1472

**7,9-dimethyl-8-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl) pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (71)**



**7-bromo-[1,2,4]triazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (72)**

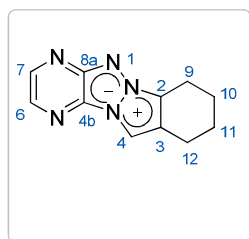
$C_6H_3BrN_6$   
MM: 239,03g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale C* à partir du 2-azido-3-chloro-pyrazine (**16**), de  $K_2CO_3$  et du 3-bromo-1,2,4-triazole (1g, 6.75mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile anhydre (85mL). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 2h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est repris dans le 1,2-dichlorobenzène (85 mL) et est chauffé à 165°C pendant 2h. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (2 paliers : éther de pétrole 100% puis dichlorométhane/acétate d'éthyle 80/20). Le produit (**72**) est obtenu avec un rendement de 18% (283mg) sous la forme d'une poudre jaune.

$P_f$ : 212°C (décomposition)

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.77 (s, 1H), 8.62 (dd,  $J = 2.6, 0.7$  Hz, 1H), 8.05 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H)

SM (IC<sup>+</sup>) :  $m/z$  240 ( $M+H^+$ )

**8,9,10,11-tetrahydropyrazino[2',3':4,5][1,2,3]triazolo[1,2-a]indazol-6-ium-5-ide (73)**

$C_6H_3BrN_6$   
MM: 239,03g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale C* à partir du 2-azido-3-chloro-pyrazine (**16**), du  $K_2CO_3$  et du 4,5,6,7-tétrahydro-1H-indazole (230mg, 1.9mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile anhydre (25mL). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 4h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est repris dans le 1,2-dichlorobenzène (25mL) et est chauffé 1h à 165°C. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (3 paliers : éther de pétrole 100%, dichlorométhane/acétate d'éthyle/méthanol 80/20/0 puis 80/18/2; dépôt solide). Le produit (**73**) est obtenu avec un rendement de 79% (332mg) sous la forme d'une poudre jaune.

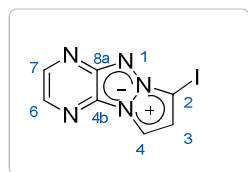
$P_f$ : 181°C

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.33 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.77 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 3.00 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 2.83 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 2.06-1.97 (m, 2H), 1.96-1.84 (m, 2H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  142.26, 128.57, 107.06, 22.71, 21.79, 21.43, 20.58

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_5$  214.1087, mesuré 214.1089

**7-iodopyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (xx)**



$\text{C}_7\text{H}_4\text{IN}_5$   
MM: 285,05g.mol $^{-1}$

Ce composé est préparé selon la Procédure générale C à partir du 2-azido-3-chloro-pyrazine (**16**), de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  et du 3-iodo-1H-pyrazole (800mg, 4.1mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile anhydre (30mL). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 1h45. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est repris dans le 1,2-dichlorobenzène (30mL) et est chauffé 2h à 165°C. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (2 paliers : éther de pétrole 100% puis dichlorométhane/acétate d'éthyle 9/1; dépôt solide). Le produit (**74**) est obtenu avec un rendement quantitatif (888mg) sous forme d'une poudre jaune-orange.

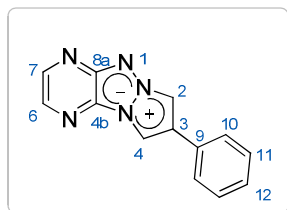
$P_f$ : 236°C

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.49 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 8.08 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 7.93 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.02 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  152.22, 143.82, 130.99, 130.67, 117.52, 111.95, 56.64

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_7\text{H}_5\text{IN}_5$  285.9584, mesuré 285.9583

**8-phenylpyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (75)**



$\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_5$   
MM: 235,24g.mol $^{-1}$

Ce composé est préparé selon la Procédure générale D dans un ballon, à partir de l'acide phénylboronique (28mg, 0.22mmol, 1.5éq) et du dérivé bromé (**67**) (35mg, 0.14mmol, 1éq) dans le 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (3.5mL/1.5mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation au reflux du solvant pendant 45min. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle : 8/2 ; dépôt solide). Après une précipitation dans le chloroforme/pentane, le produit désiré (**75**) est obtenu avec un rendement de 88% (29mg) sous forme d'une poudre jaune.

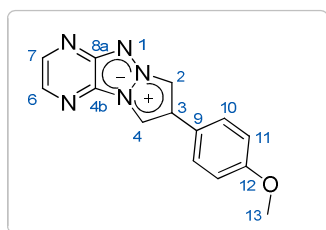
**P<sub>f</sub>** : 240°C

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.45 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 8.28 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 8.09 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.93 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 7.62 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 2H, H<sub>11</sub>), 7.55 – 7.36 (m, 3H).

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 143.41, 130.46, 130.13, 129.55, 128.91, 127.05, 126.59, 106.72, 106.21, 77.67, 77.16, 76.65.

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub> 236.0931, mesuré 236.0931

**8-(4-methoxyphenyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (**76**)**



C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O  
MM: 265,27g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la procédure générale D à partir de l'acide 4-méthoxyphénylboronique (74mg, 0.47mmol, 1.5éq.) et du dérivé bromé (**67**) (75mg, 0.32mmol, 1éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (7.5mL/3mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant 5h. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 8/2 puis dichlorométhane/méthanol 97/3 ; dépôt solide). Le produit (**76**) est obtenu avec un rendement de 70% (97mg) sous la forme d'une poudre jaune.

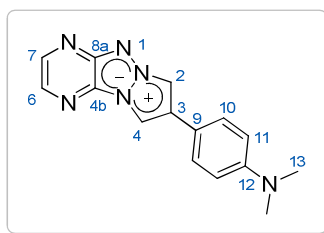
**P<sub>f</sub>** : 270°C

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.43 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 8.19 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 8.03 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.91 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 160.42, 143.34, 130.50, 127.84, 126.93, 122.76, 114.97, 106.58, 105.66, 55.60

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{14}H_{12}N_5O$  266.1036, mesuré 266.1037

**8-(4-(diméthylamino)phenyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (77)**



$C_{15}H_{14}N_6$   
MM: 278,31g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale D dans un ballon, en utilisant l'acide 4-(N,N-diméthylamino)phénylboronique (72mg, 0.47mmol, 1.5éq.) et le dérivé bromé (**67**) (75mg, 0.32mmol, 1éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (7.5mL/3mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant 18h. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 9/1 puis 7/3 ; dépôt solide). Après une précipitation dans un mélange chloroforme/pentane et des lavages au pentane, le produit désiré (**77**) est obtenu avec un rendement de 82% (73mg) sous la forme d'une poudre jaune.

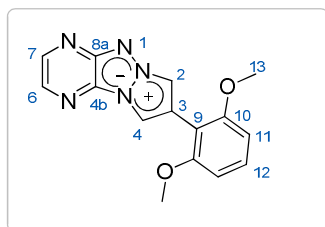
$P_f > 260^\circ C$

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO)**  $\delta$  8.97 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 8.85 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.33 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.88 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 7.69 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.80 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 2.95 (s, 6H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, DMSO)**  $\delta$  126.89 (C<sub>6</sub>), 112.40 (C<sub>7</sub>) (les autres carbone ne sont pas visibles même à forte concentration et en augmentant le nombre de scans)

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{15}H_{15}N_6$  279.1353, mesuré 279.1353

**8-(2,6-diméthoxyphényl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (78)**



$C_{15}H_{13}N_5O_2$   
MM: 295,30g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale D dans un tube scellé, à partir de l'acide 2,6-diméthoxyphénylboronique (49mg, 0.26mmol, 1.5éq.) et du dérivé iodé (**69**) (50mg, 0.18mmol, 1éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (4.25mL/1.75mL). Le mélange réactionnel est chauffé au micro-ondes à 150°C pendant 20min. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de

gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 90/10 puis 70/30 ; dépôt solide). Le produit **(78)** est obtenu avec un rendement de 80% (41mg) sous forme d'une poudre jaune.

**R<sub>f</sub>** : (DCM/MeOH : 97/3) 0.2

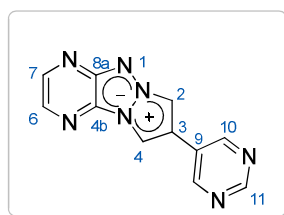
**P<sub>f</sub>** : 196°C

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.61 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.37 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.32 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.94 (s, 6H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 157.76, 152.73, 142.63, 129.55, 128.91, 117.40, 111.39, 111.17, 107.52, 104.30, 55.90

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O 296.1142, mesuré 296.1142

**8-(pyrimidin-5-yl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (79)**



C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>N<sub>7</sub>  
MM: 237,22g.mol<sup>-1</sup>

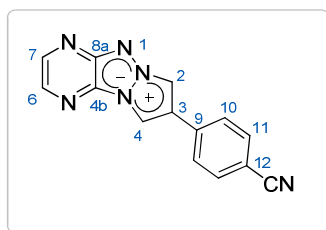
Ce composé est préparé selon la Procédure générale C dans un tube scellé, à partir de l'acide pyrimidine-5-boronique (93mg, 0.47mmol, 1.5éq.) et du dérivé bromé **(67)** (75mg, 0.32mmol, 1éq) dans le 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (7.5mL/3mL). Le mélange réactionnel est chauffé au micro-ondes à 150°C pendant 20min (changement de couleur de jaune vers marron). Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol 97/3 puis 95/5 ; dépôt solide). Après une précipitation dans le mélange chloroforme/pentane et des lavages au pentane, le produit désiré **(79)** est obtenu avec un rendement de 74% (56mg) sous la forme d'une poudre jaune.

**P<sub>f</sub>** > 260°C

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, DMSO)** δ 9.35 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, DMSO)** δ 158.09, 154.54, 152.44, 143.37, 130.34, 119.63, 109.28, 107.67

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>7</sub> 238.0836, mesuré 238.0837

**8-(4-cyanophenyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (80)**

$C_{14}H_8N_6$   
MM: 260,25g.mol<sup>-1</sup>

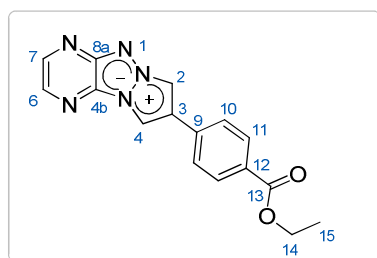
Ce composé est préparé selon la *Procédure générale D* dans un tube scellé, à partir de l'acide 4-cyanophénylboronique (48mg, 0.32mmol, 1.5éq.) et du dérivé bromé **(67)** (50mg, 0.21mmol, 1éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/ H<sub>2</sub>O (7.5mL/3mL). Le mélange réactionnel est chauffé au micro-ondes à 150°C pendant 30min (changement de couleur de jaune à vert-marron). Après retour à température ambiante le milieu réactionnel est filtré sur millipore et est rincé au 1,4-dioxane. Après des lavages au pentane, le produit désiré **(80)** est obtenu avec un rendement quantitatif (58mg) sous la forme d'une poudre verdâtre.

$P_f > 260^\circ\text{C}$

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, DMSO)** δ 9.32 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.37 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 8.07 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.97 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.96 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, DMSO)** δ 142.03, 133.25, 126.65, 124.52, 109.24 (précipitation dans le DMSO, les signaux sont très peu visibles).

**HRMS (ESI)** :  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{14}H_9N_6$  261.0883, mesuré 261.0883

**8-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (81b)**

$C_{16}H_{13}N_5O_2$   
MM: 307,31g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale D* dans un tube scellé, à partir de l'acide 4-(éthoxycarbonyl)phénylboronique (93mg, 0.48mmol, 1.6éq.) du dérivé bromé **(67)** (76mg, 0.32 mmol, 1éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/EtOH (7.5mL/3mL). Le mélange réactionnel est chauffé au micro-ondes à 150°C pendant 20min (changement de couleur de jaune vers marron). Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol 100/0 puis 97/3; dépôt solide). Après une précipitation dans le mélange chloroforme/pentane et des lavages au



pentane, le produit désiré **(81b)** est obtenu avec un rendement de 85% (84mg) sous forme d'une poudre jaune.

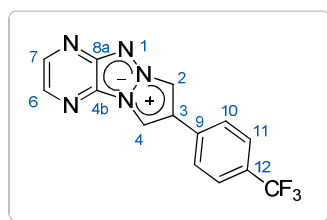
$P_f > 260^\circ\text{C}$

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.48 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.15 (d,  $J = 3.3$  Hz, 2H), 7.95 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.69 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 4.42 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.43 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  165.86, 152.07, 143.35, 134.32, 130.46, 126.00, 125.62, 106.39, 61.08, 14.30

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_2$  308.1142, mesuré 308.1142

**8-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (82)**



$\text{C}_{14}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_5$   
MM: 303,24g.mol $^{-1}$

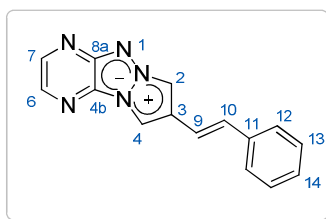
Ce composé est préparé selon la Procédure générale D dans un tube scellé, à partir de l'acide 4-(trifluorométhyl)phénylboronique (50.4mg, 0.25mmol, 1.5éq.) et du dérivé bromé **(67)** (40mg, 0.17mmol, 1éq.) dans le 1,4-dioxane/EtOH (4.25mL/1.75mL). Le mélange réactionnel est chauffé au micro-ondes à  $150^\circ\text{C}$  pendant 30min (changement de couleur de jaune à vert). Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol 100/0 puis 95/5; dépôt solide). Après une précipitation dans le mélange chloroforme/pentane et des lavages au pentane, le produit désiré **(82)** est obtenu avec un rendement de 45% (23mg) sous forme d'une poudre jaune.

$P_f > 260^\circ\text{C}$

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.49 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_6$ ), 8.34 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ), 8.13 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7.97 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H,  $\text{H}_7$ ), 7.75 (s, 4H,  $\text{H}_{10-11}$ ).

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 20K)** (Carbones non visibles)

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_5$  304.0805, mesuré 304.0803

**(E)-8-styrylpyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (83)**

$C_{15}H_{11}N_5$   
MM: 261,28g.mol<sup>-1</sup>

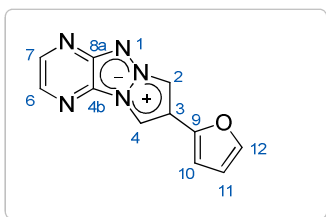
Ce composé est préparé selon la Procédure générale D dans un tube scellé, à partir de l'acide (E)-2-phenylvinylboronique (120mg, 0.79mmol, 1.5éq.) et du dérivé iodé **(69)** (150mg, 0.53mmol, 1éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (7.5mL/3mL). Le mélange réactionnel est chauffé au micro-ondes à 150°C pendant 30min. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 100/0, 95/5 puis 90/10; dépôt solide). Le produit désiré **(83)** est obtenu avec un rendement de 62% (86mg) sous forme d'une poudre jaune.

**R<sub>f</sub>** : (DCM/AcOEt : 9/1) 0.33

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.43 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 7.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 7.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 135.98, 132.19, 130.32, 129.26, 128.87, 128.49, 126.54, 124.57, 116.53, 107.09, 106.32, 33.41

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub> 262.1087, mesuré 262.1086

**8-(furan-2-yl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (84)**

$C_{11}H_7N_5O$   
MM: 225,21g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale D dans un tube scellé, à partir de l'acide 2-furanylboronique (30mg, 0.26mmol, 1.5éq.) et du dérivé iodé **(69)** (50mg, 0.18mmol, 1éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (4.75mL/1.75mL). Le mélange réactionnel est chauffé au micro-ondes à 150°C pendant 18min. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 100/0 puis 90/10; dépôt solide). Le produit **(84)** est obtenu avec un rendement de 83% (33mg) sous la forme d'une poudre jaune-verte.

**R<sub>f</sub>** : (DCM/MeOH : 97/3) 0.33

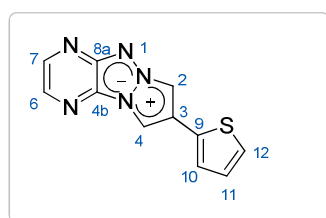
**P<sub>f</sub>** : 227°C

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.45 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 1.9, 0.8 Hz, 1H), 6.66 (dd, *J* = 3.4, 0.8 Hz, 1H), 6.53 (dd, *J* = 3.4, 1.8 Hz, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 152.36 (C<sub>q</sub>), 144.99 (C<sub>q</sub>), 143.30, 142.82, 130.51, 129.24 (C<sub>q</sub>), 117.98 (C<sub>q</sub>), 111.74, 107.32, 105.32, 104.97

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>5</sub>O 226.0723, mesuré 226.0726

**8-(thiophen-2-yl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (85)**



C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>S  
MM: 241,27g.mol<sup>-1</sup>

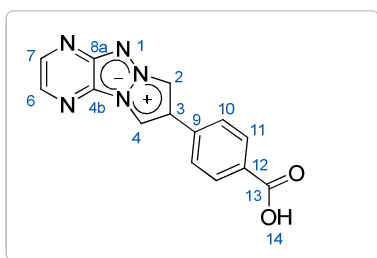
Ce composé est préparé selon la Procédure générale C dans un tube scellé, à partir de l'acide 2-thienylboronique (62mg, 0.48mmol, 1.5éq.) et du dérivé bromé (**67**) (75mg, 0.32mmol, 1éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (7.5mL/3mL). Le mélange réactionnel est chauffé au micro-ondes à 150°C pendant 1h (changement de couleur de jaune vers marron). Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 100/0 puis 90/10; dépôt solide). Le produit désiré (**85**) est obtenu avec un rendement de 86% (67mg) sous la forme d'une poudre jaune.

**P<sub>f</sub>** : 250°C

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.45 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.13 (t, *J* = 3.65 Hz, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 152.31, 143.48, 132.06, 130.72, 129.35, 128.31, 126.07, 125.56, 120.91, 106.49, 105.95

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>5</sub>S 242.0494, mesuré 242.0497

**8-(4-carboxyphenyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (81a)**

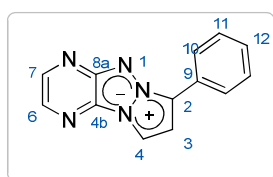
$C_{14}H_9N_5O_2$   
MM: 279,25g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale C dans un tube scellé, à partir de l'acide 4-(éthoxycarbonyl)phénylboronique (93mg, 0.48mmol, 1.6éq.) et du dérivé bromé (**67**) (75mg, 0.32mmol, 1éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (7.5mL/3mL). Le mélange réactionnel est chauffé au micro-ondes à 150°C pendant 20min (changement de couleur de jaune vers marron). Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol 100/0, 97/3, 90/10 puis 70/30 ; dépôt solide). Après des lavages au pentane, le produit (**81a**) est obtenu avec un rendement de 62% (95mg) sous la forme d'une poudre jaune.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO)** δ 9.21 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.38 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.93 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H).

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, DMSO)** δ 151.99, 142.54, 133.33, 129.78, 129.35, 129.03, 128.04, 125.18, 108.30, 107.68 (quelques carbones quaternaires ne sont pas visibles)

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> 280.0829, mesuré 280.0828

**7-phenylpyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (86)**

$C_{13}H_9N_5$   
MM: 235,24g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale D dans un ballon sec, à partir du dérivé iodé (**69**) (100mg, 0.35mmol, 1éq.) et l'acide phénylboronique (65mg, 0.53mmol, 1.5éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (5.6mL/2.2mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant 1h30. Après retour à température ambiante le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol 100/0 puis 95/5 ; dépôt solide). Après une précipitation dans le mélange

chloroforme/pentane et des lavages au pentane, le produit désiré **(86)** est obtenu avec un rendement de 28% (80mg) sous la forme d'une poudre orange.

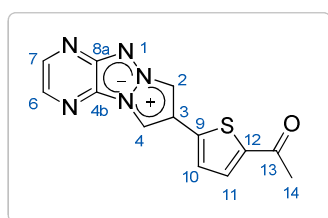
$P_f$  : 216°C

**RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.47 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H), 8.38 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 8.15 (d,  $J$  = 3.4 Hz, 1H), 7.92 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 2H), 7.61 – 7.52 (m, 1H), 7.44 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H).

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  142.34, 129.42, 128.22, 128.00, 125.97, 125.14, 109.91, 106.54.

**SM (IC $^+$ )** :  $m/z$  284 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

**8-(5-acetylthiophen-2-yl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (**87**)**



$\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_5\text{OS}$   
MM: 283,31g.mol $^{-1}$

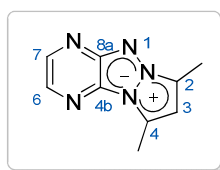
Ce composé est préparé selon la Procédure générale D dans un ballon, à partir de l'acide 5-acétyl-2-thienylboronique (55mg, 0.32mmol, 1.5éq.) et du dérivé bromé **(67)** (50mg, 0.21 mmol, 1éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/ $\text{H}_2\text{O}$  (4.25mL/1.75mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant 48h. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 100/0 puis 90/10 ; dépôt solide). Après une précipitation dans un mélange chloroforme/pentane et des lavages au pentane, le produit désiré **(87)** est obtenu avec un rendement de 8% (5mg) sous forme d'une poudre jaune.

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.49 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.98 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 7.69 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 2H), 7.33 (d,  $J$  = 3.9 Hz, 1H), 2.60 (s, 3H).

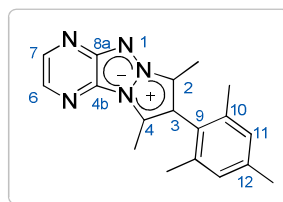
**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz, Acétone, 3K)** Pas de carbones de visibles (quantité insuffisante et le composé précipite dans les solvants organiques).

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_5\text{OS}$  284.0601, mesuré 284.0600

**7,9-dimethylpyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (92a) et 8-mesityl-7,9-dimethylpyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (92b)**



$C_9H_9N_5$   
MM: 187,20



$C_{18}H_{19}N_5$   
MM: 305,38

Dans un tube scellé sec et sous argon, le boronate **71** (50mg, 0.16mmol, 1éq.) est solubilisé dans 2 mL de THF. Ensuite, le bromomésitylène (37µL, 0.24mmol, 1.5éq.) et le carbonate de césium (104mg, 0.32mmol, 2éq.) sont séquentiellement ajoutés. Après 10 minutes de dégazage sous argon, le Xantphos (14.8mg, 0.026mmol, 16mol%) et le  $Pd_2(dba)_3$  (5.7mg, 0.0064mmol, 4mol%) sont ajoutés successivement. Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 80°C durant 3h (changement de couleur de jaune vers marron clair). Le résidu brut est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (Dichlorométhane pur puis dichlorométhane/AcOEt 7/4 ; dépôt solide). Deux produits sont par la suite isolés en tant que poudres jaunes : le composé déboroné **92a** (27mg, 90%) et le produit de couplage **92b** (5mg, 10%)

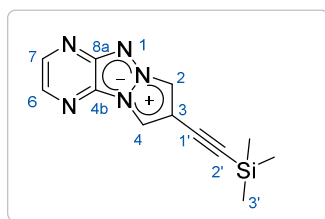
**92a**

HRMS (ESI) :  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_9H_{10}N_5$  188.0931, mesuré 188.0931

**92b**

HRMS (ESI) :  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{18}H_{20}N_5$  306.1713, mesuré 306.1715

**8-((trimethylsilyl)ethynyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (93)**



$C_{12}H_{13}N_5Si$   
MM: 255,35g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale F à partir du triméthyl(éthynyl)silane (500µL, 3.7mmol, 2éq.) et du dérivé iodé (**69**) (50mg, 1.75mmol, 1éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 2h (changement de couleur de jaune vers vert-marron). Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (Cyclohexane/AcOEt 6/4 ; dépôt solide). Le produit désiré (**93**) est obtenu avec un rendement de 68% (304mg) sous la forme d'une poudre jaune.

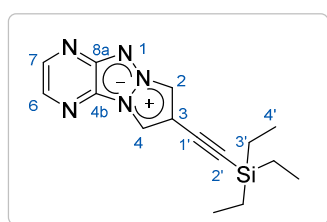
$P_f$ : 197°C

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.46 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.94 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 0.29 (s, 9H).

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152.90 ( $\text{C}_q$ ), 143.79, 130.87, 112.45, 110.80, 107.76 ( $\text{C}_q$ ), 99.80 ( $\text{C}_q$ ), 95.19 ( $\text{C}_q$ ), 93.13 ( $\text{C}_q$ ), -0.16 ( $\text{C}_3'$ ).

HRMS (ESI) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{Si}$  256.1018, mesuré 298.1013

**8-((triethylsilyl)ethynyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (94)**



$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{Si}$   
MM: 297,43g.mol $^{-1}$

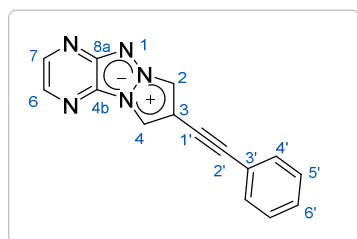
Ce composé est préparé selon la Procédure générale F à partir du triéthyl(éthynyl)silane (0.73mmol) et du dérivé iodé (**69**) (100mg, 0.35mmol, 1éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous à température ambiante pendant 7h (changement de couleur de jaune à vert). Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/cyclohexane 10/0 puis 8/2 ; dépôt solide dans le dichlorométhane). Le produit désiré (**94**) est obtenu avec un rendement de 62% (65mg) sous forme d'une poudre jaune.

$R_f$ : (cyclohexane/AcOEt : 5/5) 0.71

RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.45 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.92 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 1.06 (t,  $J = 7.8$  Hz, 9H), 0.71 (q,  $J = 7.8$  Hz, 6H)

HRMS (ESI) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{Si}$  298.1482, mesuré 298.1482

**8-(phenylethynyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide(95)**



$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{N}_5$   
MM: 259,26g.mol $^{-1}$

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale F* à partir du phénylacétylène (1.1mmol) et du dérivé iodé **(69)** (150mg, 0.53mmol, 1éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 1h30. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/AcOEt 10/0 puis 9/1 ; dépôt solide). Le produit désiré **(95)** est obtenu avec un rendement de 51% (41mg) sous la forme d'une poudre jaune.

**R<sub>f</sub>** : (DCM/AcOEt/MeOH: 80/19/1) 0.85

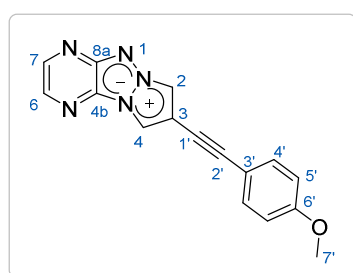
**P<sub>f</sub>** : 238°C

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.48 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.60 – 7.52 (m, 2H), 7.43 – 7.35 (m, 3H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 152.66, 143.75, 131.83, 130.87, 129.34, 128.69, 122.01, 111.91, 110.51, 107.86, 93.27, 78.13

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub> 260.0931, mesuré 260.0931

**8-((4-methoxyphenyl)ethynyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide  
(96)**



C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O  
MM: 289,29g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale F* à partir du 1-éthynyl-4-méthoxybenzène (0.73mmol) et du dérivé iodé **(69)** (100mg, 0.35mmol, 1éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 6h (changement de couleur de jaune vers vert). Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/AcOEt: 10/0, 9/1 ; dépôt solide dans DCM). Le produit désiré **(96)** est obtenu avec un rendement de 44% (41mg) sous la forme d'une poudre jaune.

**R<sub>f</sub>** : (DCM/AcOEt/MeOH : 80/19/1) 0.41

**P<sub>f</sub>** : 210°C

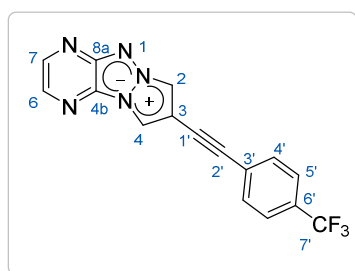
**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.46 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.94 (d, *J* = 1.6 Hz, 3H), 7.55 – 7.46 (m, 2H), 6.95 – 6.87 (m, 2H)



RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160.59, 152.64, 143.66, 133.38, 130.77, 129.16, 114.36, 114.01, 111.69, 110.54, 108.35, 93.36, 55.51

HRMS (ESI) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}$  290.1036, mesuré 290.1039

**8-((4-(trifluoromethyl)phenyl)ethynyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (97)**



$\text{C}_{16}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_5$   
MM: 327,26g.mol $^{-1}$

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale F* à partir du 4-trifluorophénylacétylène (1.05mmol) et du dérivé iodé (**69**) (150mg, 0.53mmol, 1éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24h. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/AcOEt 100/0 puis 95/5 ; dépôt solide dans le dichlorométhane). Le produit désiré (**97**) est obtenu avec un rendement de 58% (41mg) sous la forme d'une poudre jaune.

$R_f$ : (DCM/AcOEt: 9/1) 0.5

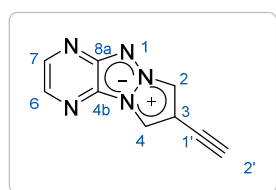
$P_f$ : 237°C

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.49 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.97 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.66 (s, 4H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152.53, 143.79, 131.91, 130.99, 130.95, 125.67, 125.50, 125.46, 111.89, 110.18, 106.95, 91.63, 80.36

HRMS (ESI) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_5$  328.0805, mesuré 328.0805

**8-ethynylpyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (98)**



$\text{C}_9\text{H}_5\text{N}_5$   
MM: 183,17g.mol $^{-1}$

Le composé **(93)** (230mg, 0.90mmol, 1éq.) est solubilisé dans une solution anhydre d'ammoniac dans le méthanol à 7N (28mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 25min. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu brut est filtré sur gel de silice (DCM/AcOEt 7/3) pour donner le produit désiré **(98)** avec un rendement de 89% (147mg) sous la forme d'une poudre jaune-verte claire.

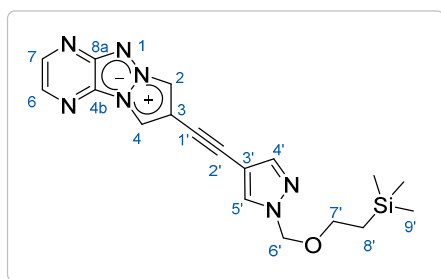
$P_f$ : 234°C

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.47 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.95 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 3.23 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152.56, 143.77, 130.89, 128.85, 112.62, 110.67, 106.36, 81.58, 72.58

HRMS (ESI) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_5$  184.0618, mesuré 184.0615

**8-((1-((2-(triméthylsilyl)ethoxy)méthyl)-1H-pyrazol-4-yl)ethynyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (102)**



$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{OSi}$   
MM: 379,49g.mol $^{-1}$

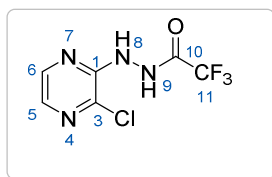
Ce composé est préparé selon la *Procédure générale F* à partir du composé **(98)** alcyne vrai (50mg, 0.27mmol, 1éq.) et du 4-iodo-1-((2-(triméthylsilyl)ethoxy)méthyl)-1H-pyrazole<sup>180</sup> (130mg, 0.41mmol, 1.5éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 18h. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane/AcOEt 5/5 puis DCM/MeOH 9/1 ; dépôt solide dans le méthanol). Le produit désiré **(102)** est obtenu avec un rendement de 28% (30mg) sous forme d'une poudre jaune.

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.47 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.95 (dd,  $J$  = 4.8, 2.8 Hz, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 5.44 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 2H), 3.59 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 0.93 (t,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 0.01 (s, 9H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  143.74, 142.53, 132.67, 130.88, 111.70, 107.94, 80.67, 67.35, 17.97

HRMS (ESI) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{OSi}$  380.1650, mesuré 380.1651

<sup>180</sup> 4-iodo-1-((2-(triméthylsilyl)ethoxy)méthyl)-1H-pyrazole est préparé selon le mode opératoire issu de cette référence : Gaël Tran et al. ; *Org. Lett.*, **15**, (21), 5550–5553, (2013)

***N'-(3-chloropyrazin-2-yl)-2,2,2-trifluoroacetohydrazide (111)***

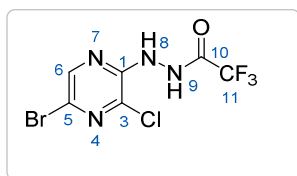
$C_6H_4ClF_3N_4O$   
MM: 240,57g.mol<sup>-1</sup>

A une suspension de (3-chloropyrazin-2-yl)hydrazine (4.8g, 22mmol, 1éq.) dans 58mL de THF anhydre, placée sous atmosphère d'argon et refroidie à 0°C, est ajoutée une solution d'anhydride trifluoroacétique (4mL, 29mmol, 1.3éq.) dans 58 mL de THF anhydre. Après 2h d'agitation à 0°C, le milieu réactionnel est concentré. Le brut réactionnel est repris à l'eau et est extrait trois fois au dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, et concentrées sous pression réduite. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2 ; dépôt solide). Le produit désiré **(111)** est obtenu avec un rendement de 86% sous la forme d'une poudre blanche.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.79 (se, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H). 7.37 (se, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 148.47, 140.18, 135.88, 134.45, 117.27, 114.06

**HRMS (ESI) :** [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O 241.0099, mesuré 241.0101

***N'-(5-bromo-3-chloropyrazin-2-yl)-2,2,2-trifluoroacetohydrazide (112)***

$C_6H_3BrClF_3N_4O$   
MM: 319,46g.mol<sup>-1</sup>

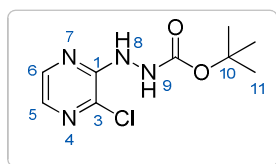
Le N-bromosuccinimide (3.2g, 17.9mmol, 1.5éq.) est ajouté par petites portions à une suspension de N'-(3-chloropyrazin-2-yl)-2,2,2-trifluoroacetohydrazide **(a)** (2.9g, 11.9 mmol, 1éq.) dans 100mL de chloroforme, à 0°C et sous atmosphère d'argon. La suspension obtenue est laissée sous agitation à température ambiante pendant 24h. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane/AcOEt 94/6 ; dépôt solide). Le produit **(112)** est obtenu avec un rendement de 50% sous la forme d'une poudre jaune.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.74 (se, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.31 (se, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 156.07 (q, *J* = 38.4 Hz), 147.84, 142.55, 132.71, 127.55, 115,54 (q, *J* = 250 Hz)

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_9H_{13}BrClN_4O_2$  344.9724, mesuré 344.9720

***tert-butyl 2-(3-chloropyrazin-2-yl)hydrazinecarboxylate (114)***



$C_9H_{13}ClN_4O_2$   
MM: 244,67g.mol<sup>-1</sup>

A une solution de (3-chloropyrazin-2-yl)hydrazine (**17**) (455mg, 3.15mmol, 1éq.) dans le dichlorométhane anhydre, placé sous atmosphère d'argon et à 0°C, est ajouté la triéthylamine (1.32mL, 9.45mmol, 3éq.) et le dicarbonate de di-*tert*-butyle (1.78g, 8.16mmol, 2.2éq.) par petites portions. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 15min à 0°C puis 21h à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite repris à l'eau et est extrait deux fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur  $MgSO_4$ , et concentrées sous pression réduite. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2 puis 7/3; dépôt solide). Le produit désiré (**114**) est obtenu avec un rendement de 89% (771mg) sous la forme d'un solide blanc.

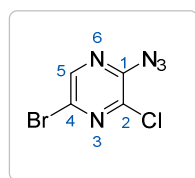
**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.06 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.82 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.88 (s, 1H, NH), 6.50 (s, 1H, NH)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 156.18 (Cq), 151.09 (Cq), 140.69 (C<sub>5</sub> ou C<sub>6</sub>), 134.69 (C<sub>5</sub> ou C<sub>6</sub>), 82.11 (Cq, C<sub>10</sub>), 28.29 (3C, C<sub>11</sub>)

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_9H_{14}ClN_4O_2$  245.0800, mesuré 245.0800

**Référence bibliographique :** WO2004/085607.

**2-azido-5-bromo-3-chloropyrazine (105)**



$C_4HBrClN_5$   
MM: 234,44g.mol<sup>-1</sup>

De l'acide chlorhydrique concentré est ajouté goutte-à-goutte à une suspension du composé (**16**) (1 g, 3.1 mmol, 1 éq.) dans l'éthanol (18 mL). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à reflux durant la nuit (environ 18h). Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole (5/5) comme éluant. Une fois le produit de départ consommé, le milieu réactionnel est laissé revenir à température ambiante et est ensuite refroidi à 0°C. Sous forte

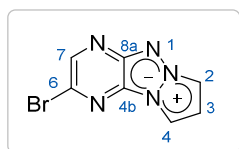
agitation, une solution de  $\text{NaNO}_2$  (280mg, 4.1mmol, 1.3éq.) dans l'eau (1.8 mL) est ajoutée goutte-à-goutte. Après 30 min d'agitation à 0°C, les solvants volatiles sont éliminés par évaporation. Le brut réactionnel est repris à l'eau et est extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  puis concentré sous pression réduite. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane/AcOEt 80/20 ; dépôt solide). Le produit **(105)** est obtenu avec un rendement de 76% sous la forme d'un solide cristallin orange.

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.32 (s, 1H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  148.50, 143.51, 131.85

HRMS (ESI) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_4\text{H}_2\text{BrN}_5$  233.9176, mesuré 233.9172

### 2-azido-5-bromo-3-(1H-pyrazol-1-yl)pyrazine (107)



$\text{C}_7\text{H}_4\text{BrN}_5$   
MM: 238,04g.mol $^{-1}$

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale C* à partir de la 2-azido-5-bromo-3-chloropyrazine **(105)**, de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  et de 1H-pyrazole (1.9mmol) dans l'acétonitrile anhydre(8.5mL). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 12h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est repris dans le 1,2-dichlorobenzène (8.5mL) et est chauffé 40min à 165°C. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (3 paliers : éther de pétrole 100%, dichlorométhane/acétate d'éthyle 95/5 puis 90/10). Le produit **(107)** est obtenu avec un rendement de 46% sous forme de paillettes dorées.

### Intermédiaire bicyclique

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.00 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.07 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H), 6.68 (dd,  $J$  = 2.9, 1.6 Hz, 1H)

SM (IC+):  $m/z$  239 ( $\text{M}-\text{N}_2+\text{H}^+$ ), 267 ( $\text{MH}^+$ ).

### (107)

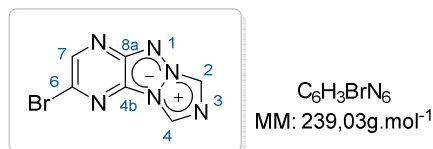
$\text{P}_f$ : 225°C

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.51 (s, 1H), 8.07 (dd,  $J = 3.3, 0.5$  Hz, 1H), 7.85 (dd,  $J = 2.7, 0.5$  Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J = 3.4, 2.6$  Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  150.89 ( $\text{C}_q$ ), 144.90, 127.97 ( $\text{C}_q$ ), 122.41 ( $\text{C}_q$ ), 110.52, 110.14, 109.37

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_7\text{H}_5\text{BrN}_5$  237.9723, mesuré 237.9720

**2-bromo-[1,2,4]triazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (xx) (115)**



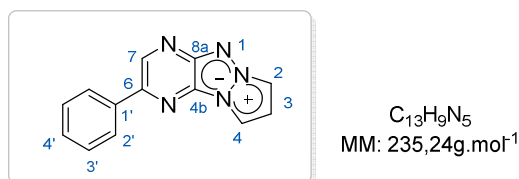
Ce composé est préparé selon la Procédure générale C à partir du 2-azido-5-bromo-3-chloropyrazine (**105**), du  $\text{K}_2\text{CO}_3$  et de 1,2,4-triazole (144mg, 0.6mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile anhydre (3mL). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 16h. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (4 paliers : éther de pétrole 100%, dichlorométhane/méthanol 99/1, 98/2 puis 97/3). Le produit (**115**) est obtenu avec un rendement de 15% (17mg) sous la forme d'un solide doré.

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.78 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.47 (s, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  aucun signal n'est présent (la quantité obtenue est insuffisante pour avoir des signaux définis)

**SM (IC+)** :  $m/z$  240 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

**2-(phényl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (116)**



Ce composé est préparé selon la Procédure générale C dans un ballon, en utilisant l'acide phénylboronique (11mg, 0.09mmol, 1.5éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/ $\text{H}_2\text{O}$  (3.5mL/1.5mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant 1h30. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 7/3, 6/4 puis 5/5 ; dépôt solide). Après une précipitation dans un mélange chloroforme/pentane, le produit désiré (**116**) est obtenu avec un rendement de quantitatif sous la forme d'une poudre jaune.

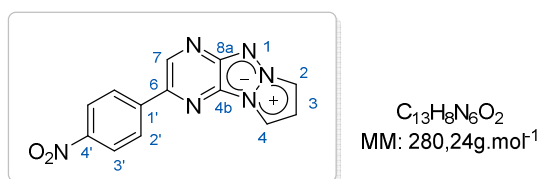
$P_f$ : 206°C

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.95 (s, 1H), 8.13 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 8.01 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.85 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.51 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.41 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 6.94 (t,  $J = 3.0$  Hz, 1H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  151.42, 149.39, 141.13, 139.44, 136.93, 129.04, 128.40, 126.14, 110.18, 109.68, 109.10

SM (IC+) :  $m/z$  236 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )

**2-(4-nitrophenyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (117)**



Ce composé est préparé selon la Procédure générale C dans un ballon sec et sous argon, en utilisant l'acide 4-nitrophénylboronique (275mg, 1mmol, 1.5éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/ $\text{H}_2\text{O}$ . Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant 6h. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol 99/1, 98/2 puis 97/3 ; dépôt solide). Le produit désiré **(117)** est obtenu avec un rendement de 79% sous la forme d'une poudre rouge.

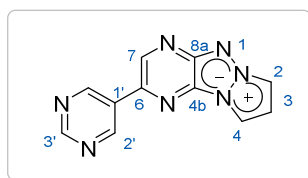
$P_f > 260^\circ\text{C}$

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.2 (s, 1H), 8.8 (m, 1H), 8.5 (m, 1H), 8.36 (qd,  $J = 9.1, 2.3$  Hz, 4H), 7.23 (t,  $J = 3.0$  Hz, 1H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152.4, 146.9, 143.5, 141.8, 134.2, 129.8, 126.4, 124.7, 114.1, 112.5, 111.2

SM (IC+) :  $m/z$  281 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

**2-(pyrimidin-5-yl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (118)**



$C_{11}H_7N_7$   
MM: 237,22g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale C dans un ballon sec et sous argon, en utilisant l'acide pyrimidine-5-boronique (39mg, 0.32mmol, 1.5éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (5mL/2mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant 4h. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 8/2 ; dépôt solide). Le produit désiré (**118**) est obtenu avec un rendement quantitatif (53mg) sous la forme d'une poudre orange.

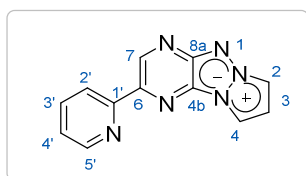
$P_f$ : 250°C (décomposition)

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 9.36 (s, 2H), 9.23 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.19 (dd,  $J = 3.4, 0.5$  Hz, 1H), 7.92 (dd,  $J = 2.7, 0.5$  Hz, 1H), 7.00 (dd,  $J = 3.4, 2.7$  Hz, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 157.79, 153.89, 140.66, 132.94, 130.59, 111.40, 110.37, 110.14

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>7</sub> 238.0836, mesuré 238.0837

**2-(pyridin-2-yl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (119)**



$C_{12}H_8N_6$   
MM: 236,2327g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale E en utilisant la 2-(tributylstannyl)pyridine (1mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant 30h. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/MeOH 100/0, 99/1, 98/2 puis 97/3 ; dépôt solide). Le produit (**119**) est obtenu avec un rendement de 87% sous la forme d'une poudre orange.

$P_f$ : 210°C (dégradation)

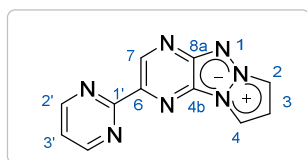
**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 9.51 (t, 1H), 8.65 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 8.11 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.84 (m, 1H), 7.77 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.23 (t, 1H), 6.91 (t, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 154.8, 152.4, 149.5, 142.7, 137.7, 137.0, 128.4, 122.8, 120.0, 110.7, 109.7



**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{12}H_9N_6$  237.0883, mesuré 237.0883

**2-(pyrimidin-2-yl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (121)**



$C_{11}H_7N_7$   
MM: 237,2207g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale E* en utilisant la 2-(tributylstannyl)-pyrimidine (0.2mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant 24h. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/AcOEt /MeOH 85/10/5 ; dépôt solide). Le produit désiré (**121**) est obtenu avec un rendement de 60% sous la forme d'une poudre orange.

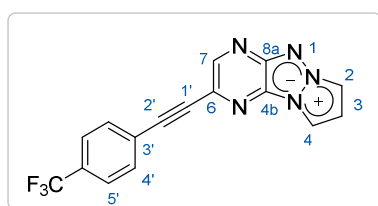
**P<sub>f</sub>: 230°C (dégradation)**

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 9.71 (s, 1H), 8.87 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 8.31 (d, *J* = 3.4 Hz 1H); 7.88 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.23 (t, 1H), 6.92 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 162.8, 157.7 (2C), 153.0, 145.4, 135.7, 129.2, 119.4, 112.4, 110.7, 109.8

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{11}H_8N_7$  238.0847, mesuré 238.0833

**2-((4-(trifluoromethyl)phenyl)ethynyl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (122)**



$C_{16}H_6F_3N_5$   
MM: 327,26g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale F* à partir du 4-trifluorophénylacétylène (0.12mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Après extraction à l'acétate d'éthyle et concentration, le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/AcOEt70/30; dépôt solide dans le dichlorométhane). Le produit désiré (**122**) est obtenu avec un rendement quantitatif (19.6mg) sous la forme d'une poudre jaune.

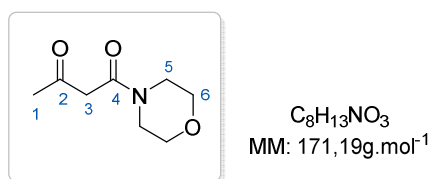
$P_f$ : 246°C

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.69 (s, 1H), 8.14 (d,  $J$  = 3.4 Hz, 1H), 7.89 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 7.72 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 7.64 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 6.97 (t,  $J$  = 3.0 Hz, 1H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  151.20, 147.49, 132.03, 125.54, 123.53, 111.42, 110.44, 110.08, 89.72, 89.07

HRMS (ESI) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_5$  328.0804, mesuré 328.0804

**1-morpholinobutane-1,3-dione(126)**



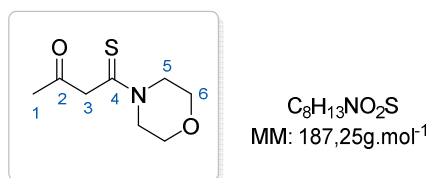
La 4-DMAP (95mg, 0.78mmol, 0.1éq.) et la morpholine (2.4mL, 15.5mL, 2éq.) sont ajoutés à une solution d'éthyle acétoacétate (1 mL, 7.8 mmol, 1 éq.) dans le toluène anhydre (80 mL). Le mélange réactionnel est placé sous agitation à reflux pendant la nuit (environ 18h). Après retour à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1, 7/3, 5/5 puis 3/7 ; dépôt solide). Le produit désiré (**126**) est obtenu avec un rendement de 95% sous la forme d'un solide cristallin jaune pâle.

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.70 – 3.61 (m, 6H), 3.56 (s, 2H), 3.48 – 3.34 (m, 2H), 2.28 (s, 3H)

Numéro CAS : 16695-54-8

Référence bibliographiques : *Eur. J. Org. Chem.* **2013**,19, 4131-4145.

**4-morpholino-4-thioxobutan-2-one (127)**



Le réactif de Lawesson (122 mg, 0.29 mmol, 0.5 éq.) est introduit dans un tube scellé, contenant une solution de 1-morpholinobutane-1,3-dione (100mg, 0.58mmol, 1éq.) dans le toluène

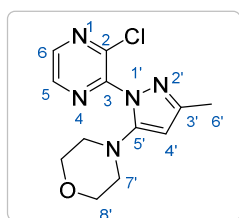
anhydre (5 mL). La suspension obtenue est chauffée au micro-ondes à 140°C pendant 5min. Après retour à température, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/AcOEt 7/3, 5/5 ; dépôt solide). Le produit désiré (**127**) est obtenu avec un rendement de 79% sous la forme d'un solide cristallin marron.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 4.33 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 4.20 (s, 2H), 3.83 – 3.63 (m, 8H), 2.31 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H)

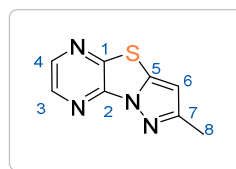
**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 201.57, 192.96, 66.41, 66.36, 58.79, 51.29, 49.99, 30.26

**HRMS (ESI) :** [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>S 188.0740, mesuré 188.0740

**4-(1-(3-chloropyrazin-2-yl)-3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)morpholine (**125**) et 7-methylpyrazolo[5',1':2,3]thiazolo[4,5-b]pyrazine (**128**)**



C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>O  
MM: 279,72g.mol<sup>-1</sup>



C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>S  
MM: 190,22g.mol<sup>-1</sup>

La pyridine (4.5 éq.) est introduite dans un tube scellé, sec et placé sous argon, contenant la 4-morpholino-4-thioxobutan-2-one (50mg, 0.27mmol, 1éq.) et la (3-chloropyrazin-2-yl)hydrazine (**12**) (48mg, 0.32mmol, 1.2éq.) dans le toluène (2.4 mL). La suspension obtenue est chauffée au micro-ondes à 140°C pendant 45min. Après retour à température ambiante, le mélange brut est repris au toluène (20mL) et est lavé avec une solution de d'acide chlorhydrique (0,5 mol.L<sup>-1</sup>). La phase aqueuse est lavée avec une solution saturée en chlorure de sodium, séchée sur MgSO<sub>4</sub> et concentrée à sec. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane/AcOEt 6/4 puis 5/5 ; dépôt solide). Le produit désiré (**125**) est obtenu avec un rendement de 59% (45mg) sous forme d'une huile marron claire qui se solidifie à température ambiante. Le composé tricyclique (**128**) est isolé avec un rendement de 22% (11mg) sous forme d'un solide marron.

### 125

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.51 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.77 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H), 3.60 (dd, *J* = 4.3, 2.5 Hz, 4H), 2.92 – 2.80 (dd, *J* = 4.3, 2.5 Hz, 4H), 2.30 (d, *J* = 0.4 Hz, 3H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 154.19 (C<sub>5'</sub>), 151.97 (C<sub>3'</sub>), 147.34 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub>), 146.65 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub>), 143.78 (C<sub>5</sub> ou C<sub>6</sub>), 141.72 (C<sub>5</sub> ou C<sub>6</sub>), 95.07 (C<sub>4'</sub>), 66.57 (C<sub>7</sub> ou C<sub>8</sub>), 52.17 (C<sub>7</sub> ou C<sub>8</sub>), 14.44 (C<sub>6'</sub>)

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{12}H_{15}ClN_5O$  280.0960, mesuré 280.0960

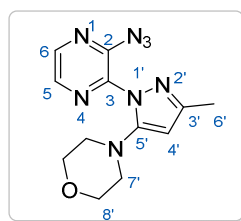
## 128

**RMN ( $^1H$ , 250 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  8.40 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H,  $H_3$  ou  $H_4$ ), 8.38 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H,  $H_3$  ou  $H_4$ ), 6.38 (d,  $J = 0.4$  Hz, 1H,  $H_6$ ), 2.52 (d,  $J = 0.4$  Hz, 3H,  $H_8$ )

**RMN ( $^{13}C$ , 101 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  157.15 ( $C_7$ ), 141.17 ( $C_1$  ou  $C_2$ ), 139.64 ( $C_3$  ou  $C_4$ ), 139.46 ( $C_3$  ou  $C_4$ ), 137.74 ( $C_5$ ), 100.52 ( $C_6$ ), 14.81 ( $C_8$ )

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_8H_7N_4S$  191.0386, mesuré 191.0387

### 4-(1-(3-azidopyrazin-2-yl)-3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)morpholine (124)



$C_{12}H_{14}N_8O$   
MM: 286,29g.mol<sup>-1</sup>

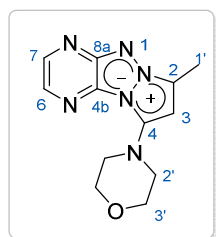
Le  $NaN_3$  (70mg, 1.1mmol, 2éq.) est ajouté à une solution de **(125)** (150 mg, 0.54 mmol, 1 éq.) dans le DMF (5 mL). La solution est chauffée à 100°C pendant 9h. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré et est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/AcOEt9/1 ; dépôt solide). Le produit désiré **(124)** est obtenu avec un rendement de 27% sous la forme de cristaux jaunes.

**RMN ( $^1H$ , 400 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  8.64 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 8.11 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 5.89 (s, 1H), 3.79 (dd,  $J = 5.6, 3.7$  Hz, 4H), 3.11 (dd,  $J = 5.6, 3.7$  Hz, 4H), 2.41 (s, 3H)

**RMN ( $^{13}C$ , 101 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  155.43, 154.33, 143.54, 130.98, 116.07, 97.66, 66.33, 52.54, 14.68.

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{12}H_{15}N_8O$  287.1363, mesuré 287.1363

### 7-methyl-9-morpholinopyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (xx)



$C_{12}H_{14}N_6O$   
MM: 258,27g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale B* à partir du composé **(124)** (0.9mmol) dans le 1,2-dichlorobenzène (2,5mL). Le temps de réaction est de 2h. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (3 paliers: éther de pétrole 100%, cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4, puis dichlorométhane/acétate d'éthyle 9/1). Le produit **(123)** est obtenu avec un rendement de 85% sous la forme d'une poudre orange.

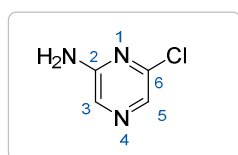
$P_f$ : 200°C

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.16 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H), 7.59 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H), 5.89 (s, 1H), 4.06 – 3.93 (m, 4H), 3.51 – 3.34 (m, 4H), 2.59 (s, 3H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 141.47, 139.04, 132.20, 127.11, 120.60, 100.09, 93.20, 66.28, 49.74, 10.78

**HRMS (ESI)** :  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{12}H_{15}N_6O$  259.1302, mesuré 259.1302

### 6-chloropyrazin-2-amine (**130**)



$C_4H_4ClN_3$   
MM: 129,54g.mol<sup>-1</sup>

Une suspension de 2,6-dichloropyrazine (3g, 20.14mmol, 1éq.) dans l'ammoniaque aqueux à 28% (10mL), placée dans un tube scellé, est laissée sous agitation à 110°C pendant 9h. Après un refroidissement partiel le milieu réactionnel est versé dans un bécher contenant de la glace (10g). Le précipité formé est récupéré par filtration sur fritté et est rincé avec de l'eau froide. Après séchage à l'étuve, le composé **(130)** est obtenu avec un rendement de 74% (1.94g) sous la forme de cristaux rose pâle.

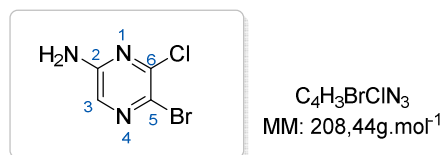
**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO)** δ 7.80 (d,  $J$  = 0.5 Hz, 1H), 7.70 (d,  $J$  = 0.5 Hz, 1H), 6.90 (s, 2H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, DMSO)** δ 155.74 (C<sub>6</sub>), 145.78 (C<sub>2</sub>), 130.42 (C<sub>3</sub>), 128.52 (C<sub>6</sub>)

**HRMS (ESI)** :  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_4H_5ClN_3$  130.0167, mesuré 130.0166

Numéro CAS : 33332-28-4

Référence bibliographique : WO2013068755.

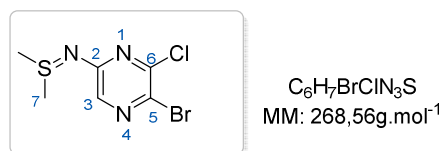
**5-bromo-6-chloropyrazin-2-amine(131)**

La 6-chloropyrazin-2-amine (**130**) (1.7 g, 13.18 mmol, 1 éq.) et le méthanol (45mL) sont introduits dans un tricol sec et sous atmosphère d'argon. Le *N*-bromosuccinimide (2.60g, 14.6mmol, 1.1éq.) est ensuite ajouté par petites portions. Après 4h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré et le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2) pour donner le composé (**131**) avec un rendement de 78% (2.2g) sous la forme de cristaux blancs.

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, MeOD) δ 7.63 (s, 1H)

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, MeOD) δ 156.33 (C<sub>6</sub>), 147.53 (C<sub>2</sub>), 130.98 (C<sub>3</sub>), 122.26 (C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>)

HRMS (ESI) : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>BrClN<sub>3</sub> 207.9272, mesuré 207.9273

***S,S*-dimethyl-*N*-(5-bromo-6-chloropyrazin-2-yl)sulfilimine (132)**

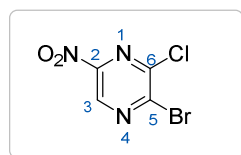
Dans un bicol sec et placé sous argon contenant un mélange de dichlorométhane anhydre (3.3mL) et de DMSO (512μL, 7.2mmol, 1éq.) et refroidi à -78°C est introduit l'anhydride triflique (1.47mL, 6.72mmol, 1.4éq.). Après 30min d'agitation à cette température la 5-bromo-6-chloropyrazin-2-amine (**131**) (1g, 4.8mmol, 1éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 6h avec retour à température ambiante. Le mélange réactionnel est repris dans le dichlorométhane (50mL) puis est lavé avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>. La phase aqueuse est ensuite extraite deux fois au dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution de NaCl puis séchées sur MgSO<sub>4</sub> et concentrées. Le composé (**132**) est obtenu avec un rendement de 89% (1.12g) sous forme d'une poudre jaune.

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.71 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 2.76 (s, 6H, H<sub>7</sub>)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  136.25 ( $\text{C}_3$ ), 33.09 ( $\text{C}_7$ ) (carbones quaternaires non visibles)

HRMS (ESI) :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_6\text{H}_8\text{BrClN}_3\text{S}$  267.9305, mesuré 267.9305

**2-bromo-3-chloro-5-nitropyrazine(134)**



$\text{C}_4\text{HBrClN}_3\text{O}_2$   
MM 238,42g.mol $^{-1}$

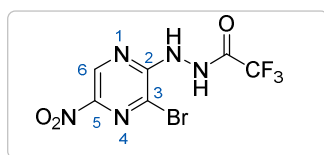
A une solution d'acide *m*-chloroperbenzoïque (255mg, 1.13mmol, 1.5éq.) dans le dichlorométhane anhydre (20mL), placée sous atmosphère d'argon et refroidie à  $-5^\circ\text{C}$ , est ajoutée goutte-à-goutte et sous forte agitation une solution de *S,S*-diméthyl-*N*-(5-bromo-6-chloropyrazin-2-yl)sulfilimine (**132**) (200mg, 0.75mmol, 1éq.) dans le dichlorométhane anhydre (10mL). Le mélange réactionnel est agité à  $0^\circ\text{C}$  pendant 3h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange DCM/AcOEt (9:1) comme éluant et par RMN. Une fois le composé de départ consommé, le diméthylsulfide (0.1mL) est ajouté et le précipité formé est éliminé par filtration. Le filtrat récupéré est placé dans un ballon bicol qui est purgé à l'argon et est refroidie à  $0^\circ\text{C}$ . Le milieu réactionnel est ensuite saturé en ozone jusqu'au changement de couleur (de orange à vert foncé). Après un dégazage à l'argon, le mélange réactionnel est lavé avec une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , à l'eau puis est séché sur  $\text{MgSO}_4$  et concentré à sec. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/AcOEt9/1 ; dépôt solide). Le produit (**134**) est obtenu avec un rendement de 25% (45.2mg) sous forme d'une huile jaune.

RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.18 (s, 1H)

RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  149.12 ( $\text{C}_q$ ), 146.37 ( $\text{C}_q$ ), 136.89 ( $\text{C}_3$ )

HRMS (ESI) : Aucun signal n'est observé et ce à diverses concentrations, en ionisations négative et positive.

***N'*-(3-bromo-5-nitropyrazin-2-yl)-2,2,2-trifluoroacetohydrazide (112)**



$\text{C}_6\text{H}_3\text{BrF}_3\text{N}_5\text{O}_3$   
MM: 330,01g.mol $^{-1}$

Sous atmosphère d'argon, le *N'*-(3-chloropyrazin-2-yl)-2,2,2-trifluoroacetohydrazide(**111**) (200mg, 0.83mmol, 1éq) est ajouté par petites portions à une solution de tétrafluoroborate de nitronium dans le sulfolane (0.3-0.5M, 4.2mL) placée à  $0^\circ\text{C}$ . Le suivi est réalisé par CCM en utilisant

un mélange DCM/MeOH (97:3) comme éluant. Après 2h d'agitation à 0°C et 3h à température ambiante le milieu réactionnel est hydrolysé par l'ajout goutte-à-goutte d'une solution de NaOH (1N, 2mL). L'agitation est maintenue 1h supplémentaire à température ambiante (changement de couleur d'orange vers rouge-marron). La phase aqueuse est ensuite extraite à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée deux fois avec une solution saturée de chlorure de sodium puis est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et est concentrée. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM 100% pour éliminer les traces de sulfolane, puis AcOEt 100% pour faire migrer le produit). Le produit (**112**) est obtenu avec un rendement de 27% (66mg) sous forme d'un solide orange.

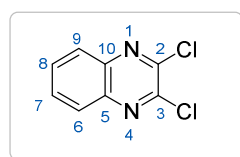
RMN (<sup>1</sup>H, 400MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 8.81 (s, 1H)

RMN (<sup>13</sup>C, 101MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 150.25 (C<sub>q</sub>), 141.44 (C<sub>6</sub>), 140.46 (C<sub>5</sub>), 132.16 (C<sub>q</sub>)

RMN (<sup>19</sup>F, 235 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ -75.15

HRMS (ESI) : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> 328.9371, mesuré 328.9371

### 2,3-dichloroquinoxaline (141)



C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>  
MM: 199,03g.mol<sup>-1</sup>

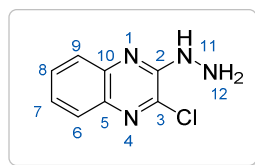
Le *N,N*-diméthylformamide (50μL, 0.62mmol, 0.05éq.) est ajouté à une suspension de quinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (2g, 12.3mmol, 1éq.) et de chlorure de thionyle (2.25mL, 31mmol, 2.5éq) dans 1,2-dichloroéthane (20mL). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant 2h. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole (8/2) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec. Le résidu brut obtenu est recristallisé dans un mélange acétonitrile/eau (9/1). Le mélange est refroidi à 0°C et est laissé à cette température pendant 30min. Les cristaux formés sont récupérés par filtration et sont lavés à l'eau froide. Le produit attendu (**141**) est obtenu sous la forme d'un solide cristallin jaune pâle avec un rendement de 87% (2.1g).

RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.15 – 8.02 (m, 2H), 8.00 – 7.89 (m, 2H)

Numéro CAS : 2213-63-0

Référence bibliographique : *J. Het. Chem.*, **2009**, 46, 317.



**2-chloro-3-hydrazinylquinoxaline (xx)**

$C_8H_7ClN_4$   
MM: 194,62g.mol<sup>-1</sup>

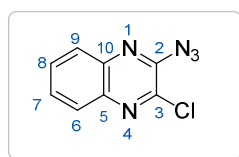
L'hydrazine monohydrate (0.25mL, 5.3mmol, 2.1éq.) est introduite goutte-à-goutte dans un ballon contenant une solution de 2,3-dichloroquinoxaline (**141**) (500mg, 2.5mmol, 1éq.) dans l'éthanol (15 mL). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation au reflux du solvant pendant 4h. Après retour à température ambiante, le précipité formé est récupéré par filtration, lavé avec de l'éthanol froid et séché sous pression réduite. Le composé brut est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dépôt solide, AcOEt/éther de Pétrôle 5/5). Le produit attendu (**142**) est obtenu sous la forme d'une poudre orange avec un rendement de 38% (186mg) qui est engagé dans l'étape suivante sans purification sur gel de silice.

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, MeOD)**  $\delta$  7.77 – 7.67 (m, 1H), 7.58 (ddd,  $J = 8.2, 7.0, 1.5$  Hz, 1H), 7.39 (ddd,  $J = 8.4, 7.0, 1.4$  Hz, 1H).

**SM(IC+)** :  $m/z$  165 ( $M+H^+-N_2H_3$ )

**Numéro CAS** : 51347-93-4

**Référence bibliographique** : *Chem. & Biol. Interface*, **2011**, 2, 228-241.

**2-azido-3-chloroquinoxaline**

$C_8H_4ClN_5$   
MM: 205,60g.mol<sup>-1</sup>

De l'acide chlorhydrique (37%, 0.26 mL) est ajouté lentement à une suspension de 2-chloro-3-hydrazinylquinoxaline (**142**) (139mg, 0.72mmol, 1éq.) dans l'eau distillée (0.6mL). La solution obtenue est refroidie à 0°C, puis une solution de nitrite de sodium (730mg, 10.6mmol, 2.6éq.) dans l'eau distillée (0.6 mL) est ajoutée goutte-à-goutte. Après 35min d'agitation à 0°C et retour à température ambiante, le milieu réactionnel est repris à l'eau et est extrait trois fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de bicarbonate de sodium et une solution saturée en NaCl, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées à sec. Le composé brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dépôt solide, AcOEt/éther de pétrole 2/8). Le produit (**143**) est obtenu sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement de 77% (115mg).

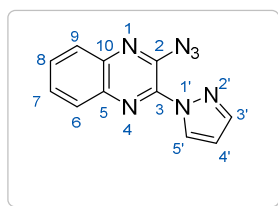
**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.63 (dd,  $J$  = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 8.24 (dd,  $J$  = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 7.95 (td,  $J$  = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.89 (td,  $J$  = 7.8, 1.5 Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  142.28, 140.46, 136.16, 131.84, 130.63, 130.02, 124.79, 116.71

**Numéro CAS :** 1286712-34-2

**Référence bibliographique :** *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133(14), 5413-5424

**2-azido-3-(1H-pyrazol-1-yl)quinoxaline (144)**



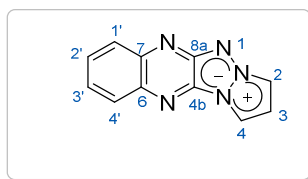
$\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_7$   
MM: 237,22g.mol $^{-1}$

Le pyrazole (23mg, 0.34mmol, 1.1éq.), le carbonate de césium (196mg, 0.6mmol, 2éq.), et le dichlorométhane anhydre (5mL) sont introduits dans un ballon placé sous atmosphère d'argon. A cette suspension est ajoutée goutte-à-goutte une solution de 2-azido-3-chloroquinoxaline (**143**) (64mg, 0.3mmol, 1éq) dans le dichlorométhane anhydre (3mL). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 5min et 6h à reflux du solvant. Le suivi est réalisé par CCM en utilisant un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole (7/3) comme éluant. Après retour à température ambiante, le milieu est repris à l'eau et est extrait trois fois au dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées et concentrées à sec. Le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle 7/3 ; dépôt solide). Le produit attendu (**144**) est obtenu avec un rendement de 85% (61mg) sous forme d'une poudre jaune.

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  9.30 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 8.72 – 8.59 (m, 1H), 8.31 (dd,  $J$  = 6.4, 3.1 Hz, 1H), 8.08 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 7.86 (dd,  $J$  = 6.2, 3.4 Hz, 2H), 6.72 (dd,  $J$  = 2.7, 1.6 Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  145.63, 139.02, 138.30, 135.49, 131.69, 130.62, 130.43, 129.90, 124.37, 116.55, 110.43

**SM (IC $^+$ ) :**  $m/z$  210 ( $\text{M}+\text{H}^+-\text{N}_2$ ), 238 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 260 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ), 497 ( $2\text{M}+\text{Na}^+$ ).

**Pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]quinoxalin-4-ium-5-ide (145)**

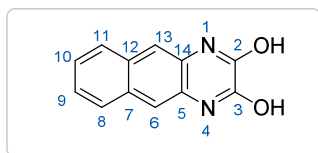
$C_{11}H_7N_5$   
MM: 209,20g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale B* à partir d'une solution de **(144)** (56mg, 0.23mmol, 1éq.) dans le 1,2-dichlorobenzène (2mL). Le milieu réactionnel est chauffé à 165°C pendant 29h. Le solvant est éliminé par distillation sous vide. Après retour à température ambiante, le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol 10/0, 98/2 puis 95/5 ; dépôt solide). Le produit **(145)** est obtenu avec un rendement de 53% (26mg) sous forme d'une poudre marron foncé.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.24 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.7 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.53 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.95 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 152.66, 143.53, 135.23, 132.08, 129.62, 128.41, 127.91, 125.43, 113.51, 112.18, 110.18

**SM (IC<sup>+</sup>)** : *m/z* 210(M+H<sup>+</sup>).

**benzo[g]quinoxaline-2,3-diol (146)**

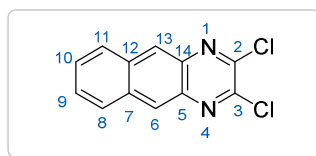
$C_{12}H_8N_2O_2$   
MM: 212,20g.mol<sup>-1</sup>

Dans le diéthyl oxalate (10 mL) pur est ajouté le naphthalène-2,3-diamine (500mg, 3,16mmol, 1éq). Le mélange réactionnel est chauffé à 110°C pendant une nuit. Après retour à température ambiante, de l'éthanol est ajouté au mélange. Le précipité obtenu est récupéré par filtration sur Büchner et lavé à l'éthanol pour donner le composé **(146)** avec un rendement de 81% (545mg) sous forme d'un solide ocre.

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, DMSO)** δ 12.08 (s, 2H), 7.85 – 7.78 (m, 2H), 7.54 (s, 2H), 7.42 – 7.35 (m, 2H).

**Numéro CAS** : 186666-52-4

**Référence bibliographique** : *J. Org. Chem.*, **2013**, 78(3), 1249-1253.

**2,3-dichlorobenzo[g]quinoxaline (147)**

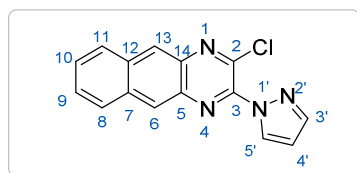
$C_{12}H_6Cl_2N_2$   
MM: 249,09g.mol<sup>-1</sup>

Dans un ballon, le benzo[g]quinoxaline-2,3-diol (**146**) (677mg, 3,19mmol, 1éq.) est dissout dans le trichlorure de phosphore (20mL). La solution obtenue est portée à reflux pendant une nuit. Après retour à température ambiante, le mélange est concentré sous pression réduite et le résidu brut dissout dans du dichlorométhane et lavé avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, puis avec une solution saturée de NaCl. Après séchage sur MgSO<sub>4</sub>, filtration et concentration sous vide, le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/dichlorométhane 5/5; dépôt solide). Le produit (**147**) est obtenu avec un rendement de 29% (229mg) sous la forme d'un solide ocre.

RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.57 (s, 2H, H<sub>6</sub> et H<sub>13</sub>), 8.11 (m, 2H), 7.64 (m, 2H).

Numéro CAS : 19107-83-2

Référence bibliographique : *J. Org. Chem.*, **2013**, 78(3), 1249-1253.

**3-chloro-2-pyrazol-1-yl-benzo[g]quinoxaline (148)**

$C_{15}H_9ClN_4$   
MM: 280,71g.mol<sup>-1</sup>

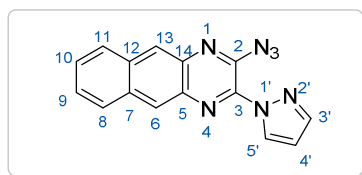
Ce composé est préparé selon la Procédure générale A à partir de la 2,3-dichlorobenzo[g]quinoxaline (**147**) (118mg, 0.47mmol, 1éq.) et du pyrazole (42mg, 0.62 mmol, 1.3éq.). La suspension obtenue est portée à reflux au micro-ondes (système ouvert) pendant 2h et est ensuite extrait avec de l'acétate d'éthyle. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle) pour donner le produit désiré (**148**) avec un rendement de 52% (69mg).

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.66 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.41 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.12 (ddd, *J* = 9.3, 6.0, 2.9 Hz, 2H), 7.94 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.64 (dd, *J* = 6.5, 3.2 Hz, 2H), 6.61 (dd, *J* = 2.7, 1.7 Hz, 1H)

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 143.13, 142.58, 141.18, 137.37, 135.71, 134.51, 134.35, 131.27, 128.65, 128.54, 127.66, 127.40, 126.76, 108.38

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{15}H_{10}ClN_4$  281.0588, mesuré 281.0584

**2-azido-3-pyrazol-1-yl-benzo[g]quinoxaline (149)**



$C_{15}H_9N_7$   
MM: 287,27g.mol<sup>-1</sup>

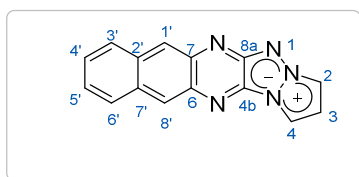
Aune solution de 3-chloro-2-pyrazol-1-yl-benzo[g]quinoxaline (**148**) (65mg, 0.23mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile (5mL) est ajouté l'azoture de sodium (75mg, 1.16mmol, 5éq.). Le mélange est chauffé à reflux une nuit. Après refroidissement, le mélange réactionnel est extrait à l'acétate d'éthyle et lavé avec une solution saturée de NaCl. Après séchage sur  $MgSO_4$ , filtration et concentration sous vide, le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle) pour obtenir le composé (**149**) avec un rendement de 38% (25mg).

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  9.31 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 9.05 (s, 2H), 8.79 (s, 2H), 8.21 – 8.06 (m, 6H), 7.80 – 7.64 (m, 4H), 6.72 (ddd,  $J = 2.8, 1.6, 0.4$  Hz, 2H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  145.43, 138.54, 138.44, 133.50, 132.79, 132.69, 131.47, 129.13, 128.87, 128.85, 128.19, 127.95, 122.41, 114.53, 110.24

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{15}H_{10}N_7$  288.0992, mesuré 288.0997.

**Benzo[g]pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]quinoxalin-4-ium-5-ide (150)**



$C_{15}H_9N_5$   
MM: 259,26g.mol<sup>-1</sup>

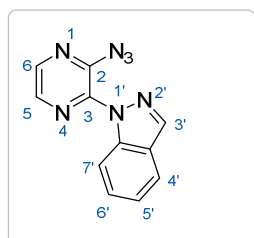
Ce composé est préparé selon la *Procédure générale B* à partir du 2-azido-3-pyrazol-1-yl-benzo[g]quinoxaline (**149**) (0.087mmol) dans le 1,2-dichlorobenzène. Le mélange est maintenu sous agitation à 180°C pendant 24h. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole 100%, dichlorométhane/acétate d'éthyle 8/2 ; dépôt liquide). Le produit (**150**) est obtenu avec un rendement de 75% (17mg) sous forme d'une poudre rouge.

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.96 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 8.64 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.14 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.09 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.54 (ddd,  $J = 8.2, 6.5, 1.2$  Hz, 1H), 7.51 – 7.45 (m, 1H), 7.21 (dd,  $J = 3.6, 2.5$  Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  153.15, 140.09, 135.10, 133.25, 133.13, 129.79, 127.89, 127.14, 126.17, 125.89, 124.37, 122.60, 117.85, 115.79, 110.99, 40.15, 39.94, 39.73, 39.52, 39.31, 39.10, 38.89

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_5$  260.0930, mesuré 260.0925

**1-(3-azidopyrazin-2-yl)-1H-indazole (151)**



$\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_7$   
MM: 237,22g.mol $^{-1}$

Ce composé est préparé selon la Procédure générale A à partir du 1H-indazole (526mg, 4.5mmol, 1éq.), de la 2-azido-3-chloropyrazine (**16**) (700mg, 4.5mmol, 1éq.) et du  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.24g, 9mmol, 2éq.). Le temps de réaction est de 6h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré sur Milli-Pore. Le solide récupéré est repris dans un mélange eau/acétone (7/3 : v/v). Après 5-10min d'agitation le précipité formé est récupéré par filtration sur Milli-Pore. Le produit désiré (**151**) est obtenu avec un rendement de 80% (855mg) sous forme d'une poudre jaune pâle.

**IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )** : 3090, 2991, 2225, 1741, 1608, 1521, 1480.

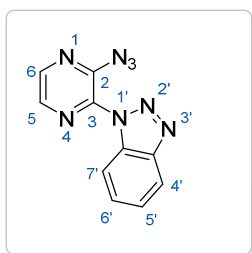
**P<sub>f</sub>** : 260°C

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz, DMSO)**  $\delta$  9.28 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.75 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 8.33 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 8.03 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.71 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.49 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz, DMSO)**  $\delta$  131.24, 129.03, 121.83, 118.19, 118.17, 116.70, 115.17

**SM (IC $^+$ )** :  $m/z$  210( $\text{M}+\text{H}^+-\text{N}_2$ ), 238 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 260 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ).

**1-(3-azidopyrazin-2-yl)-1H-benzo[d][1,2,3]triazole (152)**



$C_{10}H_6N_8$   
MM: 238,20g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale A à partir du 1H-benzotriazole (230mg, 1.92mmol, 1.2éq.), de la 2-azido-3-chloropyrazine (**16**) (300mg, 1.93mmol, 1éq.) et de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (530mg, 3.86mmol, 2éq.). Le temps de réaction est de 2h30. Le suivi est réalisé par CCM dans un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole (5/5). Le mélange réactionnel est filtré à chaud (rincé avec de l'acétonitrile chaud). Le filtrat est concentré et le solide obtenu est trituré dans un mélange chloroforme/éther diéthylique (1/1: v/v). Le précipité est récupéré par filtration sur Milli-Pore. Le produit attendu (**152**) est obtenu avec un rendement de 95% (405mg) sous la forme d'une poudre beige.

IR (v, cm<sup>-1</sup>) : 3093, 1921, 1698, 1609, 1524, 1488.

P<sub>f</sub> : 240°C

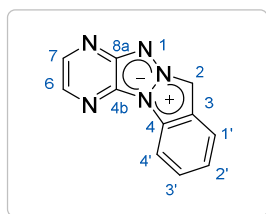
IR (solide) : v (cm<sup>-1</sup>) 3091, 1522, 1481

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO) δ 9.51 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 8.57 (dt, J = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 8.49 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 8.35 (dt, J = 8.3, 1.0 Hz, 1H), 7.85 (ddd, J = 8.3, 7.1, 1.1 Hz, 1H), 7.68 (ddd, J = 8.2, 7.1, 1.1 Hz, 1H)

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, DMSO) δ 145.59, 141.86, 139.81, 131.29, 130.25, 126.45, 120.10, 118.90, 114.50

SM (IC<sup>+</sup>) : m/z 211 (M+H<sup>+</sup>-N<sub>2</sub>), 239 (M+H<sup>+</sup>), 261 (M+Na<sup>+</sup>).

***Pyrazino[2',3':4,5][1,2,3]triazolo[1,2-a]indazol-6-ium-5-ide (154)***



$C_{11}H_7N_5$   
MM: 209,20g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale B à partir du composé (**151**) (500mg, 2.11mmol, 1éq.) dans le 1,2-dichlorobenzène (35mL). Le temps de réaction est de 1h. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice

(3 paliers : éther de pétrole 100%, dichlorométhane/acétate d'éthyle 10/0, 9/1 puis 8/2 ; dépôt solide). Le produit **(154)** est obtenu avec un rendement quantitatif (450mg) sous la forme d'une solide orange.

Ce composé a également été préparé par une thermolyse au micro-ondes, dans un tube scellé sous atmosphère d'argon, à partir du composé **(151)** (30mg, 0.12mmol, 1éq.) dans le 1,2-dichlorobenzène (2mL). Le mélange réactionnel est irradié au micro-ondes à 165°C (P=1bar) pendant 5min. Le traitement du composé cyclisé est identique à la méthode ci-dessus.

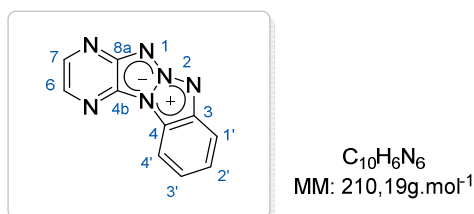
$P_f$ : 210°C

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.39 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 8.31 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.99 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 7.86 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.61 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.54 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  152.98, 141.28, 132.42, 130.84, 125.91, 125.72, 125.52, 123.79, 119.95, 111.26, 102.35

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_5$  210.0774, mesuré 210.0773

***Benzo[4',5']][1,2,3]triazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (155)***



Ce composé est préparé selon la Procédure générale B à partir du composé **(152)** (280mg, 1.49mmol, 1éq.) dans le 1,2-dichlorobenzène (20mL). Le temps de réaction est de 1h45. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (3 paliers : éther de pétrole 100%, dichlorométhane/acétate d'éthyle 10/0 puis 9/1 ; dépôt liquide). Le produit **(155)** est obtenu avec un rendement de 73% (229mg) sous la forme d'une poudre verte fluorescente.

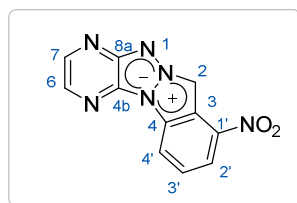
$P_f$ : 221°C

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.74 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 8.42 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 8.30 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 8.06 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.67 (td,  $J$  = 7.4, 1.1 Hz, 2H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  143.60, 143.10, 136.05, 130.77, 127.54, 125.25, 122.42, 117.98, 110.80

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_6$  211.0727, mesuré 211.0726



**8-nitropyrazino[2',3':4,5][1,2,3]triazolo[1,2-a]indazol-6-ium-5-ide (159)**

$C_{11}H_6N_6O_2$   
MM: 254,20g.mol<sup>-1</sup>

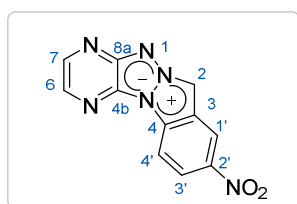
Ce composé est préparé selon la *Procédure générale C* à partir de la 2-azido-3-chloro-pyrazine (**16**) (200mg, 1.2mmol, 1éq.), du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (357mg, 2.6mmol, 2éq.) et du 4-nitroindazole (191mg, 1.2mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile anhydre (11mL). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 3h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est repris dans le 1,2-dichlorobenzène (11mL) et est chauffé 2h30 à 165°C. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (2 paliers : éther de pétrole 100%, dichlorométhane/méthanol 99/1). Le produit (**159**) est obtenu avec un rendement de 88% sous la forme d'une poudre orange.

P<sub>f</sub>: 220-240°C (décomposition)

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO) δ 9.21 (s, 1H), 8.71 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.59 – 8.55 (m, 1H), 8.27 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.80 (t, J = 8.1 Hz, 1H)

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, DMSO) δ 142.0, 132.7, 126.5, 123.59, 122.4, 117.8, 102.3

HRMS (ESI) : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> 255.0625, mesuré 255.0624

**9-nitropyrazino[2',3':4,5][1,2,3]triazolo[1,2-a]indazol-6-ium-5-ide (160)**

$C_{11}H_6N_6O_2$   
MM: 254,20g.mol<sup>-1</sup>

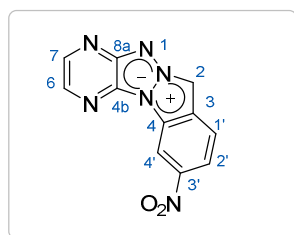
Ce composé est préparé selon la *Procédure générale C* à partir du 2-azido-3-chloro-pyrazine (**16**) (100mg, 0.64mmol, 1éq.), de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (179mg, 1.3mmol, 2éq.) et du 5-nitroindazole (105mg, 0.64mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile anhydre (6mL). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 3h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est repris dans le 1,2-dichlorobenzène (6mL) et est chauffé 1h30 à 165°C. Après refroidissement, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (4 paliers : éther de pétrole 100%, dichlorométhane/méthanol 99/1, 98/2 puis 97/3). Le produit (**160**) est obtenu avec un rendement de 70% sous la forme d'une poudre orange.

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz, DMSO)**  $\delta$  8.83 (d,  $J$  = 1.3 Hz, 1H), 8.51 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H), 8.45 – 8.43 (m, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.12 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz, DMSO)**  $\delta$  142.45, 132.38, 126.94, 123.19, 119.58, 116.35, 111.74, 102.26.

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_6\text{O}_2$  255.0625, mesuré 255.0625

**10-nitropyrazino[2',3':4,5][1,2,3]triazolo[1,2-a]indazol-6-ium-5-ide (161)**



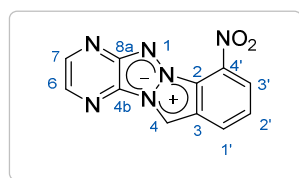
$\text{C}_{11}\text{H}_6\text{N}_6\text{O}_2$   
MM: 254,20g.mol $^{-1}$

Ce composé est préparé selon la Procédure générale C à partir de la 2-azido-3-chloro-pyrazine (**16**) (100mg, 0.64mmol, 1éq.), de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (179mg, 1.3mmol, 2éq.) et du 6-nitroindazole (105mg, 0.64mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile anhydre (6mL). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 22h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est repris dans le 1,2-dichlorobenzène (6mL) et est chauffé 1h à 165°C. Après refroidissement, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (4 paliers : éther de pétrole 100%, dichlorométhane/méthanol 99/1, 98/2 puis 97/3). Le produit (**161**) est obtenu avec un rendement de 92% sous la forme d'une poudre rouge.

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz, DMSO)**  $\delta$  8.98 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.36 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.15 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H)

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_6\text{O}_2$  255.0625, mesuré 255.0625

**7-nitropyrazino[2',3':4,5][1,2,3]triazolo[2,1-a]indazol-6-ium-5-ide (162)**



$\text{C}_{11}\text{H}_6\text{N}_6\text{O}_2$   
MM: 254,20g.mol $^{-1}$

Ce composé est préparé selon la Procédure générale C à partir du 2-azido-3-chloro-pyrazine (**16**) (345mg, 2.22mmol, 1éq.), du  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (617mg, 4.5mmol, 2éq.) et du 7-nitroindazole (370mg, 2.22mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile anhydre (6mL). La suspension obtenue est portée à reflux pendant 18h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est repris dans le 1,2-dichlorobenzène (6mL) et est chauffé 2h à 165°C. Après

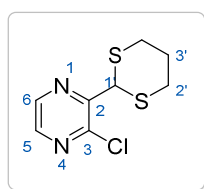
refroidissement, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (4 paliers : éther de pétrole 100%, dichlorométhane/méthanol 99/1, 98/2 puis 96/4). Le produit **(162)** est obtenu avec un rendement de 67% sous la forme d'une poudre rouge foncé.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO)** δ 9.49 (s, 1H), 8.73 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.42 (d, 1H), 8.30 (dd, *J* = 7.5, 0.8 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.62 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, DMSO)** δ 150.7, 145.98, 136.1, 132.22, 127.0, 127.99, 124.92, 123.90, 122.91, 112.0, 104.31

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{11}H_7N_6O_2$  255.0625, mesuré 255.0625

**2-Chloro-3-[1,3]dithian-2-yl-pyrazine (174)**



$C_8H_9ClN_2S_2$   
MM: 232,75g.mol<sup>-1</sup>

Dans un ballon sec et placé sous atmosphère d'argon, le 1,3-dithiane (2.66g, 22.0mmol, 1éq.) est solubilisé dans le THF anhydre (18mL). La solution obtenue est refroidie à -78°C, puis une solution de n-BuLi (9.6mL, 24.0mmol, 1.2éq.) dans l'hexane (2.5M) est ajoutée lentement. Après 30 min d'agitation à -78°C, une solution de 2,6-dichloropyrazine (3.0g, 20.1mmol, 1.1éq.) dans le THF anhydre (12 mL) est ajoutée goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à -78°C pendant 1h. La réaction est stoppée en ajoutant de l'eau, suivie de trois extractions à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et concentrées à sec. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle 10/0 puis 9/1 ; dépôt solide). Le 2-chloro-3-[1,3]dithian-2-yl-pyrazine (**174**) est obtenu avec un rendement de 82% (3.84g) sous la forme d'une poudre jaune clair.

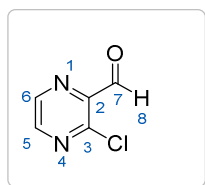
**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.52 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.55 (s, 1H), 3.18 (ddd, *J* = 14.0, 6.6, 2.9 Hz, 2H), 3.00 (ddd, *J* = 13.3, 10.0, 2.5 Hz, 2H), 2.30 – 1.98 (m, 2H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153.20 ( $\text{C}_q$ ), 147.15 ( $\text{C}_q$ ), 143.05 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 142.37 ( $\text{C}_{Ar}$ ), 46.81, 30.07, 25.41**

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_8H_{10}ClN_2S_2$  232.9968, mesuré 232.9968

**Numéro CAS : 874114-28-0**

**Référence bibliographique :** *Tet. Lett.*, **2006**, 47, 31–34.

**3-Chloro-pyrazine-2-carbaldehyde (175)**

$C_5H_3ClN_2O$   
MM: 142,54g.mol<sup>-1</sup>

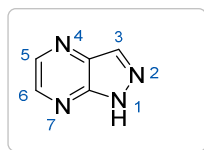
Dans un ballon contenant le 2-chloro-3-[1,3]dithian-2-yl-pyrazine (**174**) (2.1g, 9.05mmol, 1éq.) dans un mélange acétonitrile/eau (135 mL/35mL), sont introduits le carbonate de calcium (2.72g, 27.18mmol, 3éq.) et l'iodure de méthyle (5.6mL, 27.18mmol, 10éq.). La suspension obtenue est laissée sous agitation à 60°C pendant 24h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré sur Milli-Pore; le filtrat est concentré à sec, repris à l'eau et extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de chlorure de sodium saturée, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et concentrées à sec. Le 3-chloro-pyrazine-2-carbaldehyde (**175**) est obtenu avec un rendement quantitatif (1.5g) sous la forme d'une huile rouge. Ce produit est engagé immédiatement dans la réaction suivante (dégradation ou polymérisation lors de sa conservation et lors de la purification sur silice).

RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 10.21 (s, 1H), 8.78 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.61 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H)

RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 190.53, 149.49, 148.38, 145.08, 144.64

Numéro CAS : 121246-96-6

Référence bibliographique : *Tet. Lett.*, **2006**, 47, 31–34.

**1H-Pyrazolo[3,4-b]pyrazine (173)**

$C_5H_4N_4$   
MM: 120,11g.mol<sup>-1</sup>

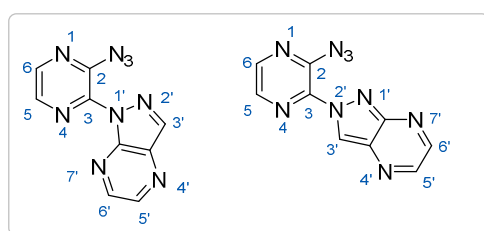
Dans un tube micro-onde comportant une solution du composé (**175**) (150mg, 1.18mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile (1.5mL) est ajoutée l'hydrazine monohydrate (1.5mL). Le tube est scellé et est irradié au micro-ondes à 120°C pendant 30min. Le mélange réactionnel est repris dans 20mL d'eau et 20mL d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> sat. et est extrait à l'acétate d'éthyle (4 fois). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de NaCl, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et concentrées à sec. Le résidu obtenu est relavé avec un mélange AcOEt/pentane puis séché pour donner le composé souhaité (**173**) avec un rendement de 77% (109mg).

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz, Acétone)**  $\delta$  13.11 (se, 1H), 8.61 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 8.54 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz, Acétone)**  $\delta$  143.85, 141.97, 134.86, 134.55

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_4$  121.0509, mesuré 121.0508

**1-(3-azidopyrazin-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyrazine (176- $\text{N}^1$ ) et 2-(3-azidopyrazin-2-yl)-2H-pyrazolo[3,4-b]pyrazine (176- $\text{N}^2$ )**



$\text{C}_9\text{H}_5\text{N}_9$   
MM: 239,19g.mol $^{-1}$

A une solution de 1H-pyrazolo[3,4-b]pyrazine (**173**) (150mg, 1.24mmol, 1éq.) et de la 2-azido-3-chloropyrazine (**16**) (212mg, 1.36mmol, 1.1éq.) dans l'acétonitrile anhydre (7mL) placé sous argon, est ajouté la triéthylamine (350 $\mu\text{L}$ , 2.48mmol, 2éq.). La solution obtenue est laissée sous agitation à température ambiante pendant 18h. Le mélange réactionnel est ensuite concentré à sec pour donner le mélange de deux isomères (**176- $\text{N}^1$** ) et (**176- $\text{N}^2$** ) (inséparables sur gel de silice) Avec des proportions respectives de 23% et 77% déterminées par spectroscopie de RMN du mélange. Le mélange de deux isomères est engagé dans l'étape suivante sans purification.

**176- $\text{N}^1$**

**P<sub>f</sub>** : 242°C (dégradation)

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.87 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.64 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.60 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.27 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  144.51, 142.81, 139.03, 134.12, 100.92

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_9$  240.0740, mesuré 240.0742

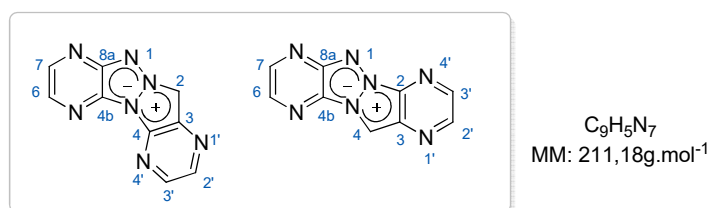
**176- $\text{N}^2$**

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.93 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H), 8.82 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.67 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H), 8.29 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  147.07, 146.88, 141.21, 134.45, 100.14, 99.98

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_9$  240.0740, mesuré 240.0741.

### Composé 172 et composé 177



Ce composé est préparé selon la *Procédure générale B* à partir du mélange des isomères (**176-N<sup>1</sup>**) et (**176-N<sup>2</sup>**) (0.7mmol) dans le 1,2-dichlorobenzène (10mL). Le temps de réaction est de 1h à 140°C. Après retour à température ambiante, le mélange brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel d'Alumine (3 paliers: éther de pétrole 100%, DCM/MeOH 10/0 puis 95/5; dépôt liquide). Les produits (**172**) et (**177**) sont obtenus avec des rendements respectifs de 11% (17 mg) et 62% (100 mg) (450 mg) sous la forme d'un solide jaune et un solide rouge.

#### 172

**R<sub>f</sub>**: (DCM/AcOEt 8/2) 0.15

**P<sub>f</sub>** > 260°C

**RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.86 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.63 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.59 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.27 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 63 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  151.59 (Cq), 144.50, 142.80, 139.00, 135.09 (Cq), 134.09, 133.11 (Cq), 132.21 (Cq), 100.90

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_7$  212.0679, mesuré 212.0678

#### 177

**R<sub>f</sub>**: (DCM/AcOEt 8/2) 0.15

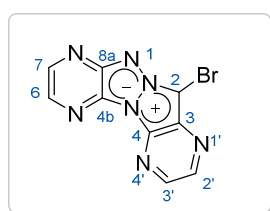
$P_f$ : 229°C

**RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.93 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 8.82 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.67 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 8.29 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  147.07, 146.88, 141.25, 134.44, 99.98 (carbones quaternaires non visibles)

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_7$  212.0679, mesuré 212.0678

### Composé 178



$\text{C}_9\text{H}_4\text{BrN}_7$   
MM: 290,07g.mol $^{-1}$

A une solution de composé (**172**) (50mg, 0.24mmol, 1éq.) dans l'acétonitrile (4mL), placée à 0°C et sous atmosphère d'argon, le NBS (46mg, 0.26mmol, 1.1éq.) est ajouté par petites portions. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation en laissant la température revenir doucement à la température ambiante. Après 3h de réaction le mélange réactionnel est repris au dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  puis à l'eau, et ensuite séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrée à sec. Le résidu brut est filtré sur un lit de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 10/0 puis 95/5 ; dépôt solide). Le produit désiré (**178**) est obtenu avec un rendement de 83% (55mg) sous la forme d'une poudre orange.

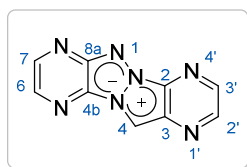
$P_f$ : 270°C (dégradation)

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.92 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 8.68 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 8.64 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 8.30 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 10K)**  $\delta$  144.47, 143.01, 139.53, 134.36 (carbones quaternaires non visibles)

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_9\text{H}_5\text{BrN}_7$  289.9783, mesuré 289.9782

### Composé (179)



$C_9H_4BrN_7$   
MM: 290,07g.mol<sup>-1</sup>

Dans un ballon contenant une solution de NaOH (2M, 1mL) placé à 0°C, le composé **(177)** (57mg, 0.27mmol, 1éq.) est introduit. Après quelques minutes d'agitation à froid, une solution de dibrome (28μL, 0.54mmol, 2éq.) solubilisé dans une solution de NaOH (2M, 0.5 mL) est ajouté au mélange goutte à goutte. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à froid jusqu'à consommation totale du réactif limitant. Le milieu réactionnel est ensuite repris à l'eau (5mL) et est extrait trois fois au dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et concentrées à sec. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/AcOEt 10/0 puis 9/1 ; dépôt solide). Le dérivé bromé **(179)** est obtenu avec un rendement de 48% (38mg) sous la forme d'un solide violet.

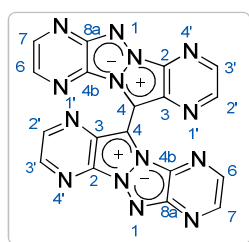
$R_f$ : (DCM/AcOEt 8/2) 0.33

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.97 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H), 8.84 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 8.69 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H), 8.39 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 10K)** δ 147.03, 146.71, 141.59, 134.70 (carbones quaternaires non visibles)

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>7</sub> 289.9784, mesuré 289.9787

### Composé (185)



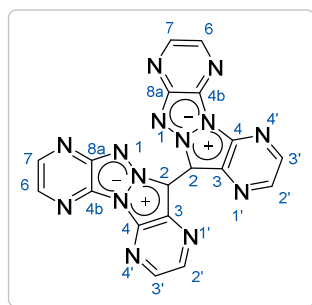
$C_{18}H_8N_{14}$   
MM: 420,36g.mol<sup>-1</sup>

Dans un vial micro-ondes sous argon, il est introduit successivement du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (4.6mg, 0.0036mmol, 5mol%), du CuSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (21mg, 0.106 mmol, 1.5éq.), de la pyridine (6μL, 0.071mmol, 1éq.) le composé **(177)** (15mg, 0.071mmol, 1éq.) et enfin le benzothiophène (29mg, 0.21mmol, 3éq.) dans le dioxane (0.2mL). Le mélange réactionnel est ensuite agité 5 minutes à température ambiante, suivi d'un chauffage à 70°C pendant 1h. Le brut réactionnel est par la suite dissous dans un minimum de chloroforme, et le produit précipité avec l'ajout de cyclohexane. Après filtration sur Milli-Pore, le produit **(185)** est obtenu sous forme d'un solide bleu nuit. (25.5 mg, 85%)



**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{13}H_8N_7S$  421.1129, mesuré 421.1131.

### Composé (187)

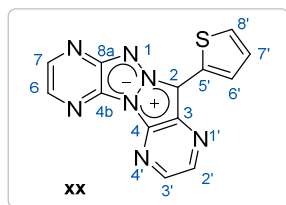


$C_{18}H_8N_{14}$   
MM: 420,36g.mol<sup>-1</sup>

Dans un vial micro-ondes sous argon, il est introduit successivement du  $Pd(PPh_3)_4$  (4.6mg, 0.0036mmol, 5mol%), du  $CuSO_4 \cdot H_2O$  (21mg, 0.106 mmol, 1.5éq.), de la pyridine (6μL, 0.071mmol, 1éq.), le composé **(172)** (15mg, 0.071mmol, 1éq.) et enfin le benzothiophène (29mg, 0.21mmol, 3éq.) dans le dioxane (0.2mL). Le mélange réactionnel est ensuite agité 5 minutes à température ambiante, suivi d'un chauffage à 70°C pendant 1h. Le brut réactionnel est par la suite dissous dans un minimum de chloroforme, et le produit précipité avec l'ajout de cyclohexane. Après filtration sur Milli-Pore, le produit **(187)** est obtenu sous forme d'un solide bleu nuit. (23 mg, 77%)

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{13}H_8N_7S$  421.1129, mesuré 421.1128.

### Composé (180)



$C_{13}H_7N_7S$   
MM: 293,30g.mol<sup>-1</sup>

#### Méthode 1 : Couplage de Suzuki

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale D* dans un ballon, à partir de l'acide 2-thienylboronique (12mg, 0.09mmol, 1.5éq.) et du dérivé bromé **(178)** (25mg, 0.09mmol, 1éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/ $H_2O$  (1.9mL/0.6mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 50°C pendant 1h puis à 70°C pendant 3h. Après retour à température ambiante le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 10/0 puis 9/1 ; dépôt solide). Le produit désiré **(180)** est obtenu avec un rendement de 86% (15mg) sous la forme d'une poudre orange.

#### Méthode 2 : C-H Arylation

Dans un tube à micro-ondes, le  $K_2CO_3$  (39mg, 0.28mmol, 2éq.), le  $[Pd(dppf)Cl_2] \cdot CH_2Cl_2$  (5.8mg, 0.007mmol, 0.05éq.), le  $PPh_3$  (3.7mg, 0.017mmol, 0.1éq.), le 2-iodothiophène (23.5μL, 0.21mmol, 1.5 éq.) et le composé **(172)** (30mg, 0.14mmol, 1éq.) sont introduits et dissout dans l'eau distillée (0.5mL). La réaction est laissée sous agitation à 70°C pendant 18h. L'analyse RMN montre une conversion de seulement 44%.

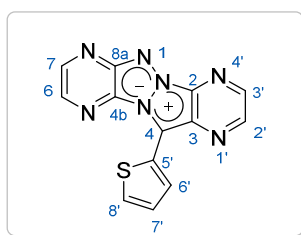
$P_f > 270^\circ C$

**RMN ( $^1H$ , 400 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  8.98 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 8.71 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 8.66 (dd,  $J = 3.8, 1.1$  Hz, 1H), 8.57 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 8.24 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 7.65 (dd,  $J = 5.0, 1.0$  Hz, 1H), 7.36 (dd,  $J = 5.0, 3.8$  Hz, 1H)

**RMN ( $^{13}C$ , 101 MHz,  $CDCl_3$ , 10K)**  $\delta$  143.62, 142.27, 139.45, 133.87, 128.03, 128.00, 128.00 (carbones quaternaires non visibles)

**HRMS (ESI) :**  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{13}H_8N_7S$  294.0556, mesuré 294.0557

### Composé (181)



$C_{13}H_7N_7S$   
MM: 293,30g.mol $^{-1}$

### Méthode1 : Couplage de Suzuki

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale D* dans un ballon, à partir de l'acide 2-thienylboronique (5.3mg, 0.04mmol, 1.5éq.) et du dérivé bromé **(179)** (7.8mg, 0.03mmol, 1éq.) dans un mélange 1,4-dioxane/ $H_2O$  (0.6 mL/0.2mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 70°C pendant 1h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré à sec et le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 10/0 puis 95/5 ; dépôt solide). Le produit désiré **(181)** est obtenu avec un rendement de 40% (7.9mg) sous forme d'un solide bleu.

### Méthode2 : C-H Arylation

Dans un tube à micro-ondes, le  $K_2CO_3$  (19.3mg, 0.14mmol, 2éq.), le  $[Pd(dppf)Cl_2] \cdot CH_2Cl_2$  (2.9mg, 0.004mmol, 0.05éq.), le  $PPh_3$  (1.9mg, 0.007mmol, 0.1éq.), le 2-iodothiophène (12μL, 0.11mmol, 1.5eq) et le composé **(177)** (15mg, 0.07mmol, 1éq) sont introduits et dissout dans le dioxane distillé (0.6mL). Le tube est scellé et est laissé sous agitation sous un chauffage thermique à

70°C pendant 1h (aucune conversion) et à 100°C pendant 1h (conversion complète). Après refroidissement le mélange réactionnel est repris à l'eau et est extrait au DCM (2 fois). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrées à sec. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/AcOEt: 10/0 et 95/5 ; dépôt solide). Le composé **(181)** est obtenu avec un rendement de 80% (16.5mg) sous forme d'un solide bleu.

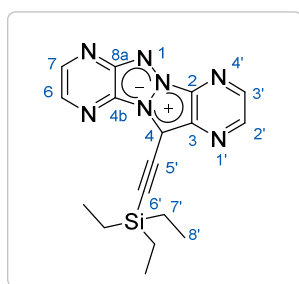
$R_f$ : (DCM/AcOEt 8/2) 0.6

**RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  9.14 (dd,  $J = 3.9, 1.1$  Hz, 1H), 9.00 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 8.78 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 8.74 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 8.28 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.62 – 7.58 (m, 1H), 7.33 (dd,  $J = 5.1, 3.8$  Hz, 1H) 6.98 (s, 1H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  152.06, 146.59, 145.59, 142.28, 135.90, 132.62, 130.90, 128.35, 127.93, 124.75

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_7\text{S}$  294.0556, mesuré 294.0556

### Composé (182)



$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_7\text{Si}$   
MM: 350,473g.mol $^{-1}$

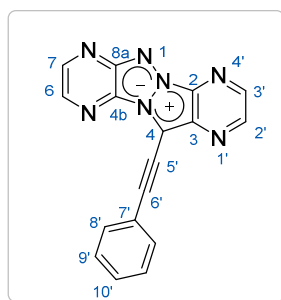
Ce composé a été préparé selon la *Procédure générale F* à partir du triethyl(éthynyl)silane (19 $\mu\text{L}$ , 0.103mmol, 2 $\text{éq.}$ ) et du dérivé bromé **(179)** (15mg, 0.052mmol, 1 $\text{éq.}$ ). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 10min (changement de couleur de rouge vers violet). Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane/AcOEt 7/3 ; dépôt solide). Le produit désiré **(182)** est obtenu avec un rendement de 22% (4mg) sous la forme d'un solide violet.

$R_f$ : (DCM/AcOEt) 0.57

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.96 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 8.82 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 8.69 – 8.65 (m, 1H), 8.36 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 1.21 – 1.13 (m, 7H), 0.86 (m, 6H)

**SM (IC+)** :  $m/z$  351 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )

### Composé (183)



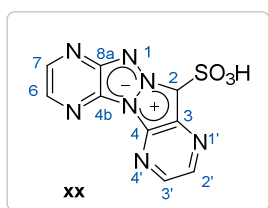
$C_{17}H_9N_7$   
MM: 311,30g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé a été préparé selon la *Procédure générale F* à partir du phénylacétylène (14μL, 0.12mmol) et du dérivé bromé (**179**) (18mg, 0.061mmol, 1éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 10min. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/AcOEt 10/0 puis 95/5 ; dépôt solide). Le produit désiré (**183**) est obtenu avec un rendement de 16% (3mg) sous la forme d'un solide violet.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.98 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.84 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.71 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.41 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.82 – 7.76 (m, 2H), 7.47 – 7.42 (m, 3H)

**SM (IC<sup>+</sup>)** : *m/z* 312 (M+H<sup>+</sup>)

### Composé (**188**)



$C_9H_5N_7O_3S$   
MM: 291,24g.mol<sup>-1</sup>

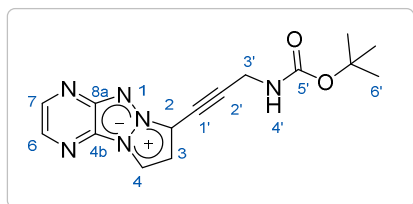
A une solution de (**172**) dans le CHCl<sub>3</sub> (2mL) est ajoutée l'acide chlorosulfonique (20μL, 0.3mmol, 2.5éq.). La suspension orange obtenue est laissée sous agitation à 80°C pendant 2h (un précipité orange se forme). Après retour à température ambiante, le milieu est concentré et le résidu est purifié par chromatographie en phase inverse (H<sub>2</sub>O/MeOH 80/20 ; dépôt liquide avec H<sub>2</sub>O). Le produit désiré (**188**) est obtenu avec un rendement de 15% (5mg) sous la forme d'une poudre jaune.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 8.99 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.79 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.70 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), (d, *J* = 2.8 Hz, 1H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 150.32 (C<sub>q</sub>), 144.74, 142.31, 139.73, 135.51, 132.26(C<sub>q</sub>), 132.04(C<sub>q</sub>), 131.70 (C<sub>q</sub>), 130.37 (C<sub>q</sub>)

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S 292.0247, mesuré 292.0247

**7-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)prop-1-yn-1-yl)pyrazolo [1',2':1,2] [1,2,3] triazolo[4,5-*b*]pyrazin-6-ium-5-ide (191)**



$C_{15}H_{16}N_6O_2$   
MM: 312,32g.mol<sup>-1</sup>

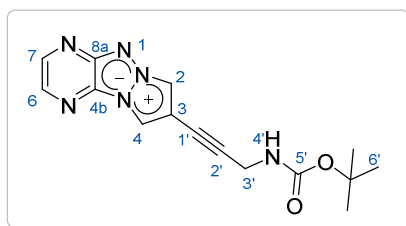
Ce composé est préparé selon la Procédure générale F à partir du *tert*-butyl-prop-2-ynylcarbamate (336mg, 2.1mmol, 2éq.) et du dérivé iodé (**74**) (100mg, 0.11mmol, 1éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation au reflux du solvant pendant 18h (solubilisation totale). Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/AcOEt 10/0 puis 8/2; dépôt solide). Le produit désiré (**191**) est obtenu avec un rendement de 37% (123mg) sous la forme d'une poudre jaune.

**P<sub>f</sub>** : 173°C

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.52 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.02 – 7.92 (m, 2H), 6.97 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 1.55 (s, 9H)

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> 313.1407, mesuré 313.1407

**8-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)prop-1-yn-1-yl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyrazin-6-ium-5-ide (192)**



$C_{15}H_{16}N_6O_2$   
MM: 312,32g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale F à partir du *tert*-butyl-prop-2-ynylcarbamate (112mg, 0.70mmol, 2éq.) et du dérivé iodé (**69**) (100mg, 0.35mmol, 1éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 2h (solubilisation totale). Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/AcOEt/MeOH 10/0/0, 8/2/0 puis 8/1.8/0.2 ; dépôt solide). Le produit désiré (**192**) est obtenu avec un rendement de 78% (85mg) sous la forme d'une poudre jaune.

**R<sub>f</sub>** : (DCM/AcOEt 8/2) 0.2.

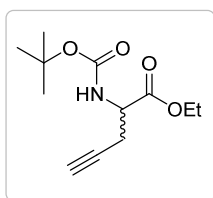
$P_f$ : 185°C (dégradation)

**RMN ( $^1\text{H}$ , 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8.47 (s, 1H,  $\text{H}_1$  ou  $\text{H}_2$ ), 8.11 (s, 1H,  $\text{H}_3$  ou  $\text{H}_4$ ), 7.95 (s, 1H,  $\text{H}_1$  ou  $\text{H}_2$ ), 7.86 (s, 1H,  $\text{H}_3$  ou  $\text{H}_4$ ), 4.81 (se, 1H,  $\text{H}_6$ ), 4.19 (d,  $J = 5.1$  Hz, 2H,  $\text{H}_5$ ), 1.48 (s, 9H,  $\text{H}_7$ )

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  155.43, 152.80, 143.78, 132.29, 130.91, 128.69, 112.22, 110.69, 107.17, 90.09, 80.30, 72.07, 28.51

**HRMS (ESI)** :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculé pour  $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_2$  313.1407, mesuré 313.1408

**Ethyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)pent-4-ynoate (195)**



$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_4$   
MM: 241,2870g.mol $^{-1}$

Le chlorure d'acétyl (2mL, 27.40mmol, 6.2éq.) est introduit dans un ballon contenant l'éthanol (40mL) refroidi à 0°C. Après 30 min d'agitation à 0°C la L,D-propargylglycine (500mg, 4.42mmol, 1éq.) est introduit par petites portions. La solution est laissée revenir à température ambiante, puis est laissée sous agitation à reflux du solvant pendant 4h. Le solvant est évaporé pour obtenir le produit **(194)** salifié sous la forme d'un solide blanc avec un rendement quantitatif. La triéthylamine (3.1mL, 22.10mmol, 5éq.) est ajouté à une solution contenant l'ester dans le dichlorométhane distillé (11mL). Après 10min d'agitation à température ambiante, le dicarbonate de di-*tert*-butyle (1.45g, 6.64mmol, 1.5éq.) est introduit. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 18h. Le milieu est ensuite lavé avec une solution de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  à 5%, eau, une solution de  $\text{NaHCO}_3$  saturée, séché sur  $\text{MgSO}_4$ , filtré et concentré à sec. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (Cyclohexane/AcOEt 8/2 ; dépôt liquide). Le produit désiré **(195)** sous sa forme racémique est obtenu avec un rendement de 97% (1.03 g, sur 2 étapes) sous la forme d'une huile incolore.

$R_f$ : (Cyclohexane/AcOEt 8/2) 0.44

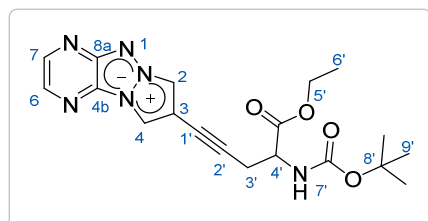
**RMN ( $^1\text{H}$ , 250 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )**  $\delta$  5.34 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, NH), 4.52 – 4.40 (m, 1H), 4.24 (p,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.73 (s, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.29 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H)

**RMN ( $^{13}\text{C}$ , 101 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )**  $\delta$  170.73, 155.25, 80.27, 78.72, 71.64, 61.90, 52.08, 28.44, 27.06, 23.02, 14.31

**SM (IC+)** :  $m/z$  242 ( $M+H^+$ ), 264 ( $M+Na^+$ ).

**HRMS (ESI)** :  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{12}H_{20}NO_4$  242.1387, mesuré 242.1386.

**8-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-ethoxy-5-oxopent-1-yn-1-yl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (196)**



$C_{19}H_{25}N_6O_4$   
MM: 401,43g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la Procédure générale E à partir du éthyl 2-(2-Boc)pent-4-ynoate (**195**) (305mg, 1.26mmol, 2éq.) et du dérivé iodé (**69**) (300mg, 1.05mmol, 1éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 4h (solubilisation partielle). Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/AcOEt de 100/0 à 9/1, puis DCM/MeOH 98/2 ; dépôt solide). Le produit désiré (**196**) est obtenu avec un rendement de 87% (420mg) sous la forme d'une poudre orange.

**R<sub>f</sub>**: (DCM/ AcOEt : 8 /2) 0.39

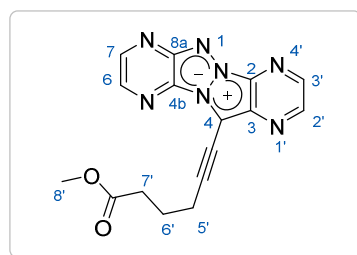
**P<sub>f</sub>**: 64°C

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CD<sub>3</sub>CN)** δ 8.32 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 5.87 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.46 – 4.32 (m, 1H), 4.17 (p,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.92 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.23 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, CD<sub>3</sub>CN)** δ142.95, 130.16, 112.84, 110.62, 61.45, 59.98, 52.44, 27.54, 22.81, 20.17, 13.59. (carbones quaternaires non visibles)

**HRMS (ESI)** :  $[M+H]^+$  calculé pour  $C_{19}H_{24}N_6O_4$  299.1775, mesuré 299.1777

**Composé 198 .**



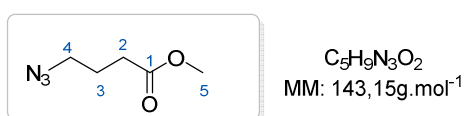
$C_{16}H_{14}N_7O_2$   
MM: 336,32g.mol<sup>-1</sup>

Ce composé est préparé selon la *Procédure générale F* à partir du 5-hexynoate de méthyle (4.4μL, 0.03mmol, 2éq.) et du dérivé bromé (**179**) (4.7mg, 0.016mmol, 1éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 10min. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/AcOEt 10/0, 9/1 puis 8/2 ; dépôt solide). Le produit désiré (**198**) est obtenu avec un rendement de 37% (2mg) sous la forme d'un solide violet.

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.93 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.67 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.75 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.20 – 2.07 (m, 2H).

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> 336.1203, mesuré 336.1205.

### Methyl 4-azidobutanoate (**199**)



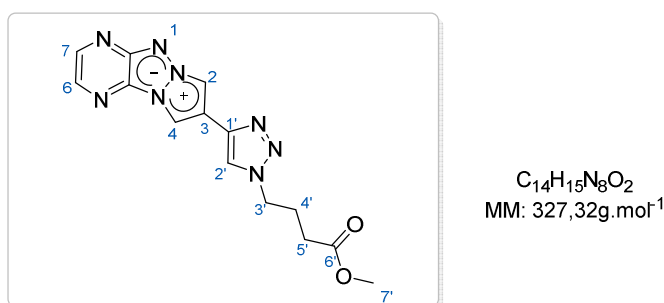
A une solution de méthyl-4-bromobutyrate (500μL, 3.8mmol, 1éq.) dans le DMSO (1.1 mL) est ajouté l'azoture de sodium (374mg, 5.7mmol, 1.5éq.). La solution obtenue est laissée sous agitation à 50°C pendant 14h. Après refroidissement le milieu réactionnel est repris à l'eau et est extrait trois fois à l'éther. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution saturée en NaCl, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et concentrées à sec. Le résidu brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/AcOEt 9/1; dépôt liquide). Le produit désiré (**199**) est obtenu avec un rendement de 97% (530mg) sous la forme d'une huile incolore.

**RMN (<sup>1</sup>H, 250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 3.69 (s, 1H), 3.47 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 2.51 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 2.25 – 2.10 (m, 1H)

**Numéro CAS** : 87517-47-3

**Référence bibliographique** : WO2010082050

### 8-(1-(4-methoxy-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pyrazolo[1',2':1,2][1,2,3]triazolo[4,5-b]pyrazin-6-ium-5-ide (**200**)





Le composé **(98)** (20mg, 0.11mmol, 1éq.) est solubilisé dans un mélange *t*BuOH/H<sub>2</sub>O (1.4mL/0.4mL). Le 4-azidobutanoate de méthyle **(199)** (19mg, 0.13mmol, 1.2éq.), l'ascorbate de sodium (8.4mg) et le sulfate de cuivre pentahydraté (7.3mg) sont introduits. La suspension obtenue est laissée sous agitation à température ambiante pendant 24h puis 5h à 50°C. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré et est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (DCM/MeOH 100/0, 95/5 puis 9/1). Le produit **(200)** est obtenu avec un rendement de 86% sous forme d'une poudre jaune.

**P<sub>f</sub>**: 229°C

**RMN (<sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO)** δ 8.99 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.41 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 4.50 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.60 (s, 3H), 2.40 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.14 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H)

**RMN (<sup>13</sup>C, 101 MHz, DMSO)** δ 172.47 (C<sub>q</sub>), 151.83 (C<sub>q</sub>), 142.55, 138.28 (C<sub>q</sub>), 129.50, 129.15, 122.27, 116.74 (C<sub>q</sub>), 107.89, 107.26, 51.43, 48.82, 30.12, 25.13

**HRMS (ESI)** : [M+H]<sup>+</sup> calculé pour C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub> 327.1312, mesuré 327.1315





**Doina SIRBU**

**Conception et caractérisation de nouveaux fluorophores organiques de la famille de triazapentalènes : Outils pour l'imagerie cellulaire**

**Résumé**

Au cours du 21<sup>ème</sup> siècle, les techniques de fluorescence ont montré une expansion considérable dans l'étude du mécanisme du vivant. Un progrès majeur dans le développement, la conception et les applications de divers types de chromophores organiques ont été achevés. Bien que largement utilisés, les sondes fluorescentes les plus utilisées souffrent encore de quelques limitations qui diminuent leur étendue d'action. Les plus problématiques sont : un nombre restreint de familles de chromophores, une faible résistance au photoblanchiment, une faible solubilité aqueuse, une durée de vie de fluorescence relativement courte, *etc...* A ce titre, le développement de nouveaux motifs organiques inédits, compacts et possédants des propriétés de fluorescence alternatives et/ou complémentaires aux fluorophores usuels organiques reste plus que jamais d'actualité. Dans ce contexte, les noyaux 1,3a,6a-triazapentalènes nous sont apparus particulièrement prometteuses et encore très peu exploitées. Dans ce manuscrit, il est décrit la synthèse de noyaux tricycliques et tétracycliques comportant ce motif, obtenus par substitution nucléophile aromatique, suivi d'une thermolyse. La modulation de ces noyaux a ensuite été effectuée par couplage métallo-catalysé. L'évaluation photophysique de ces composés révèle des propriétés spectroscopiques remarquables comme des rendements quantiques supérieurs à 50%, des déplacements de Stokes d'environ 100 nm et des longueurs d'ondes d'émission allant de 450 à 650 nm. Le dernier volet de cette thèse a porté sur l'imagerie cellulaire, qui nous ont permis d'évaluer les meilleurs fluorophores sur cellules vivantes.

Mots clés : Fluorescence, triazapentalène, photoblanchiment, amphiphile, propriétés photophysiques, imagerie cellulaire, couplages organo-métalliques, thermolyse, S<sub>N</sub>Ar

**Design and characterization of new organic fluorophores analogs of triazapentalenes as tools for cellular imaging**

**Abstract :**

Over the last two decades, fluorescence technologies have shown a spectacular spreading in biological research. Major progress in the development, design, and purposeful application of various types of organic chromophores was achieved. Although widely used, the most commonly fluorescent probes still suffer from some limitations which decrease their use in the field of life sciences. The most problematic ones are: low scaffold diversity, high sensitivity to photobleaching, low water solubility and modest Stokes Shift... In this context, the main idea of our work focuses on the development of novel organic motifs responding to the conventional fluorophores issues. The 1,3a,6a-triazapentalene moiety represents a real interest in this field with its promising optical properties. In this manuscript, the syntheses of tricyclic and tetracyclic derivatives containing this scaffold were obtained by aromatic

nucleophilic substitution followed by the thermolysis cyclization. The modulation of these cores was then allowed by various organometallic cross-coupling reactions. The photophysical characterization of these compounds provides remarkable spectroscopic properties, as quantum yields above 50%, Stokes shift around 100 nm, and emission wavelengths between 450 and 650 nm. The last part of this thesis was focused on cellular imaging, that allowed us to evaluate the best fluorophores in living cells.

Keywords : Fluorescence, triazapentalène, photobleaching, amphiphile, photophysics properties, organometallic coupling, thermolysis,  $S_NAr$



**ICOA, Institut de Chimie Organique et Analytique**  
**UMR 7311 - UFR Sciences - BP 6759 - rue de Chartres**  
**45067 Orléans cedex 2**

