



HAL
open science

Synthèse et évaluation de dérivés tétrahydroisoquinoléine-hydantoïne comme ligands sélectifs des récepteurs sigma 1

Marion Toussaint

► **To cite this version:**

Marion Toussaint. Synthèse et évaluation de dérivés tétrahydroisoquinoléine-hydantoïne comme ligands sélectifs des récepteurs sigma 1. Médicaments. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT: . tel-00326915

HAL Id: tel-00326915

<https://theses.hal.science/tel-00326915>

Submitted on 6 Oct 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2008

THESE

Présentée à

UNIVERSITE DROIT ET SANTE LILLE 2

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE

Discipline : Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique
Spécialité : Science du médicament

Par

Marion TOUSSAINT

SYNTHESE ET EVALUATION DE DERIVES DE TETRAHYDROISOQUINOLEINE-HYDANTOINE COMME LIGANDS SELECTIFS DES RECEPTEURS SIGMA 1

Soutenue le 25 septembre 2008

Membres du Jury

Directeur de thèse : **P. MELNYK**, Professeur, Université de Lille 2.

Rapporteurs : **P. MEFFRE**, Professeur, Université de Nîmes.
G. GUICHARD, Directeur de Recherche, IBMC Strasbourg.

Examineurs : **C. JARRY**, Professeur, Université de Bordeaux 2.
T. MAURICE, Directeur de Recherche, Université de Montpellier 2.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Chimie et Micronanotechnologie à visée thérapeutique à l'Institut de Biologie de Lille, UMR8161, sous la direction du Professeur Patricia MELNYK.

Ce projet a pu être effectué grâce à une bourse BDI CNRS-région Nord Pas de Calais. Il a été financé par la MILDT.

Je tiens à remercier :

Madame le Professeur Patricia Melnyk, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir fait profiter de son expérience et de ses connaissances et la confiance qu'elle m'a témoignée en me confiant ce sujet.

Monsieur le Docteur Gilles Guichart, et Monsieur le Professeur Patrick Meffre, d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'en être les rapporteurs.

Monsieur le Professeur Christian Jarry, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur le Docteur Tanguy Maurice, de m'avoir permis de rejoindre son groupe de recherche pendant quelques semaines, de m'avoir accueillie si chaleureusement au sein de son laboratoire, d'avoir partagé ses connaissances, de participer au jury de thèse et d'examiner ce travail.

Je tiens aussi à remercier :

Marie-Ange Debreu-Fontaine, pour son aide dans l'accomplissement de ce travail et son amitié.

Alexandre Lebeau, pour son aide dans la réalisation de ce travail.

Hervé Drobecq et Gérard Montagne, pour avoir effectué les analyses RMN et Maldi-TOF, leur disponibilité et leur sympathie.

Catherine Foulon, pour la réalisation des analyses des composés et pour sa disponibilité.

Deborah Mousset, pour ses précieux conseils, son amitié, son soutien et sa bonne humeur. Merci pour tous les bons moments partagés ensemble.

Emmanuelle Boll, pour son amitié, son humour et sa bonne humeur.

Nicole Dupont, pour ses conseils et sa sympathie.

Manon Pontais, pour toute son aide, son soutien et son amitié.

Alexandre Barras, pour son amitié et ses bons petits plats, j'ai été heureuse d'avoir partagé ces moments ensemble.

Stéphane Burlet et Sylvain Marc, pour leurs précieux conseils, leurs discussions enrichissantes, leur amitié et leur soutien.

Guillaume Hochart, pour son amitié et pour m'avoir supportée dans le bureau pendant la période de rédaction.

Clément Roux, pour son aide en anglais, son amitié, son « humour » et pour avoir été un excellent partenaire de volley.

Nathalie, pour toutes les discussions de voyages et de photos.

Réda et Rémi, pour leur bonne humeur et leur sympathie.

Emilia, Antoine, Sandy, Mia, Vanessa pour la dent 2, Soizic, Annick, Nicolas et toute la dent 1, pour avoir fait de ce laboratoire un lieu de travail agréable.

Enfin, merci à toutes les personnes du laboratoire de Montpellier pour m'avoir si chaleureusement accueillie et pour leur aide dans la réalisation des études comportementales.

Publications et communications

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications et aux communications suivantes :

Publications

Synthesis and Evaluation of Tetrahydroquinoline-Hydantoine Derivatives as σ_1 Receptor Selective Ligands. Toussaint, M.; Cazenave Gassiot, A.; Charton, J.; Melnyk, P. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2006, 20, 626.

Synthesis of a new Tic-hydantoine derivative acting as selective σ_1 protein activator, and validation as a potential anti-cocaine agent.

Toussaint, M.; Delair, B.; Foulon, C.; Lempereur, N.; Vaccher, C.; Maurice, T.; Melnyk, P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008, soumis.

Communication orale

Conception, Synthèse et Evaluation pharmacologique de ligands du récepteur sigma-1, 12^{ème} Rencontres en Chimie Organique Biologique RECOB, Aussois, 17-19 Mars 2008.

Communications par affiches

Mousset, D.; **Toussaint, M.**; Melnyk, P. *Validation du noyau Tic-hydantoïne pour la conception de ligands du récepteur σ_1 ,* 15^{èmes} Journées de l'AECCPCM, Marseille, 10-11 Avril, 2008

Toussaint, M.; Delair, B.; Foulon, C.; Lempereur, N.; Vaccher, C.; Maurice, T.; Melnyk, P. *Validation of σ_1 receptor agonists as a putative anti-cocaine agent,* 12^{ème} Rencontres en Chimie Organique Biologique RECOB, Aussois, 17-19 Mars, 2008.

Mousset, D.; **Toussaint, M.**; Melnyk, P. *Validation du noyau Tic-hydantoïne pour la conception de ligands du récepteur σ_1 ,* 12^{ème} Rencontres en Chimie Organique Biologique RECOB, Aussois, 17-19 Mars, 2008

Toussaint, M.; Delair, B.; Foulon, C.; Lebeau, A.; Lempereur, N.; Vaccher, C.; Maurice, T.; Melnyk, P. *Synthesis of a new sigma-1 receptor ligand and validation as a putative anti-cocaine agent,* 234th ACS National Meeting, Boston MA, Août 19-23, 2007.

Toussaint, M.; Lempereur, N.; Lebeau, A.; Delair, B.; Maurice, T.; Melnyk, P. *Selective σ_1 receptor agonist, the Tic-hydantoine derivative **1**, and validation as a putative anti-cocaine agent,* 8^{ième} colloque de la société des neurosciences, Montpellier, 22-25 Mai, 2007.

Toussaint, M.; Delair, B.; Foulon, C.; Lebeau, A.; Lempereur, N.; Vaccher, C.; Maurice, T.; Melnyk, P. *Synthèse d'un nouvel agoniste sélectif des récepteurs σ_1 comme agent potentiel anti-cocaïne,* 21^{èmes} Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, FUNDP, Namur, 10-11 mai, 2007

Toussaint, M.; Dupont, N; Cazenave Gassiot, A.; Charton, J; Melnyk, P. *Synthèse et évaluation de dérivés de tétrahydroisoquinoléine-hydantoïne comme ligands sélectifs des récepteurs σ_1* , 20^{èmes} Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Faculté de pharmacie de Lille, Juin 2006.

Toussaint, M. ; Dupont, N; Cazenave Gassiot, A.; Charton, J; Melnyk, P. *Synthèse et étude des relations structure-activité d'une famille de composés tétrahydroisoquinoléine-hydantoïne sélectifs des récepteurs σ_1* , 11^{èmes} Rencontres en Chimie Organique Biologique (RECOB) Aussois, 26-30 Mars 2006.

Table des matières

Abréviations	11
Introduction	13
I. La protéine sigma	14
1. Historique	14
2. Sous-types et structure de la protéine sigma	15
2.1. La protéine σ_1	15
2.2. La protéine σ_2	18
3. Distribution anatomique de la protéine sigma	18
3.1. Localisation cellulaire	18
3.2. Localisation au niveau central	19
3.3. Localisation au niveau périphérique	19
4. Ligands du site de liaison sigma	20
5. Ligands synthétiques et pharmacophores	20
6. Mode de transduction	23
7. Rôle de la protéine sigma	25
7.1. La dépendance aux drogues	26
7.2. La schizophrénie	28
7.3. L'apprentissage de la mémoire	29
7.4. L'anxiété et la dépression	31
7.5. La douleur	32
7.6. Le cancer	32
7.7. L'épilepsie	33
7.8. L'ischémie	34
II. La protéine σ_1 et la cocaïne	34
1. La cocaïne	34
1.1. Historique	34
1.2. Utilisation, effets et danger de la cocaïne	35
1.3. Métabolisation de la cocaïne	36
2. Mécanisme d'action de la cocaïne	37
3. Thérapies existantes	38
4. Nouvelles stratégies thérapeutiques	38
4.1. Antagonistes dopaminergiques	38
4.2. Thérapies facilitant la transmission dopaminergique	39
4.3. Thérapies ciblant d'autres récepteurs	40
4.4. Immunopharmacothérapie	44
5. Les relations entre la protéine σ_1 et la cocaïne	44
5.1. Implication de σ_1 dans les effets stimulants de la cocaïne	47
5.2. Implication de σ_1 dans les effets appétants de la cocaïne	48
5.3. Implication de σ_1 dans les effets toxiques et convulsifs de la cocaïne	49
5.4. Implication de σ_1 dans l'auto-administration de la cocaïne	50
5.5. Implication de σ_2 dans les effets de la cocaïne	50
III. Projet de recherche	51
1. Les dérivés tétrahydroisoquinoléines	51

2. Travaux antérieurs	52
2.1. Modification du noyau Tic-Hydantoïne	52
2.2. Modification de la nature et des longueurs des chaînes latérales	54
2.3. Modification des longueurs de part et d'autre de l'azote protonable	55
3. Objectif du travail	57
Synthèse des ligands sigma : résultats et discussion	59
I. Modification du noyau Tic-hydantoïne	60
1. Stratégie de synthèse	60
2. Synthèse de l'énantiomère R	62
2.1. Protection de l'aminopropanol	62
2.3. Méthylation	62
2.4. Addition de la N-méthylbenzylamine	63
2.5. Déprotection de l'amine 7	63
2.6. Condensation de l'amine 8	64
2.7. Déprotection de l'amine 9 suivie de la cyclisation	65
2.8. Synthèse de l'énantiomère S	67
3. Synthèse des dérivés thiocarbonyles	68
3.1. Synthèse de l'analogue thiohydantoïne	68
3.2. Remplacement du carbonyle par un thiocarbonyle	69
4. Synthèse de l'analogue ouvert	69
4.1. Schéma de synthèse	69
4.2. Synthèse de la N,N'-Boc-méthyl-L-phénylalanine	70
4.3. Déprotection et condensation de l'amine 8	70
4.4. Déprotection de l'amine 15 suivie de la cyclisation	71
5. Synthèse du dérivé tétraline	71
5.1. Stratégie de synthèse	71
5.2. Synthèse de l'amine libre 8	72
5.3. Synthèse de l'alcool 18	72
5.4. Synthèse du maléimide substitué	74
a) Voie A, précurseur : anhydride maléique	74
b) Voie B, précurseur : maléimide	75
5.5. Réaction de cycloaddition de Diels-Alder	79
6. Déplacement de l'atome d'azote sur le noyau tétrahydroisoquinoléine	82
6.1. Stratégie de synthèse	82
6.2. Synthèse du dérivé chloré	83
6.3. Cycloaddition de Diels-Alder	83
7. Remplacement du noyau tétrahydroisoquinoléine par une pyridine	84
8. Fonctionnalisation de la tétrahydroisoquinoléine	86
9. Modification de la liaison Tic-hydantoïne	86
10. Caractérisation physico-chimique des composés 10, 12 et 13	87
10.1 Pureté énantiomérique des dérivés hydantoïnes et thiohydantoïnes	87
a) HPLC	87
b) EC	92
10.2. Pouvoir rotatoire	96
11. Séparation préparative des énantiomères du dérivé thiohydantoïne	97
11.1. Séparation préparative	97
11.2. Pureté énantiomérique des énantiomères isolés	98
12. Etude de la stabilité chirale des énantiomères	98

13. Etudes des paramètres de Lipinski des composés	100
14. Etude de l'affinité	101
II. Modification de la chaîne latérale	105
1. Fonctionnalisation du groupement phényle	106
1.1. Stratégie de synthèse	106
1.2. Etude de la stratégie A	107
a) Voie de synthèse	107
b) Synthèse du noyau Tic-Hydantoïne 32	107
c) Formation de l'aldéhyde	109
d) Synthèse des amines	110
e) Amination réductrice	111
1.3. Etude de la stratégie B	112
a) Voie de synthèse	112
b) Synthèse de l'anhydride	112
c) Monoprotection de la diamine	113
d) Ouverture de l'anhydride	114
e) Formation du noyau Tic-Hydantoïne	114
f) Méthylation de l'amine suivie par une amination réductrice	115
g) Amination réductrice suivie par une méthylation	118
2. Disubstitution de l'atome d'azote protonable par 2 groupements identiques	119
2.1. Substitution par deux groupements aromatiques	119
2.2. Substitution par deux groupements aliphatiques	120
3. Evaluation du rôle du substituant méthyle sur l'azote protonable	121
4. Rigidification de la chaîne	122
5. Introduction d'un motif pipéridine et pipérazine	122
5.1. La famille des pipéridines	123
a) Condensation du dérivé pipéridine et de l'acide Tic-OH	123
b) Cyclisation	124
c) Déprotection	124
d) Amination réductrice	124
5.2. La famille des pipérazines	125
6. Etudes des paramètres de Lipinski des composés	126
7. Etude de l'affinité	127
Etudes Comportementales	132
1. Etude de l'hyperactivité	133
1.1. Méthode	134
1.2. Résultats	135
1.3. Discussion	139
1.4. Etude de l'activité locomotrice des composés 66, 68 et 69	139
2. Etude des effets appétants	141
2.1. Méthode du test de CPP	141
2.2. Résultats du test de CPP	142
2.3. Méthode de la réactivation du CPP	144
2.4. Résultats de la réactivation du CPP	145
2.5. Discussion	147
3. Etude des propriétés de dépendance d'état chimique	148
3.1. Méthode	148
3.2. Résultats	149
3.3. Discussion	153
4. Conclusion	153

ADME	154
Détermination des caractéristiques physico chimiques des composés synthétisés	155
1. Etude des propriétés en solution aqueuse	155
2. Etude des propriétés d'absorption intestinale	156
3. Etude du métabolisme	157
Conclusion et perspectives	159
Partie expérimentale	162
I. Techniques d'analyse et de purification	163
1. Chromatographie sur couche mince CCM	163
2. Chromatographie sur couche épaisse CCE	163
3. Chromatographie sur colonne	163
4. Chromatographie sur colonne prépaquée	163
5. Chromatographie liquide à haute pression HPLC	163
6. Chromatographie HPLC chirale	164
6.1. HPLC analytique	164
6.2. HPLC préparative	164
7. Electrophorèse capillaire EC	164
8. Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse LC-MS	165
9. Spectrométrie de masse	165
9.1. MALDI-TOF	165
9.2. Spectrométrie de mass ESI-MS	166
10. Polarimètre	166
11. Résonance magnétique nucléaire RMN	167
II. Modes opératoires	168
1. Modification de la structure Tic-hydantoïne	168
1.1. Synthèse de l'énantiomère R	168
1.2. Synthèse du dérivé thiohydantoïne	172
1.3. Synthèse de l'analogue ouvert	173
1.4. Synthèse du dérivé tétraline	175
1.5. Déplacement de l'atome d'azote sur le noyau tétrahydroisoquinoléine	179
1.6. Remplacement du noyau quinoléine par une pyridine	182
2. Modification de la chaîne latérale	184
2.1. Fonctionalisation du groupement phényle	184
2.2. Disubstitution de l'atome d'azote protonable par 2 groupements identiques	198
a) Substitution par 2 groupements aromatiques	198
b) Substitution par 2 groupements aliphatiques	202
2.3. Evaluation du petit groupement sur l'azote protonable	204
2.4. Evaluation du petit groupement sur l'azote protonable	206
2.5. Introduction d'un motif pipéridine et pipérazine.	208
a) Introduction d'un motif pipéridine.	208
b) Introduction d'un motif pipérazine.	214

III. Affinités	219
IV. Tests comportementaux	220
1. Test de locomotion	220
2. Test de conditionnement de préférence de place	220
2.1. Procédure du conditionnement de préférence de place	220
2.2. Procédure d'extinction et de réactivation du CPP	221
3. Test de l'évitement passif	221

Abréviations

AC	adénylate cyclase
ACN	acétonitrile
AcOEt	acétate d'éthyle
AcOH	acide acétique
Ac ₂ O	anhydride acétique
AD	amylose tris 3,5-diméthylphénylcarbamate
APTS	acide paratoluènesulfonique
BFC	benzyloxy-4-(trifluorométhyl)-coumarine
Boc	groupement <i>ter</i> -butoxycarbonyle
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butyldicarbonate
CCA	Consommation Chronique d'Alcool
CDI	<i>N,N'</i> -carbonyldiimidazole
CEC	3-cyano 7-ethoxycoumarine
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
coc	cocaïne
CPP	conditionnement de préférence de place
CtxPf	cortex préfrontal
CYP	cytochrome
d	doublet
D1, D2, D3	récepteurs dopaminergiques
DAT	transporteur dopaminergique
DCM	dichlorométhane
DIAD	diisopropylazodicarboxylate
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropyléthylamine
DHEA	dihydroépiandrosterone
DMF	diméthylformamide
E	extinction
EC	électrophorèse capillaire
eq	équivalent
ESI-MS	ionisation electrospray mass spectrometry
EtOH	éthanol
GABA	acide gamma-amino butyrique
Glu	Glutamate
HBTU	hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
Hex	hexane
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
i.p.	intrapéritonéal
IP ₃	inositol triphosphate
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
m	multiplet
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MAM	mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes
MeOH	méthanol

MFC	7-méthoxy 4-trifluorométhyl-coumarine
MsCl	chlorure de mésylate
Nac	Nucleus Accumbens
NMDA	<i>N</i> -méthyl D aspartate
OD-H	cellulose tris 3,5-diméthylphénylcarbamate
Ols	oligodentocytes
P	post-conditionnement
PBS	phosphate buffered saline
PCP	phencyclidine
Pd/C	palladium sur charbon
PLC	phospholipase C
q	quadruplet
quint	quintuplet
R	réactivation
RE	réticulum endoplasmique
s	singulet
SNC	système nerveux central
t	triplet
T.A.	température ambiante
TBAB	bromure de tétrabutylammonium
thioCDI	thiocarbonyldiimidazole
TEA	triéthylamine
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
Tic	tétrahydroisoquinoléine
Tic-OH	acide L-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoléine-3-carboxylique
TMsCl	chlorotriméthylsilane
Tris	1,1,1-Tris(hydroxy methyl) Methylamine
V	véhicule, solution saline
VTA	air tegmantal ventral
5HT	récepteur sérotoninergique-3-carboxylique

Introduction

I. La protéine sigma

1. Historique

L'étude de la protéine σ a été très longue et complexe. Elle est actuellement loin d'être terminée. Cette protéine a été décrite pour la première fois par Martin *et al*¹ en 1976. La dénomination σ vient de la première lettre « s » de SKF-10,047 un ligand prototype, bien que non sélectif du site¹ (Figure 1).

L'équipe de Martin a, en effet, décrit les effets psychomimétiques induits par la *N*-allyl-normetazocine (SKF-10,047) chez le chien. Ces effets n'étaient pas provoqués par les ligands agissant sélectivement sur les récepteurs opiacés μ et κ . Ils ont ainsi proposé σ comme un sous-type de ces récepteurs.

L'énantiosélectivité du site σ pour l'isoforme (+)-benzomorphone par rapport au (-)-benzomorphone² (figure 2) et le fait que ni les effets *in vivo* ni *in vitro* des ligands σ ne soient bloqués par des antagonistes opiacés classiques³, ont laissé le doute quant à la vraie nature du site de liaison σ .

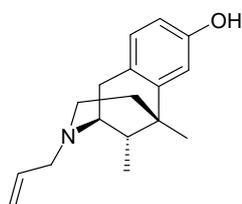


Figure 1: (+)-SKF 10,047
 $IC_{50} = 97nM$
 Agoniste σ_1

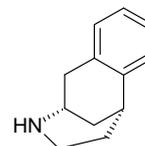
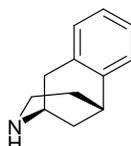


Figure 2: (+)-benzomorphone (-)-benzomorphone

En 1984, le site σ a été identifié comme le site de liaison pour la phencyclidine (PCP) (figure 3) associé aux récepteurs au glutamate de type NMDA,^{4,5} ce qui a été démenti par la

¹ Martin, W. R.; Eades, C. E.; Thompson, J. A.; Huppler, R. E. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1976**, *197*, 517-532. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog.

² Brady, K. T.; Balster, R. L.; May, E. L. *Science* **1982**, *215*, 178-180. Stereoisomers of *N*-allylnormetazocine: phencyclidine-like behavioral effects in squirrel monkeys and rats.

³ Iwamoto, E. T. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, *217*, 451-460. Locomotor activity and antinociception after putative mu, kappa and sigma opioid receptor agonists in the rat: influence of dopaminergic agonists and antagonists.

⁴ Zukin, S. R.; Brady, K. T.; Slifer, B. L.; Blaster, R. L. *Brain Res.* **1984**, *294*, 174-177. Behavioral and biochemical stereoselectivity of sigma opiate/PCP receptors.

⁵ Mendelsohn, L. G.; Kalra, V.; Johnson, B. G.; Kerchner, G. A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, *233*, 597-602. Sigma opioid receptor: characterization and co-identity with the phencyclidine receptor.

suite. Les sites σ ont donc été reclassés comme n'étant ni des récepteurs opiacés ni des sites PCP, mais des sites de liaison distincts⁶.

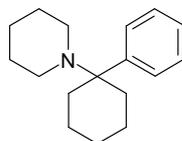


Figure 3: **phencyclidine**
K_i = 560nM

2. Sous-types et structure de la protéine sigma

Les études biochimiques et pharmacologiques ont montré l'existence de plusieurs sous-types du site de liaison, nommés σ_1 et σ_2 .^{6,7} Ces sous-types diffèrent, par leur distribution, leur localisation, leur poids moléculaire,⁸ mais aussi par leur sélectivité vis-à-vis des molécules : σ_1 montre une forte affinité et une stéréosélectivité vis-à-vis de la (+)-pentazocine cyclazocine et de la (+)-SKF 10,047, tandis que σ_2 présente une plus forte affinité pour leur isomère (-) (figure 4).⁹

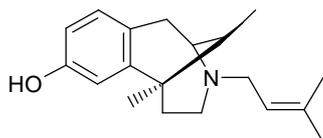


Figure 4 : **(+)-pentazocine**
Agoniste σ_1
IC₅₀ = 7nM

2.1. La protéine σ_1

La protéine σ_1 a été clonée à partir de nombreux tissus, dont le foie de cochon d'inde,¹⁰ des cellules nerveuses humaines,¹¹ le cerveau de rat¹² et de souris.¹³

⁶ Quirion, R.; Bowen, W. D.; Itzhak, Y.; Junien, J. L.; Musacchio, J. M.; Rothman, R. B.; Su, T. P.; Tam, S. W.; Taylor, D. P. *Trend. Pharmacol. Sci.* **1992**, *13*, 85-86. A proposal for the classification of sigma binding sites.

⁷ Hellewell, S. B.; Bowen, W. D. *Brain Res.* **1990**, *527*, 244-253. A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form that of guinea pig brain.

⁸ Torrence-Campbell, C.; Bowen, W. D. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *304*, 201-210. Differential solubilization of rat liver sigma 1 and sigma 2 receptors: retention of sigma 2 sites in particulate fractions.

⁹ Hellewell, S. B.; Bruce, A.; Feinstein, G.; Orringer, J.; Williams, W.; Bowen, W. D. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect.* **1994**, *268*, 9-18. Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling.

¹⁰ Hanner, M.; Moebius, F. F.; Flandarfer, A.; Knaus, H. G.; Striessnig, J.; Kempner, E.; Glossmann, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, *93*, 8072-8077. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site.

¹¹ Prasad, P. D.; Li, H. W.; Fei, Y. J.; Ganapathy, M. E.; Fujita, T.; Plumley, L. H.; Yang-Feny, T. L.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 443-451. Exon-intron structure, analysis of promoter region, and chromosomal localization of the human type 1 sigma receptor gene.

C'est une protéine de 223 acides aminés (Figure 5).¹⁴ Elle possède de fortes homologies de séquences inter-tissus et inter-espèces, avec plus de 90% d'identité entre les différentes protéines σ_1 de mammifère. En revanche, elle ne dispose d'aucune homologie de structure avec les récepteurs aux opiacés et aucune autre protéine de mammifères. Néanmoins, elle partage 30,3% d'identité et 66,4% d'homologie avec la stérol isomérase C8-C7 de levure,¹⁰ sans posséder d'activité enzymatique de stérol isomérase. De plus la structure de la stérol isomérase de mammifère est totalement différente de celle de la protéine σ_1 .¹⁵

	TM I	
rSigma ₁ R	MPWAVGRRWAWITLFLTTIVAVLIQAVWLWLG	(50)
mSigma ₁ R	MPWAAGRRWAWITLILTTI IAVLIQAAWLWLG	(50)
gpSigma ₁ R	MQWAVGRRWLWVALFLAAVAVLTQIVWLWLG	(50)
hSigma ₁ R	MQWAVGRRWAWAALLLAVAAVLTQIVWLWLG	(50)
TM II		
rSigma ₁ R	GLDHELAFSRLIVELRRLHPGHVLPDEELQWVFNAGGWMGAMCLLHASL	(100)
mSigma ₁ R	GLDHELAFSRLIVELRRLHPGHVLPDEELQWVFNAGGWMGAMCILHASL	(100)
gpSigma ₁ R	GLDHELAFSKLIVELRRLHPVHVLPDEELQWVFNAGGWMGAMCLLHASL	(100)
hSigma ₁ R	GLDHELAFSRLIVELRRLHPGHVLPDEELQWVFNAGGWMGAMCLLHASL	(100)
rSigma ₁ R	SEYVLLFGTALGSHGHSGRYWAEISDTIISGTFHQWREGTTKSEVYYPGE	(150)
mSigma ₁ R	SEYVLLFGTALGSHGHSGRYWAEISDTIISGTFHQWKEGTTKSEVFYPGE	(150)
gpSigma ₁ R	SEYVLLFGTALGSPRHSGRYWAEISDTIISGTFHQWREGTTKSEVFYPGE	(150)
hSigma ₁ R	SEYVLLFGTALGSRGHSGRYWAEISDTIISGTFHQWREGTTKSEVFYPGE	(150)
rSigma ₁ R	TVVHGPGEATAVEWGPNTWMVEYGRGVI PSTLAFALSDTIFSTQDFLTLF	(200)
mSigma ₁ R	TVVHGPGEATALEWGPNTWMVEYGRGVI PSTLFFALADTFFSTQDYLTLF	(200)
gpSigma ₁ R	TVVHGPGEATAVEWGPNTWMVEYGRGVI PSTLGFALADTVFSTQDFLTLF	(200)
hSigma ₁ R	TVVHGPGEATAVEWGPNTWMVEYGRGVI PSTLAFALADTVFSTQDFLTLF	(200)
rSigma ₁ R	YTLRAYARGLRLELTTYLFGQDP	(223)
mSigma ₁ R	YTLRAYARGLRLELTTYLFGQDS	93.3% identity (223)
gpSigma ₁ R	YTLRVYARALQLELTTYLFGQDP	93.7% identity (223)
hSigma ₁ R	YTLRVYARGLRLELTTYLFGQDP	96.0% identity (223)

Figure 5 : Structure primaire de la protéine σ_1 .

La séquence d'acides aminés de la protéine σ_1 chez le rat (rsigma₁R) est représentée en alignement avec celle du murin (msigma₁R), celle du cochon d'inde (gpsigma₁R) et celle de l'homme (hsigma₁R). TM I et TM II représentent les séquences possibles transmembranaires.

¹² Seth, P.; Fei, Y. J.; Huang, W.; Leibach, F. H.; Ganapathy, Y. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 922-931. Cloning and functional characterization of a sigma receptor from rat brain.

¹³ Pan, Y. X.; Mei, J. F.; Xu, J.; Wan, B. L.; Zuckerman, A.; Pasternak, G. W. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 2279-2285. Cloning and characterization of a mouse signal receptor.

¹⁴ Mei, J.; Pasternak, G. W. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 349-355. Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma receptor.

¹⁵ Hayashi, T.; Su, T. P. *Life Sciences* **2005**, *77*, 1612-1624. The potential role of sigma-1 receptors in lipid transport and lipid raft reconstitution in brain: Implication for drug abuse.

Mei *et al.*¹⁴ en 2001, ont suggéré que la protéine σ_1 possédait un seul domaine transmembranaire. Aydar *et al.*¹⁶ en 2002, ont comparé les homologies entre ce domaine transmembranaire potentiel et les segments de domaines transmembranaires connus. Ces études suggèrent que la protéine σ_1 aurait deux domaines transmembranaires, avec une boucle extracellulaire de 50 acides aminés et une extrémité C-terminale intracellulaire d'approximativement de 125 acides aminés. D'après ce modèle, l'extrémité N-terminale est très courte et elle est localisée du côté intracellulaire. La figure 6 illustre les deux modèles structuraux qui ont été proposés pour σ_1 .

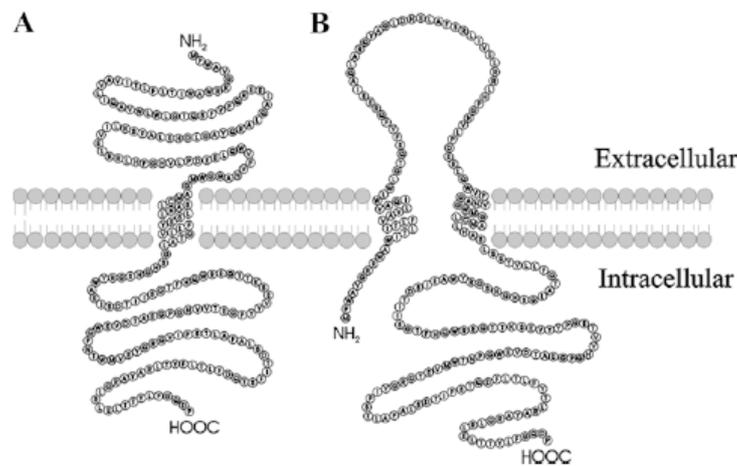


Figure 6: **Modèles structuraux proposés pour σ_1 .**¹⁷
A) 1 domaine transmembranaire, B) 2 domaines transmembranaires

Des études plus récentes¹⁸ ont confirmé et ainsi validé l'existence des deux domaines transmembranaires.

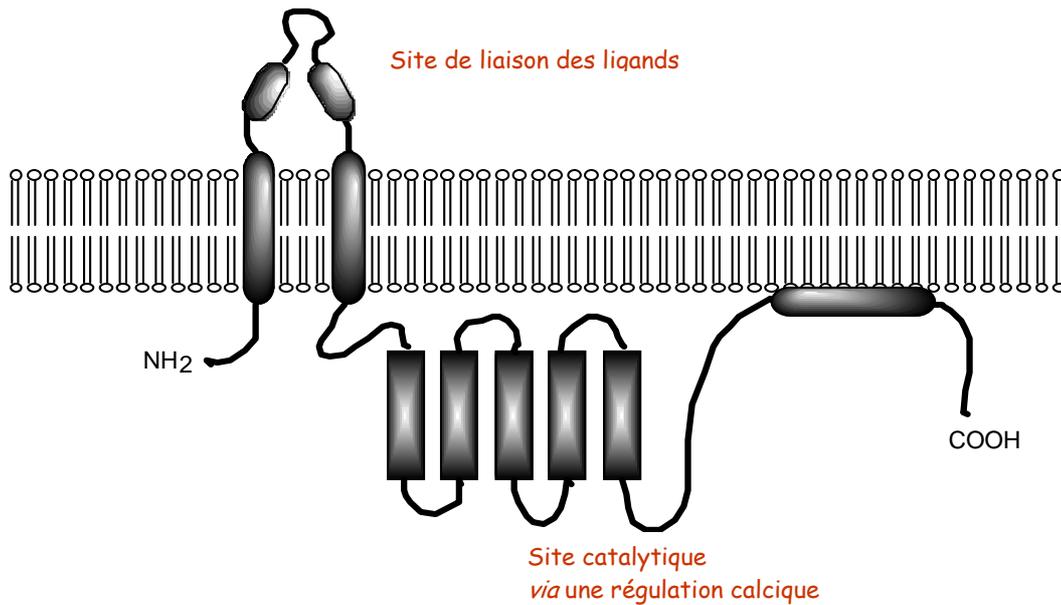
Lors du congrès annuel de la Société Américaine de Neurosciences en 2006, Hayashi *et al* et Bowen *et al*, ont précisé le modèle structural de la protéine σ_1 (figure 7). La boucle extracellulaire de 50 acides aminés correspondrait au site de liaison des ligands et la partie C-terminale intracellulaire contiendrait le site catalytique.¹⁹

¹⁶ Aydar, E.; Palmer, C. P.; Klyachko, V. A.; Jackson, M. B. *Neuron*. **2002**, *34*, 399-410. The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit.

¹⁷ Guitart, X.; Codony, X.; Monroy, X. *Psychopharmacology*, **2004**, *174*, 301-319. Sigma receptors: biology and therapeutic potential.

¹⁸ Duncan, G.; Wang, L. *Experimental Eye Research*, **2005**, *81*, 121-122. Focus on molecules: the Sigma-1 receptor.

¹⁹ Wu, Z.; Bowen, W. D. *J Biol Chem*. **2008**, [Epub ahead of print] Role of sigma-1 receptor C-terminal segment in IP3 receptor activation: Constitutive enhancement of calcium signaling in MCF-7 tumor cells.



(Wu, Peti, Bowen, Soc Neurosci Abstr 2006)

Figure 7 : modèle structural de la protéine σ_1 .

2.2. La protéine σ_2

Le gène de la protéine σ_2 , contrairement à σ_1 , n'a pas été cloné ni complètement caractérisée à ce jour. Elle pourrait correspondre en fait à une famille de sites de nature différente.²⁰

3. Distribution anatomique de la protéine sigma

3.1. Localisation cellulaire

La protéine σ_1 est localisée au niveau de la membrane plasmique, mitochondriale et du réticulum endoplasmique (RE)²¹, ce qui suggère une activation de σ_1 par translocation du RE vers la membrane plasmique ou la membrane nucléaire²².

Différentes études ont suggéré que la protéine σ_2 pourrait également être une protéine intracellulaire située dans les membranes du RE et de la mitochondrie²³.

²⁰ Maurice, T.; Urani, A.; Phan, V. L.; Romieu, P. *Brain Res. Rev.* **2001**, *37*, 116-132. The interaction between neuroactive steroids and the sigma1 receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities.

²¹ Mc Lean, S.; Weber, E. *Neuroscience*, **1988**, *25*, 259-269. Autoradiographic visualization of haloperidol-sensitive sigma receptors in guinea-pig brain.

²² Hayashi, T.; Su, T. P. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 491-496. Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors

²³ Bowen, W. D. *Pharm. Acta. Helv.* **2000**, *74*, 211-218. Sigma receptors: recent advances and new clinical potentials.

3.2. Localisation au niveau central

La distribution anatomique de σ_1 dans le système nerveux central a été très bien caractérisée. La localisation a été visualisée pour la première fois grâce à différents radioligands comme [^3H]-(+)-3-PPP, [^3H](+)-SKF 10,047, [^3H]-DTG ou [^3H]NE-100,^{24,25,26,27} qui ont montré que les sites de liaison σ étaient concentrés dans les structures limbiques, les aires du cerveau antérieur, le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, le noyau accumbens et le noyau thalamique antériodorsal. Récemment, les techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont été utilisées pour étudier la localisation des protéines σ_1 et σ_2 .^{28,29} La protéine σ_1 est concentrée dans les aires limbiques, les couches supérieures du cortex, le septum, l'hypothalamus, le raphé, le noyau thalamique, la substance noire, le locus coeruleus et le cervelet. De plus, des études récentes³⁰ ont confirmé la présence de σ_1 dans les neurones et les oligodendrocytes et démontré leur présence dans les cellules de Schwann. En revanche, peu de régions du cerveau sont enrichies en σ_2 . Seules les aires qui impliquent le contrôle de la posture et du mouvement (striatum, cortex) expriment les sites σ_2 .

3.3. Localisation au niveau périphérique

Au niveau périphérique, la protéine σ_1 est aussi largement distribuée : dans les intestins, le foie, les reins, le cœur et les organes sexuels. De même que pour σ_1 , la protéine σ_2 se situe dans différents organes, comme le foie et les reins, avec une forte densité.¹⁷

²⁴ Samovilova, N. N.; Nagornaya, L. V.; Vinogradov, V. A. *Eur. J. Pharmacol.* **1988**, *147*, 259-264. (+)-[^3H]SKF 10,047 binding sites in rat liver.

²⁵ Largent, B. L.; Gundlach, A. L.; Snyder, S. H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1986**, *238*, 739-748. Pharmacological and autoradiographic discrimination of sigma and phencyclidine receptor binding sites in brain with (+)-[^3H]SKF 10,047, (+)-[^3H]-3-[3-hydroxyphenyl]-N-(1-propyl)piperidine and [^3H]-1-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine.

²⁶ Jansen, K. L. R.; Faull, R. L. M.; Dragunow, M.; Leslie, R. A. *Brain Res.* **1991**, *559*, 172-177. Distribution of excitatory and inhibitory amino acid, sigma, monoamine, catecholamine, acetylcholine, opioid, neurotensin, substance P, adenosine and neuropeptide Y receptors in human motor and somatosensory cortex.

²⁷ Okuyama, S.; Chaki, S.; Yae, T.; Nakazato, A.; Muramatsu, M. *Life Sci.* **1995**, *57*, 333-337. Autoradiographic characterization of binding sites for [^3H]NE-100 in guinea pig brain.

²⁸ Alonso, G.; Phan, V. L.; Guillemain, I.; Saunier, M.; Legrand, A.; Anoa, M.; Maurice, T. *Neuroscience*, **2000**, *97*, 155-170. Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system.

²⁹ Zamanillo, D.; Andreu, F.; Ovalle, S.; Pérez, M. P.; Romero, G.; Farré, A. J.; Guitart, X. *Neurosci. Lett.* **2000**, *282*, 169-172. Up-regulation of sigma(1) receptor mRNA in rat brain by a putative atypical antipsychotic and sigma receptor ligand.

³⁰ Palacios, G.; Muro, A.; Verdu, E.; Pumarola, M.; Vela, J. M. *Brain Res.* **2004**, *1007*, 65-70. Immunohistochemical localization of the sigma1 receptor in Schwann cells of rat sciatic nerve.

4. Ligands du site de liaison sigma

Beaucoup de molécules se lient sur les sites σ , par exemple les benzomorphanes, PCP et ses dérivés, la cocaïne, l'amphétamine, certains neuroleptiques, les antidépresseurs tricycliques, des antipsychotiques atypiques et des anticonvulsivants.²⁰

Malgré l'avance des études sur les sites σ , aucun ligand endogène spécifique de ce site de liaison n'a encore été identifié. Des recherches ont été réalisées sur de nombreux neurotransmetteurs³¹ (la sérotonine, la noradrénaline, la dopamine et l'histamine), acides aminés³² (glutamate, glycine, aspartate et cystéine) et peptides³³ (endorphine, dynorphine, enképhaline), aucun n'interagit avec le site. Les peptides liés au neuropeptide Y, au calcitonin-gene-related peptide (CGRP) et la substance P montrent des interactions effectives *in vivo*, mais sans qu'on puisse les considérer comme ligand endogène.

Beaucoup de stéroïdes neuroactifs ont une interaction avec les sites σ_1 . Les agonistes et antagonistes les plus importants sont, respectivement, la DHEA (figure 8), le sulfate de DHEA et la progestérone (figure 9).³⁴

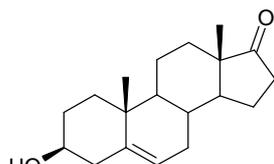


Figure 8: **DHEA**
Agoniste

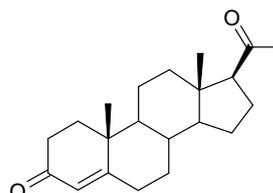


Figure 9: **Progestérone**
Ki = 268nM
Antagoniste

5. Ligands synthétiques et pharmacophores

De nombreuses familles de molécules et une variété de structures chimiques semblent se lier avec une bonne affinité sur le site σ , ce qui rend compliquée l'étude d'un modèle pharmacophorique. Il semblerait que la présence d'un atome d'azote protonable soit un élément pharmacophorique commun pour la plupart des ligands σ (figure 10).

³¹ Weber, E.; Sonders, M.; Quarum, M.; McLaen, S.; Pou, S.; Keana, J. F. W. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83*, 8784-8788. 1,3-Di(2-[5-³H]tolyl)guanidine: a selective ligand that labels sigma-type receptors for psychotomimetic opiates and antipsychotic drugs.

³² Klein, M. D.; Musacchio, J. M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, *251*, 207-215. High affinity dextromethorphan binding sites in guinea pig brain. Effect of sigma ligands and other agents.

³³ DeHaven-Hudkins, D. L.; Fleissner, L. C. *Life Sci.* **1992**, *50*, 65-70. Competitive interactions at [³H]1,3-di(2-tolyl)guanidine (DTG)-defined sigma recognition sites in guinea pig brain.

³⁴ Monnet, F. P.; Maurice, T. *J. Pharmacol. Sci.* **2006**, *100*, 93-118. The sigma1 protein as a target for the non-genomic effects of neuro(active)steroids: molecular, physiological, and behavioral aspects.

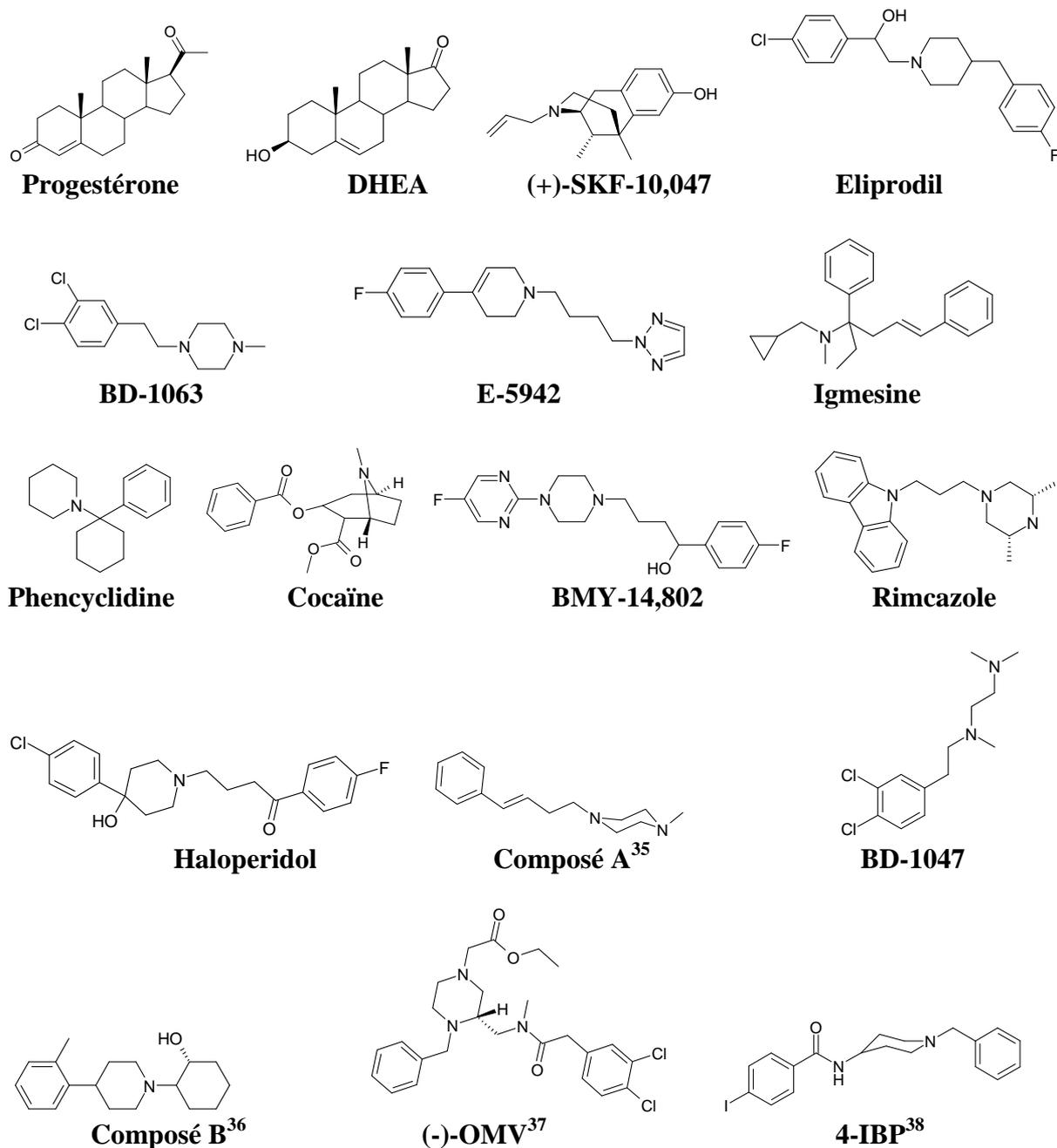


Figure 10 : Ligands de synthèse et naturels du site de liaison σ .

De nombreuses recherches ont tenté de déterminer le pharmacophore de σ . Gilligan *et al*³⁹ ont proposé un modèle triangulaire avec aux sommets un atome d'azote protonable et

³⁵ Glennon, R. G.; Ismaiel, A. M.; Ablordeppey, S.; El-Ashmawy, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2217-220. Thioxanthene-derived analogs as sigma(1) receptor ligands.

³⁶ Shiba, K.; Ogawa, K.; Ishiwata, K.; Yajima, K.; Mori, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2620-2626. Synthesis and binding affinities of methylvesamicol analogs for the acetylcholine transporter and sigma receptor.

³⁷ Bedürftig, S.; Wunsch, B. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 387-396. Synthesis and binding affinities of methylvesamicol analogs for the acetylcholine transporter and sigma receptor.

³⁸ Liu, X.; Mattner, F.; Katsifis, A.; Christie, M.; Kassiou, M. *Med. Chem.* **2005**, *1*, 31-38. Influence of trishomocubanes on sigma receptor binding of N-(1-benzyl-piperidin-4-yl)-4-[123I]iodobenzamide in vivo in the rat brain.

deux groupements hydrophobes dont l'un des deux est un noyau aromatique séparé par un groupement accepteur de liaison hydrogène (figure 11).

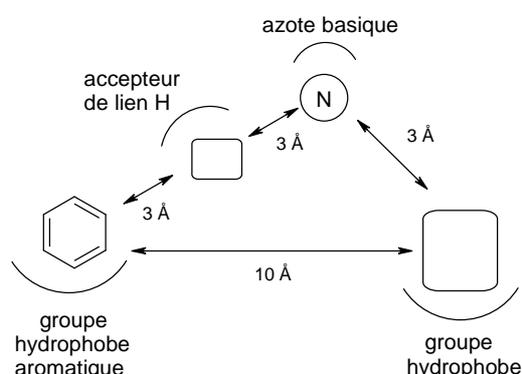


Figure 11 : **Pharmacophore d'après Gilligan *et al.*³⁹**

Plus récemment Ablordeppey, Glennon *et al.*⁴⁰ ont démontré que l'atome d'azote protonable comme par exemple la famille des phénylpiperidines et phénylpiperazines était un élément pharmacophorique principal pour la liaison aux protéines σ . De plus, l'atome d'azote doit séparer deux chaînes, l'une se terminant par un groupement hydrophobe encombré et l'autre par un groupement phényle. Une chaîne pentyle apparaîtrait optimale pour la séparation entre ce groupement phényle et l'atome d'azote.

Glennon⁴¹ a récemment précisé son modèle pharmacophorique. Ces études sont basées sur une approche appelée « déconstruction-construction-élaboration ». A partir de ligands σ déjà connus (benzomorphan, haloperidol, PCP...), possédant des affinités plus ou moins importantes sur ce site, il procède d'abord à une simplification de la structure pour pouvoir isoler les éléments pharmacophoriques essentiels. Puis, il ajoute ou modifie des groupements pour améliorer l'affinité. Un modèle pharmacophorique plus général a ainsi été redéfini (figure 12).

³⁹ Gilligan, P.J.; Cain, G. A.; Christos, T.E.; Cook, L.; Drummond, S.; Johnson, A. L.; Kergaye ; A. A., McElroy, J. F.; Rohrbach, K. W.; Schmidt, W. K. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4344-4361. Novel piperidine sigma receptor ligands as potential antipsychotic drugs.

⁴⁰ Ablordeppey, S. Y.; Fisher, J. B.; Law, H.; Glennon, R. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2759-2765. Probing the proposed phenyl-A region of the sigma-1 receptor.

⁴¹ Glennon, R. A. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, **2005**, *5*, 927-940. Pharmacophore identification for sigma-1 (σ_1) receptor binding: application of the "deconstruction-reconstruction-elaboration" approach.

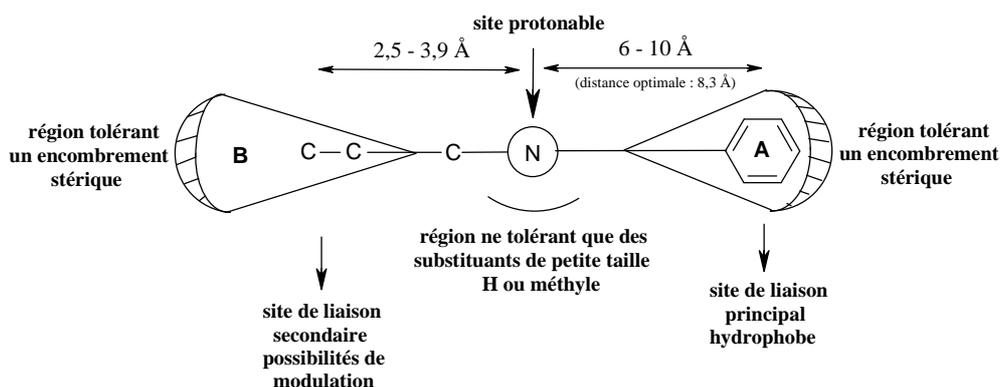


Figure 12 : **Pharmacophore d'après Glennon.**⁴¹

Le groupement aryle B, ne semble pas indispensable. L'atome d'azote protonable reste nécessaire pour la liaison avec σ_1 . La chaîne pentyle entre l'atome d'azote protonable et le groupement hydrophobe A semble être la longueur optimale.

Malheureusement, le rôle majeur de l'atome d'azote est terni par le fait que les stéroïdes, n'ayant aucun atome d'azote basique, se lient avec une forte affinité sur σ . Il semblerait néanmoins que ces stéroïdes se lieraient d'une toute autre manière sur σ . Toutefois, dans la structure de la plupart des ligands σ , la présence d'un atome d'azote protonable reste importante dans la liaison aux protéines.

6. Mode de transduction

Beaucoup de récepteurs aux neurotransmetteurs sont couplés à des protéines G. Ces protéines G jouent un rôle important dans la modulation du signal de transduction.

Certaines études ont suggéré un rôle des protéines G dans l'activation de σ_1 .^{42,43} D'autres recherches ont démontré qu'il n'y avait pas de couplage direct entre σ_1 et la protéine G ou alors de façon très particulière.⁴⁴ En effet, les paramètres de liaison des agonistes σ_1 n'étaient pas altérés par un traitement au GTP γ S.

La protéine σ_1 modulerait³⁰ directement la mobilisation intracellulaire du calcium. Hayashi et Su²² ont montré que la protéine σ_1 formerait un complexe hétérotrimérique avec le récepteur à l'inositol triphosphate (IP₃) du RE par l'intermédiaire d'une protéine d'accroche l'ankyrine B. Il se délocaliserait, après activation, sous la forme d'un complexe dimérique avec l'ankyrine vers les membranes plasmiques ou nucléaires, ce qui conduirait à une

⁴² Connick, J. H.; Hanlon, G.; Roberts, J.; France, L.; Fox, P. K.; Nicholson, C. D. *Br. J. Pharmacol.* **1992**, *107*, 726-731. Multiple sigma binding sites in guinea-pig and rat brain membranes: G-protein interactions.

⁴³ Maruo, J.; Yoshida, A.; Shimohira, I.; Matsuno, K.; Mita, S.; Ueda, H. *Life Sci.* **2000**, *67*, 599-603. Binding of [³⁵S]GTP γ S stimulated by (+)-pentazocine sigma receptor agonist, is abundant in the guinea pig spleen.

⁴⁴ Hong, W.; Werling, L. L. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *408*, 117-125. Evidence that the sigma(1) receptor is not directly coupled to G proteins.

augmentation d'affinité de l'IP₃ pour son récepteur (figure 13). Les agonistes σ_1 faciliteraient ainsi l'activation du récepteur IP₃ et donc l'efficacité de la mobilisation calcique à travers ce récepteur. Les antagonistes ne dissocieraient que la protéine σ_1 , prévenant ainsi un effet futur des agonistes. La protéine σ_1 modulerait par ce mécanisme l'homéostasie calcique neuronale.^{22,15, 45}

De plus, σ_1 s'associerait lors de la délocalisation à des gouttelettes lipidiques, pour fusionner avec des rafts lipidiques qui entraîneraient des modifications de leur composition.^{22,34}

Cette dualité de fonctionnement participe à la modulation de la réponse des neurotransmetteurs.

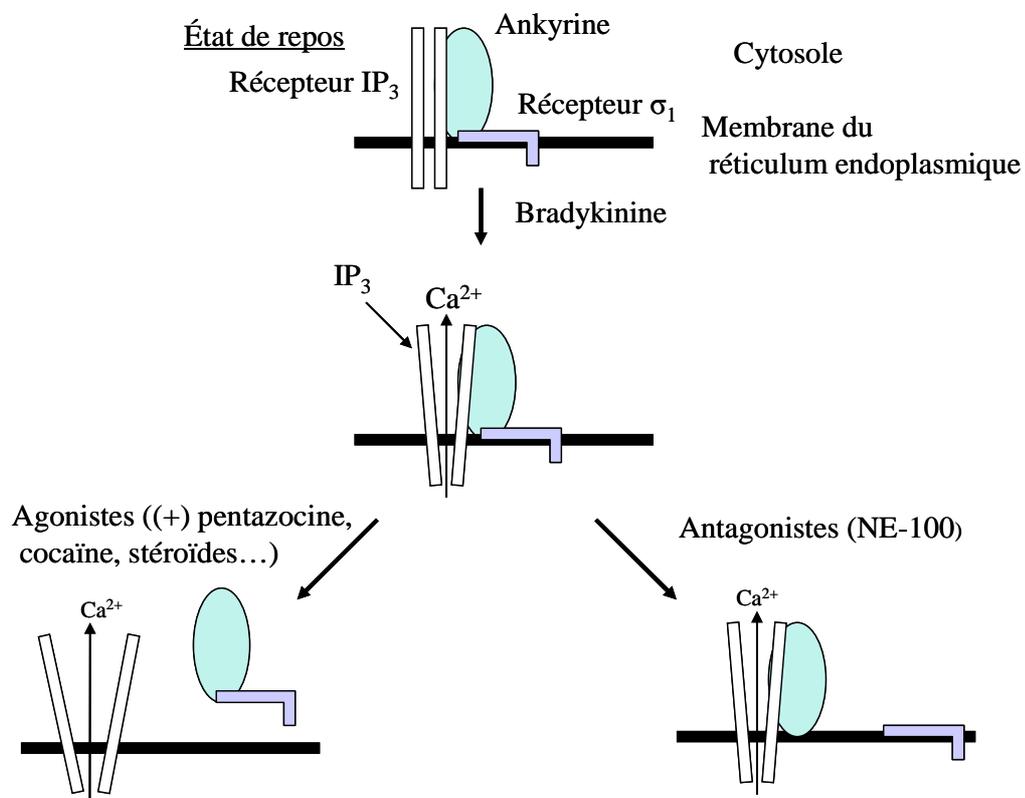


Figure 13: Mode de transduction de la protéine σ_1 .²²

Cette même équipe⁴⁶ a récemment montré que la protéine σ_1 serait aussi localisée sur MAM (mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes) et aurait une activité chaperonne.

⁴⁵Hayashi, T.; Su, T. P. *J. Pharmacol. Exp. Ther. U.S.A.* **2003**, *306*, 718-725. σ -1 Receptors (σ 1 Binding Sites) Form Raft-Like Microdomains and Target Lipid Droplets on the Endoplasmic Reticulum: Roles in Endoplasmic Reticulum Lipid Compartmentalization and Export.

⁴⁶ Hayashi, T.; Su, T. P. *Cell*. **2007**, *131*, 896-910. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival.

En effet, le RE contrôle l'homéostasie calcique. Il fournit directement le calcium à la mitochondrie via les récepteurs à l'IP₃ situés sur la membrane en contact avec ces deux organelles : MAM. La mitochondrie agit ainsi comme un régulateur du signal calcique. La protéine σ_1 aussi située sur MAM, formerait un complexe avec une autre protéine chaperonne Bip (Grp78). Sous l'action d'un agoniste σ_1 ou sous l'effet d'un stress du réticulum, la protéine σ_1 se dissocierait de Bip. Cette dissociation augmenterait la liaison de σ_1 avec le récepteur à l'IP₃, permettant sa stabilisation sur MAM, prolongeant ainsi le signal calcique dans la mitochondrie et donc le contrôle de l'homéostasie calcique.

En conclusion, la protéine σ_1 contrôlerait la libération du calcium au niveau du récepteur à l'IP₃ mais aussi la communication calcique entre la mitochondrie et le RE. Elle régule le stress du réticulum par son interaction avec Bip et contrôle la dynamique membranaire par sa translocation dans les rafts lipidiques. Tous ces mécanismes sont liés entre eux.

7. Rôle de la protéine sigma

La protéine σ_1 du SNC est décrite pour moduler la transmission des neurotransmetteurs comme la noradrénaline, la dopamine, la sérotonine, l'acétylcholine, le glutamate régulant le fonctionnement des récepteurs NMDA et des récepteurs aux opiacés.³³ Grâce à cette modulation, elle serait impliquée dans certaines fonctions ou troubles dont l'origine est une dérégulation de ces neurotransmetteurs. En conséquence, elle affecterait certaines fonctions comme la nociception, la dépendance à la cocaïne, les troubles mnésiques, l'épilepsie par le biais des récepteurs aux opiacé, dopaminergique, NMDA, cholinergique et sérotoninergique et permettrait des effets neuroprotecteurs. Elle serait aussi impliquée dans beaucoup de comportements en relation avec le désordre neuropsychiatrique et neurologique comme la schizophrénie, la dépression, l'anxiété par le biais des récepteurs dopaminergique, NMDA et sérotoninergique. De plus la protéine σ_1 serait surexprimée dans les cellules tumorales, résultant une implication possible dans le traitement du cancer. Le rôle de σ_1 est résumé dans la figure 14 ci-dessous. Chaque rôle et pathologie seront expliqués plus en détails dans les paragraphes suivants.

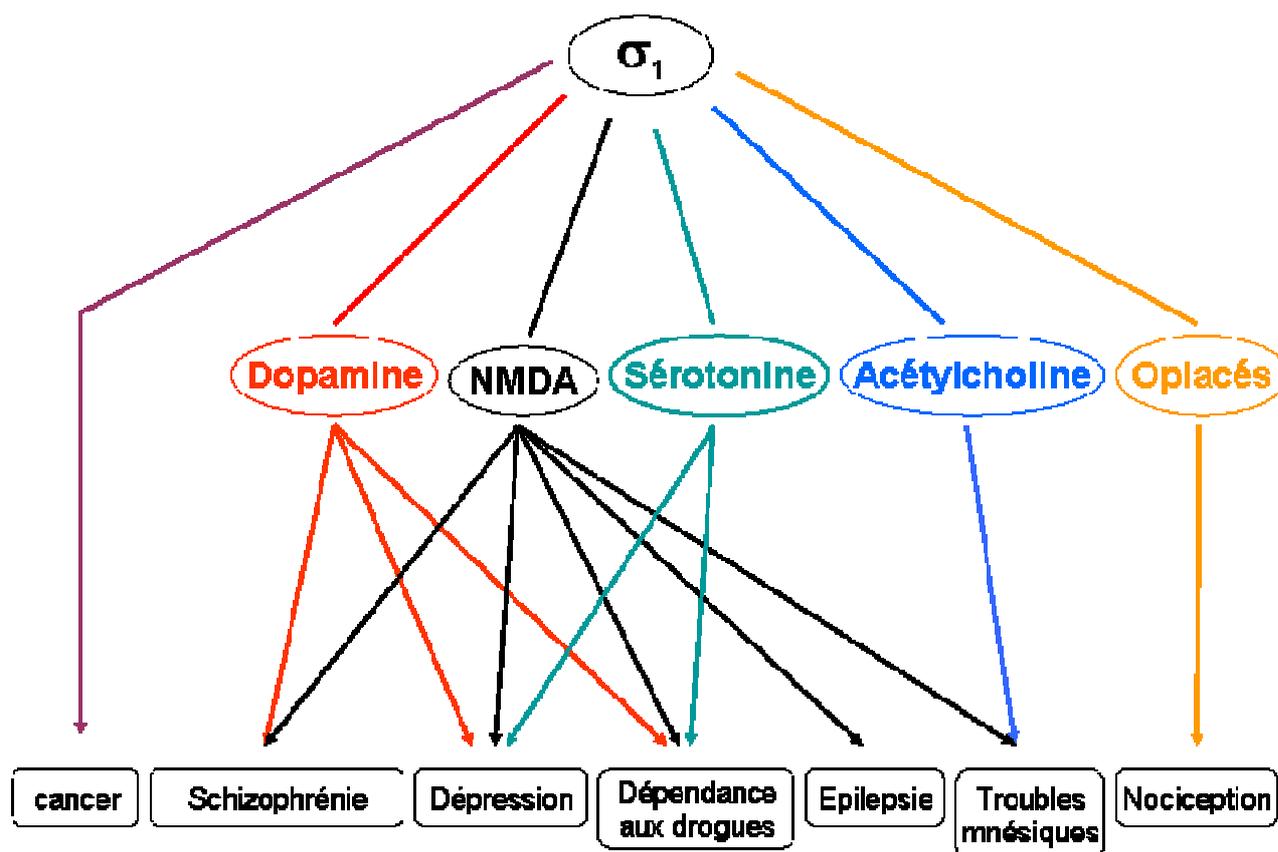


Figure 14 : Rôle de la protéine σ_1 .

La protéine σ_2 est impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire. Elle possède la capacité d'induire une voie apoptotique sur des lignées de cellules cancéreuses. Les ligands de ce site auraient donc une application dans le traitement du cancer.³³

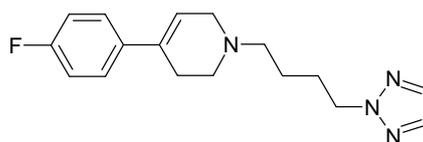
7.1. La dépendance aux drogues

Des recherches ont montré que les récepteurs σ_1 modèleraient les effets toxiques induits par la cocaïne. Nous les développerons plus amplement dans le chapitre II. « La protéine σ_1 et la cocaïne ».

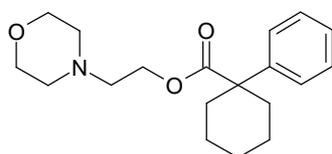
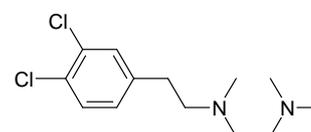
Le rôle de σ_1 dans les effets induits par d'autres drogues psychostimulantes a été aussi proposé. Des antagonistes, comme E-5842 (figure 15), ont montré qu'ils bloquaient partiellement la stimulation de la motilité induite par l'amphétamine.^{47,48}

⁴⁷ Clissold, D. B.; Pontecorvo, M. J.; Jones, B. E.; Abreu, M. E.; Karbon, E. W.; Erikson, R. H.; Natalie, K. J.; Borosky, S.; Hartman, T.; Mansbach, R. S.; Balster, R. L.; Ferkany, J. W.; Enna, S. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, 265, 876-886. NPC 16377, a potent and selective sigma-ligand. II. Behavioral and neuroprotective profile.

⁴⁸ Guitart, X.; Farré, A. J. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, 363, 127-130. The effect of E-5842, a sigma receptor ligand and potential atypical antipsychotic, on Fos expression in rat forebrain.

Figure 15: **E-5842****IC₅₀ = 5nM****Antagoniste σ_1**

Maurice *et al*⁴⁹ ont montré que les effets motivationnels de l'alcool, mesurés chez les souris par conditionnement de préférence de place (CPP) et par mesure de l'activité locomotrice, sont régulés par les ligands σ_1 . En effet, l'agoniste σ_1 PRE-084 (figure 16) potentialise, tandis que l'antagoniste BD-1047 (figure 17) inhibe, les différents comportements induits par une administration accrue d'alcool.

Figure 16 : **PRE-084****IC₅₀ = 44nM****Agoniste**Figure 17: **BD-1047****IC₅₀ = 36nM****Antagoniste σ_1**

Plus récemment, ils ont démontré que le traitement avec des agonistes et antagonistes corrigeait l'habituation progressive aux objets dans le test d'exploration d'objets, lors d'une consommation chronique d'alcool (CCA).⁵⁰ Mais seul le traitement avec des agonistes comme l'igmesine, molécule développée par Pfizer (figure 18), restaure une réponse correcte au changement spatial d'un objet ou à l'introduction d'un nouvel objet. Ainsi, lors de l'introduction de ce nouvel objet, les souris CCA interagissent fortement et indifféremment avec celui-ci et les objets connus. Les souris traitées avec l'igmesine interagissent préférentiellement avec le nouvel objet montrant ainsi une réaction correcte face à un nouvel objet. Or les souris traitées avec un antagoniste (BD-1047) montrent une diminution d'interaction avec tous les objets, suggérant ainsi un déficit de mémoire qui perdure.

⁴⁹ Maurice, T.; Casalino, M.; Lacroix, M.; Romieu, P. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, *74*, 869-876. Involvement of the sigma 1 receptor in the motivational effects of ethanol in mice.

⁵⁰ Meunier, J.; Demeilliers, B.; Célérier, A.; Maurice, T. *Behav. Brain Res.* **2006**, *166*, 166-176. Compensatory effect by sigma1 (sigma1) receptor stimulation during alcohol withdrawal in mice performing an object recognition task.

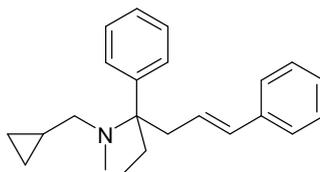


Figure 18: **JO-1724 Igmesine**
IC₅₀ = 39nM
Agoniste σ_1

7.2. La schizophrénie

La schizophrénie est une maladie caractérisée par un sérieux désordre du SNC : perturbation de l'humeur, des pensées, du comportement, de la conscience de soi et des relations avec le monde extérieur. Il existe deux types de symptôme dans cette maladie : les symptômes positifs (hallucinations, psychose, paranoïa, troubles du comportement) et les symptômes négatifs (perte d'énergie, perte d'initiative, désociabilisation). Les antagonistes des récepteurs dopaminergiques D2, meilleurs agents thérapeutiques pour le traitement de la schizophrénie, sont efficaces dans l'amélioration des symptômes positifs. Par contre, ils ne le sont pas suffisamment dans l'amélioration des symptômes négatifs. De plus, ils induisent des effets extrapyramidaux. Ces effets extrapyramidaux se manifestent par des contractions involontaires des muscles, entraînant une raideur et une position crispée. Ils se manifestent aussi par des mouvements involontaires que l'on retrouve régulièrement et typiquement chez la personne parkinsonienne. Ils affectent certains muscles et s'expriment par des mouvements brutaux, rapides, désordonnés et des mouvements à l'inverse lents, non coordonnés. Lors de ces syndromes, des mouvements masticatoires anormaux sont plus fréquemment observés.

En conséquence, il existe un besoin de rechercher de nouveaux agents antipsychotiques avec un mécanisme différent, une meilleure efficacité et tolérabilité. Parmi ces nouveaux agents, les récepteurs σ_1 seraient une nouvelle cible thérapeutique pour le développement de composés à propriétés antipsychotiques. Cette hypothèse d'utilisation des récepteurs σ_1 comme traitement de la schizophrénie proviendrait du fait que (+)-SKF-10,047 possède des effets psychomimétiques et que beaucoup de neuroleptiques ont une forte affinité pour les sites σ_1 ⁵¹.

En plus du rôle joué par le système central dopaminergique, il est important de considérer le système glutamatergique. En effet, PCP, un agent bloqueur du canal du récepteur NMDA, peut induire chez l'homme une psychose comme la schizophrénie.

⁵¹ Gilligan, P. J.; Tam, S. W. *Drug News Perspect.* **1994**, 7, 13-18. Sigma receptor ligands: Potential drugs for the treatment of CNS disorders?

La protéine σ_1 interagirait ou modulerait la fonction des récepteurs glutamatergiques. NE-100 (figure 19), agent potentiellement antipsychotique, possède une grande affinité pour σ_1 et une faible interaction avec σ_2 , les récepteurs dopaminergiques, sérotoninergiques, et PCP.⁵² Il antagonise les effets comportementaux de PCP et comme l'halopéridol (figure 20) et le rimcazole (figure 21), il possède des propriétés antipsychotiques.⁵³

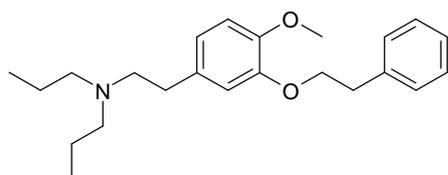


Figure 19: **NE-100**
IC₅₀ = 1,6nM
Antagoniste σ_1

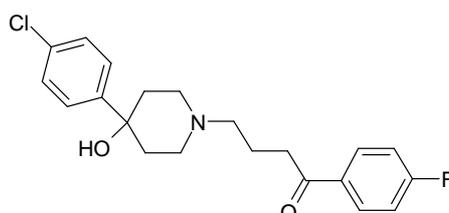


Figure 20: **Halopéridol**
IC₅₀ = 23nM
Antagoniste σ_1

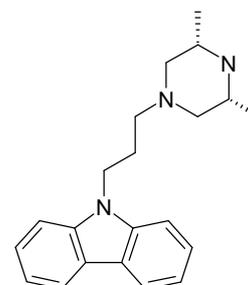


Figure 21: **Rimcazole**
IC₅₀ = 50nM
Antagoniste σ_1

En conclusion, par modulation du système dopaminergique et par régulation des récepteurs NMDA, les récepteurs σ_1 seraient donc impliqués dans la physiopathologie et/ou dans le traitement de la schizophrénie.

7.3. L'apprentissage de la mémoire

Les agonistes σ_1 augmentent la libération d'acétylcholine dans l'hippocampe et le cortex frontal.⁵⁴ Ils auraient donc un effet bénéfique sur plusieurs modèles d'amnésie.⁵⁵ SA-4503 (figure 22) et l'igmesine (figure 18), agonistes sélectifs de σ_1 , atténueraient l'altération de l'apprentissage chez l'animal possédant un dysfonctionnement cholinergique induit par la scopolamine (figure 23).^{20,56} Ils montreraient aussi des effets anti-amnésiques produits par un blocage des récepteurs NMDA. En effet, ils inverseraient l'amnésie produite par la dizocilpine, antagoniste des récepteurs NMDA (figure 24).⁵⁰

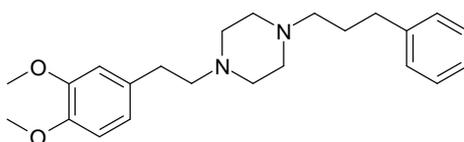
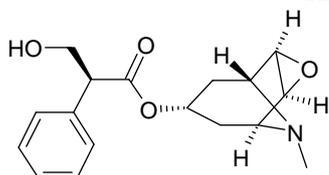
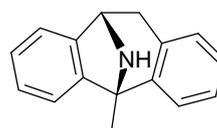
⁵² Chaki, S.; Tanaka, M.; Muramatsu, M.; Otomo, S. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *251*, 1-2. NE-100, a novel potent sigma ligand, preferentially binds to sigma 1 binding sites in guinea pig brain.

⁵³ Itzhak, Y.; Stein, I. *Life sci.* **1990**, *47*, 1073-1081. Sigma binding sites in the brain, an emerging concept for multiple sites and their relevance for psychiatric disorders.

⁵⁴ Matsuno, K.; Senda, T.; Kobayashi, T.; Mita, S. *Brain Res.* **1995**, *690*, 200-206. Involvement of sigma 1 receptor in (+)-N-allylnormetazocine-stimulated hippocampal cholinergic functions in rats.

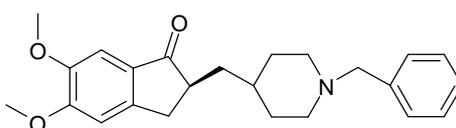
⁵⁵ Earley, B.; Burke, M.; Leonard, B. E.; Gouret, C. J.; Junien, J. L. *Brain Res.* **1991**, *546*, 282-286. Evidence for an anti-amnesic effect of JO 1784 in the rat: a potent and selective ligand for the sigma receptor.

⁵⁶ Senda, T.; Matsuno, K.; Okamoto, K.; Kobayashi, T.; Nakata, K. M.; Mita, S. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1998**, *59*, 129-134. Ameliorative effect of SA4503, a novel cognitive enhancer, on the basal forebrain lesion-induced impairment of the spatial learning performance in rats.

Figure 22: **SA-4503****IC₅₀ = 17nM****Agoniste σ_1** Figure 23: **Scopolamine**Figure 24: **Dizocilpine**

Les stéroïdes neuroactifs joueraient un rôle aussi dans la modulation de la mémoire par σ_1 . La prégnenolone et la DHEA, ayant une affinité significative pour σ_1 , présentent des effets anti-amnésiants chez les souris possédant une altération de l'apprentissage.⁵⁷

De plus, le donepezil (figure 25), médicament contre la maladie d'Alzheimer et commercialisé sous le nom d'Aricept, aurait une action anti-amnésiante grâce à sa liaison avec σ_1 .^{58,59} Il agit comme un inhibiteur d'acétylcholinestérase, mais il se lie aussi sur la protéine σ_1 avec une forte affinité (IC₅₀= 14,6 nM). Les effets anti-amnésiants produits par le donepezil contre l'altération de l'apprentissage induit par la dizocilpine ou le peptide β_{25-35} -amyloïde sont bloqués par l'administration d'un antagoniste σ_1 , le BD-1047, ou par un traitement aux oligodéoxynucléotides antisens ciblant la protéine σ_1 .

Figure 25 : **Donepezil****IC₅₀ = 14,6nM****Agoniste σ_1**

⁵⁷ Maurice, T.; Lockhart, B. P. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **1997**, *21*, 69-102.

Neuroprotective and anti-amnesic potentials of sigma (sigma) receptor ligands.

⁵⁸ Maurice, T.; Meunier, J.; Feng, B.; Ieni, J.; Monaghan, D. T. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *317*, 1307-1319. Interaction with sigma(1) protein, but not N-methyl-D-aspartate receptor, is involved in the pharmacological activity of donepezil.

⁵⁹ Meunier, J.; Ieni, J.; Maurice, T. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *317*, 606-614. Antiamnesic and neuroprotective effects of donepezil against learning impairments induced in mice by exposure to carbon monoxide gas.

Les agonistes des récepteurs σ_1 auraient donc une implication dans l'apprentissage de la mémoire par leur modulation avec les récepteurs à l'acétylcholine et NMDA.

7.4. L'anxiété et la dépression

Les récepteurs σ_1 sont connus pour moduler les systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques dans le cerveau. De plus, il a été démontré qu'une substance capable de réduire la neurotransmission au niveau du système NMDA peut représenter une nouvelle classe d'antidépresseurs.⁶⁰ Or les récepteurs σ_1 sont connus aussi pour réguler les récepteurs NMDA. Donc les ligands σ_1 auraient une implication dans le traitement de la dépression. La (+)-pentazocine (figure 26), (+)-SKF-10,047 et SA-4503, des agonistes, diminuent la durée d'immobilisation dans le test de la nage forcée et de la queue en suspension,^{61,62} deux techniques largement utilisées pour mesurer l'activité antidépressive de nouvelles molécules. SA-4503 présente aussi des effets sur les symptômes dépressifs comme l'agitation, la perte d'intérêt qui sont modulés par les récepteurs NMDA via les récepteurs σ_1 .⁶³ L'igmesine montre une activité antidépressive sur les modèles animaux en pré-clinique.⁶⁴ Cette activité a été aussi observée cliniquement, démontrant une amélioration significative chez les patients sévèrement dépressifs.⁶⁵

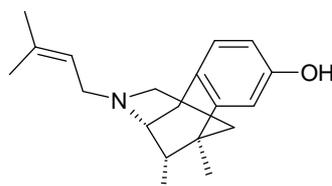


Figure 26: (+)-pentazocine
 $IC_{50} = 5,8nM$
 Agoniste σ_1

⁶⁰ Trullas, R.; Skolnick, P. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, *185*, 1-10. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions.

⁶¹ Ukai, M.; Maeda, H.; Nanya, Y.; Kameyama, T.; Matsuno, K. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1998**, *61*, 247-252. Beneficial effects of acute and repeated administrations of sigma receptor agonists on behavioral despair in mice exposed to tail suspension.

⁶² Urani, A.; Roman, F. J.; Phan, V. L.; Su, T. P.; Maurice, T. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *298*, 1269-1279. The antidepressant-like effect induced by sigma(1)-receptor agonists and neuroactive steroids in mice submitted to the forced swimming test.

⁶³ Wang, D.; Noda, Y.; Tsunekawa, H.; Zhou, Y.; Miyazaki, M.; Senzaki, K.; Nitta, A.; Nabeshima, T. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *322*, 1305-1314. Role of N-methyl-D-aspartate receptors in antidepressant-like effects of sigma 1 receptor agonist 1-(3,4-dimethoxyphenethyl)-4-(3-phenylpropyl)piperazine dihydrochloride (SA-4503) in olfactory bulbectomized rats.

⁶⁴ Urani, A.; Romieu, P.; Portales-Casamar, E.; Roman, F. J.; Maurice, T. *Psychopharmacology*, **2002**, *163*, 26-35. The antidepressant-like effect induced by the sigma(1) (sigma(1)) receptor agonist igmesine involves modulation of intracellular calcium mobilization.

⁶⁵ Akunne, H. C.; Zoski, K. T.; Whetzel, S. Z.; Cordon, J. J.; Brandon, R. M.; Roman, F.; Pugsley, T. A. *Neuropsychopharmacology*, **2001**, *41*, 138-149. Neuropharmacological profile of a selective sigma ligand, igmesine: a potential antidepressant.

7.5. La douleur

Les récepteurs σ_1 seraient impliqués dans la modulation de l'analgésie des opioïdes. Les antagonistes comme l'halopéridol, n'ont pas d'effet antidouleur quand ils sont administrés seuls, par contre, ils potentialisent la réponse analgésique de la morphine⁶⁶ et d'autres ligands des récepteurs aux opiacés kappa.⁶⁷

7.6. Le cancer

Les protéines σ_1 et σ_2 sont surexprimées dans les cellules tumorales de tissus humains variés, comme les carcinomes de poumons, de rein, de colon, les tumeurs du cerveau, le cancer du sein et de la prostate⁶⁸, plus particulièrement dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 du cancer du sein et PC-3 du cancer de la prostate.⁶⁹ Des études^{70,71} ont montré que des antagonistes σ_1 , comme le Rimcazole,⁷¹ induiraient l'apoptose sur des lignées de cellules tumorales.

L'administration⁷² de cocaïne ou PRE-084 (figure 11), agoniste σ_1 , provoque l'accroissement des tumeurs accompagné par une augmentation de IL-10 et une diminution de production de IFN- γ . La cocaïne, par σ , module donc la balance Th1 et Th2 supprimant ainsi la réponse antitumorale et entraînant une croissance de la cellule tumorale. Ces effets peuvent être stoppés par l'administration d'un anticorps spécifique de IL-10 ou par administration d'un antagoniste σ_1 .

Les récepteurs σ_1 joueraient donc un rôle dans les propriétés métastatiques sur des lignées cellulaires du cancer du sein.⁶⁹ L'observation des effets sur l'adhésion et la prolifération de lignées de cellules tumorales pourrait s'expliquer par le fait que les récepteurs σ_1 causeraient un remodellement des rafts lipidiques. Or beaucoup de molécules impliquées

⁶⁶ Mei, J.; Pasternak, G. W. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *300*, 1070-1074. Sigma1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse.

⁶⁷ Prezzavento, O.; Parenti, C.; Marrazzo, A.; Ronsisvalle, S.; Vittorio, F.; Aricò, G.; Scoto, G. M.; Ronsisvalle G. *Life Sci.* **2008**, *82*, 549-543. A new sigma ligand, (+/-)-PPCC, antagonizes kappa opioid receptor-mediated antinociceptive effect.

⁶⁸ Aydar, E.; Palmer, C. P.; Djamgoz, M. B. A. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5029-5035. Sigma receptors and cancer: possible involvement of ion channels.

⁶⁹ Aydar, E.; Onganer, P.; Perrett, R.; Djamgoz, M. B.; Palmer, C. P. *Cancer Lett.* **2006**, *242*, 245-257. The expression and functional characterization of sigma (sigma) 1 receptors in breast cancer cell lines.

⁷⁰ Spruce, B. A.; Campbell, L. A.; McTavish, N.; Cooper, M. A.; Appleyard, M. V.; O'Neill, M.; Howie, J.; Samson, J.; Watt, S.; Murray, K.; McLean, D.; Leslie, N. R.; Safrany, S. T.; Ferguson, M. J.; Peters, J. A.; Prescott, A. R.; Box, G.; Hayes, A.; Nutley, B.; Raynaud, F.; Downes, C. P.; Lambert, J. J.; Thompson, A. M.; Eccles, S. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4875-86. Small molecule antagonists of the sigma-1 receptor cause selective release of the death program in tumor and self-reliant cells and inhibit tumor growth in vitro and in vivo.

⁷¹ Achison, M.; Boylan, M. T.; Hupp, T. R.; Spruce, B. A. *Oncogene* **2006**, *26*, 11367-1146. HIF-1alpha contributes to tumour-selective killing by the sigma receptor antagonist rimcazole.

⁷² Gardner, B.; Zhu, L. X.; Roth, M. D.; Tashkin, D. P.; Dubinett, S. M.; Sharma, S. *J. Neuroimmunology*, **2004**, *147*, 95-98. Cocaine modulates cytokine and enhances tumor growth through sigma receptors.

dans ces effets sont présents dans ces rafts (comme les intégrines, les canaux ioniques, les récepteurs EGF). Par la modulation de ces rafts lipidiques, les récepteurs σ_1 affecteraient donc l'adhésion et la prolifération cellulaire.

SR31747A (figure 27) est un ligand sélectif des récepteurs σ_1 ayant une activité d'immunorégulation et d'inhibition de la prolifération cellulaire. Il est actuellement évalué en phase II pour le traitement du cancer de la prostate.⁷³

De plus, de nombreuses études pré-cliniques ont évalué l'utilité potentielle des radioligands des protéines σ comme agents de diagnostic des cancers de la prostate⁷⁴ et du sein.⁷⁵ Enfin, Bowen *et al*⁷⁶ ont démontré la capacité des ligands de σ_2 à induire l'apoptose sur les lignées de cellules cancéreuses du sein.

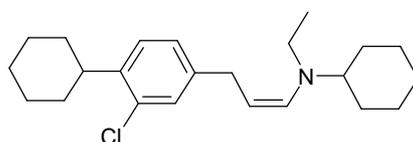


Figure 27 : **SR31747A**

7.7. L'épilepsie

La protéine σ_1 serait aussi impliquée dans l'épilepsie. Les agonistes σ_1 seraient des agents potentiellement anticonvulsivants.⁷⁷ En effet, le dextrométhorphan (figure 28) par sa liaison avec σ_1 , empêcherait les convulsions induites par le TMT (triméthylétain).⁷⁸

⁷³ Casellas, P.; Galiege, S. Bourrie, B.; Ferrini, J. B.; Jbilo, O.; Vidal, H. *Anticancer Drugs*, **2004**, *15*, 113-8. SR31747A: a peripheral sigma ligand with potent antitumor activities.

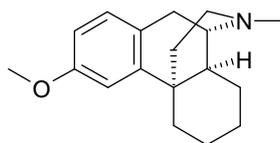
⁷⁴ John, C. S.; Gulden, M. E.; Li, J.; Bowen, W. D.; McAfee, J. G. Thakur, M. L. *Nucl. Med. Biol.* **1998**, *25*, 189-194. Synthesis, in vitro binding, and tissue distribution of radioiodinated 2-[125I]N-(N-benzylpiperidin-4-yl)-2-iodo benzamide, 2-[125I]BP: a potential sigma receptor marker for human prostate tumors.

⁷⁵ Caveliers, V.; Everaert, H.; John, C. S.; Lahoutte, T.; Bossuyt, A. *J. Nucl. Med.* **2002**, *43*, 1647-1649. Sigma receptor scintigraphy with N-[2-(1'-piperidiny)ethyl]-3-(123I)-iodo-4-methoxybenzamide of patients with suspected primary breast cancer: first clinical results.

⁷⁶ Gebreselassie, D.; Bowen, W. D. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *493*, 19-28. Sigma-2 receptors are specifically localized to lipid rafts in rat liver membranes.

⁷⁷ Meurs, A.; Clinckers, R.; Ebinger, G.; Michotte, Y.; Smolders, I. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, *11*, 3079-3092. Sigma 1 receptor-mediated increase in hippocampal extracellular dopamine contributes to the mechanism of the anticonvulsant action of neuropeptide Y.

⁷⁸ Shin, E. J.; Nah, S. Y.; Chae, J. S.; Bing, G.; Shin, S. W.; Yen, T. P.; Baek, I. H.; Kim, W. K.; Maurice, T.; Nabeshima, T.; Kim, H. C. *Neurochem. Int.* **2007**, *50*, 791-799. Dextromethorphan attenuates trimethyltin-induced neurotoxicity via sigma1 receptor activation in rats.

Figure 28 : **Dextrométhorphane****Agoniste σ_1** **Ki = 348nM**

7.8. L'ischémie

Les récepteurs σ_1 sont connus pour être impliqués dans le processus de neuroprotection depuis que beaucoup de leurs ligands ont montré des effets cytoprotecteurs sur plusieurs modèles d'ischémie cérébrale. Le mécanisme de ces effets protecteurs reste inconnu actuellement.⁷⁹

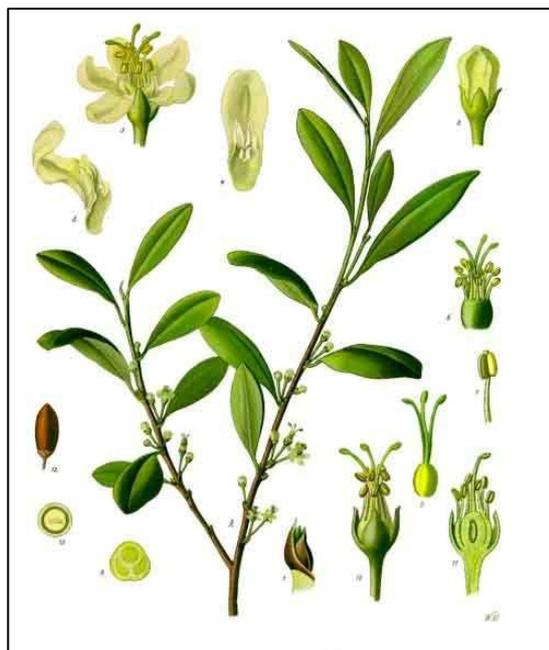
II. La protéine σ_1 et la cocaïne

1. La cocaïne

1.1. Historique

La cocaïne est un alcaloïde extrait des feuilles de cocaïer. Ce dernier est un arbrisseau cultivé en Amérique du Sud, en Indonésie et dans l'est africain. La cocaïne se présente sous la forme d'une fine poudre blanche.

Dans les sociétés précolombiennes, la coca servait de plante médicinale, de drogue stimulante, d'objet rituel et de taxe d'imposition. Dans les pays andins, les feuilles de coca sont consommées sous forme d'une chique que l'on mastique pendant quelques heures. L'appareil digestif est anesthésié : l'usager ne ressent plus la faim. Certains ont vu dans cette pratique une manière de se protéger du froid de l'altitude.



⁷⁹ Klouz, A.; Saïd, D. B.; Ferchichi, H.; Kourda, N.; Ouanes, L.; Lakhal, M.; Tillement, J. P.; Morin, D. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, 578, 292-299. Protection of cellular and mitochondrial functions against liver ischemia by N-benzyl-N'-(2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzyl)-piperazine (BHDP), a sigma1 ligand.

En 1865, un chimiste autrichien élucide la formule brute de la cocaïne (figure 29). Dix ans plus tard, des dérivés de la cocaïne sont utilisés pour les anesthésies locales. Dès 1880 aux États-Unis, la cocaïne devient populaire. Elle est administrée comme tonique.

Depuis les années 1930, la consommation de cocaïne s'est progressivement répandue.

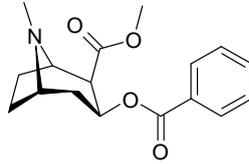


Figure 29 : **Cocaïne**

Ce n'est qu'en 1961 qu'un texte définitif a été adopté « la convention unique sur les stupéfiants ». Son objectif est de limiter la production et le commerce de substances interdites en établissant une liste de ces substances, qualifiées de stupéfiants.

1.2. Utilisation, effets et dangers de la cocaïne

Elle est absorbée par inhalation, également injectée par voie intraveineuse ou fumée. La cocaïne est parfois frelatée, coupée ou mélangée à d'autres substances par les trafiquants, ce qui accroît sa dangerosité et potentialise les effets et les interactions entre des produits dont on ne connaît pas la composition. La cocaïne est un psychostimulant majeur, elle excite le SNC.

L'usage de cocaïne provoque une euphorie immédiate, un sentiment de puissance intellectuelle et physique, une perte de jugement et une indifférence à la douleur et à la fatigue. Ces effets vont laisser place ensuite à un état dépressif et à une anxiété.

La dépendance psychique à la cocaïne est très forte chez l'homme et l'animal. Si ce dernier a le choix entre une eau pure et une eau contenant de la cocaïne, il consomme la deuxième jusqu'à en mourir. Chez l'homme, une personne sur six prenant de la cocaïne en devient dépendante⁸⁰ et un sur vingt nouveaux utilisateurs sera dépendant dès la première année d'utilisation.⁸¹ Le risque de dépendance est deux fois plus important si l'utilisateur fume la cocaïne (crack).⁸²

⁸⁰ Anthony, J. C.; Warner, L. A., Kessler, R. C. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* **1994**, *2*, 244-268. Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances and inhalants: findings from the National Comorbidity Survey.

⁸¹ Wagner, L. A.; Anthony, J. C. *Neuropsychopharmacology*, **2002**, *26*, 479-488. From first use to drug dependence: developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine and alcohol.

⁸² Chen, C. Y.; Anthony, J. C. *Psychopharmacology (Berl)*, **2004**, *172*, 78-86. Epidemiological estimates of risk in the process of becoming dependent upon cocaine: cocaine hydrochloride powder versus crack cocaine.

La cocaïne provoque :

- Une contraction de la plupart des vaisseaux sanguins. Les tissus, insuffisamment irrigués, s'appauvrissent et, par conséquent, se nécrosent. C'est souvent le cas de la cloison nasale avec des lésions perforantes chez les usagers réguliers.
- Des problèmes pulmonaires, douleurs abdominales, nausées.
- Des troubles du rythme cardiaque. Ils peuvent être à l'origine d'accidents cardiaques, notamment chez des personnes fragiles et/ou qui consomment de fortes quantités de tabac.
- Chez les personnes plus sensibles, l'usage de cocaïne peut provoquer des troubles psychiques, une grande instabilité d'humeur, des délires paranoïdes (notamment au bruit) ou des attaques de panique.
- Une augmentation de l'activité psychique et, par conséquent, des insomnies, des amnésies et des phases d'excitation.

Une autre caractéristique de la cocaïne est de lever les inhibitions, ce qui peut conduire à commettre des actes de violence, des agressions sexuelles, des dépenses compulsives, etc. La sensation de "toute-puissance" entraînée par la cocaïne risque d'engendrer des passages à l'acte.

1.3. Métabolisation de la cocaïne

La cocaïne est métabolisée essentiellement en benzoylecgonine qui peut être détectée dans les urines pendant deux ou trois jours après une prise unique. Elle est aussi métabolisée en ecgonine et en ester de méthylecgonine. En cas de prise de cocaïne et d'alcool à doses importantes, la benzoylecgonine est estérifiée dans l'organisme pour donner l'ester éthylique de la benzoylecgonine, appelé cocaéthylène, qui a des propriétés semblables à celles de la cocaïne (figure 30). La combinaison alcool-cocaïne constitue la cause la plus fréquente de mortalité liée à l'usage de drogue.

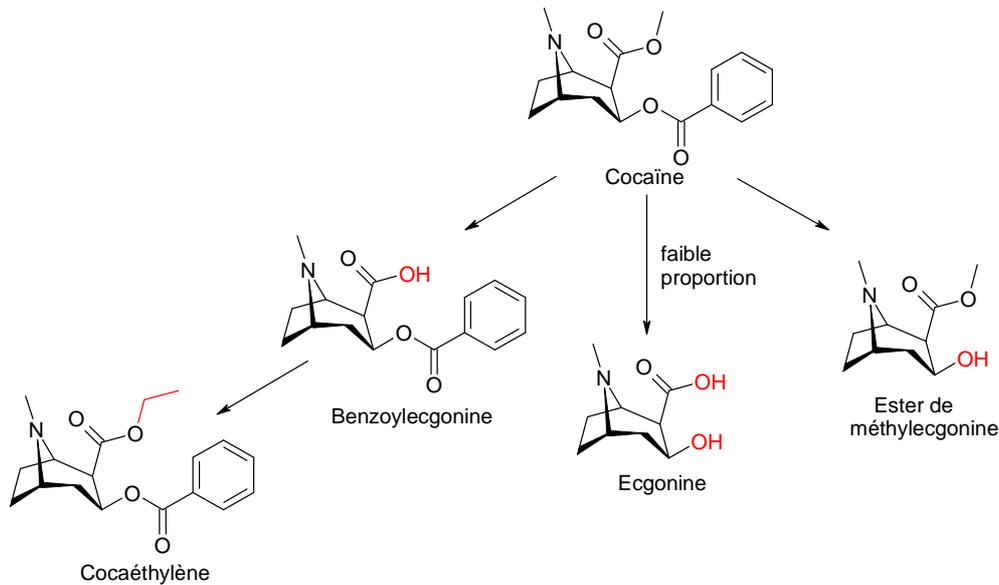


Figure 30 : Métabolisation de la cocaïne.

2. Mécanisme d'action de la cocaïne

La cocaïne produit ses effets toxiques, physiologiques et comportementaux à travers son interaction avec plusieurs sites distincts du SNC. Elle est connue pour moduler certains systèmes de neurotransmetteurs comme la dopamine, la sérotonine, la noradrénaline, en inhibant leur recapture présynaptique, et se lier avec de nombreux récepteurs notamment les récepteurs muscariniques et les sites σ .³³

L'interaction avec les transporteurs dopaminergiques est associée aux effets renforçants et euphoriques de la cocaïne. En effet, la voie mésocorticolimbique de la dopamine est reconnue dans ce qu'il est convenu d'appeler les circuits de la récompense et « du plaisir ».⁸³ A ce titre, la dopamine apparaît comme acteur majeur des comportements addictifs. Elle joue aussi avec les récepteurs muscariniques et σ une action sur la létalité de la cocaïne.⁸⁴

La sérotonine participe à la régulation de l'humeur, de l'appétit et du sommeil. Les transporteurs sérotoninergiques et les récepteurs 5HT₂ apparaissent être les sites principaux liés aux effets convulsifs, les récepteurs muscariniques et σ jouent un rôle secondaire mais important et modulateur de ces effets.⁸⁵

⁸³ Le Moal, M.; Simon, H. *Physiol. Rev.* **1991**, *71*, 155-234. Mesocorticolimbic dopaminergic network : functional and regulatory roles.

⁸⁴ Ritz, M. C.; George, F. R. *Psychopharmacol.* **1997**, *129*, 311-321. Cocaine toxicity: concurrent influence of dopaminergic, muscarinic and sigma receptors in mediating cocaine-induced lethality.

⁸⁵ Ritz, M. C.; George, F. R. *Psychopharmacol.* **1997**, *129*, 299-310. Cocaine-induced convulsions: pharmacological antagonism at serotonergic, muscarinic and sigma receptors.

La noradrénaline, normalement libérée en réponse au stress, provoque l'accélération du rythme cardiaque et l'élévation de la pression sanguine.

Enfin, il est reconnu que les effets anesthésiques de la cocaïne sont modulés par son interaction avec les canaux sodiques neuronaux.⁸⁴

3. Thérapies existantes

Il n'existe, pour l'instant, aucun traitement pharmacologique de la dépendance. En revanche, des médicaments se sont avérés efficaces pour traiter certains effets secondaires, comme la dépression (antidépresseurs) ou les crises (anticonvulsivants).

4. Nouvelles stratégies thérapeutiques

4.1. Antagonistes dopaminergiques

A ce jour aucun résultat concluant sur l'efficacité des antagonistes des récepteurs dopaminergiques dans le traitement de la dépendance n'a été rapporté. Néanmoins, l'utilisation d'antagonistes D1 atténuerait le renforcement induit par la cocaïne.⁸⁶ Des études cliniques sur des antagonistes agissant principalement sur les récepteurs D2, comme les neuroleptiques classiques, ont montré qu'ils bloquaient partiellement la consommation de la cocaïne. Mais cette approche thérapeutique souffre de deux principaux problèmes :

- L'administration chronique de tels agents induit des effets moteurs extrapyramidaux indésirables.⁸⁷
- Le traitement répété d'antagonistes dopaminergiques peut conduire à une augmentation de la sensibilité des récepteurs dopaminergiques postsynaptiques, ce qui peut indirectement augmenter les effets subjectifs de la cocaïne et donc ses effets abusifs.⁸⁸

Enfin des antagonistes D3 ont été testés mais en raison de résultats contradictoires, d'autres études sont requises pour élucider le rôle de ces récepteurs dans le traitement de la dépendance aux drogues.^{89,90}

⁸⁶ Maurice, T.; Martin-Fardon, R.; Romieu, P.; Matsumoto, R. R. *Neurosci. Behav. Rev.* **2002**, *26*, 499-527.

Sigma(1) (σ_1) receptor antagonists represent a new strategy against cocaine addiction and toxicity.

⁸⁷ Decker, K. P.; Ries, R. K. *Psychiatric Clinics of North America*, **1993**, *16*, 703-718. Differential diagnosis and psychopharmacology of dual disorders.

⁸⁸ Kosten, T. R.; McCance, E. *Revista de toxicomanias*, **1992**, *11*, 5-9. A review of pharmacological treatments for substance abuse.

⁸⁹ Vorel, S. R.; Ashby, C. R.; Paul, M.; Liu, X.; Hayes, R.; Hagan, J. J.; Middlemiss, D. N.; Stemp, G.; Gardner, E. L. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 9595-9603. Dopamine D3 receptor antagonism inhibits cocaine-seeking and cocaine-enhanced brain reward in rats.

4.2. Thérapies facilitant la transmission dopaminergique

La cocaïne augmente la transmission dopaminergique et diminue la concentration de la dopamine dans le cerveau. Donc, pendant la période initiale d'abstinence après une utilisation de cocaïne, le « cocaïnoman » peut avoir certains symptômes comme la dépression, la fatigue, l'anorexie, des troubles de l'humeur et du sommeil. Une stratégie de traitement pour contrecarrer ces effets est d'administrer des agonistes dopaminergiques directs ou indirects. L'approche thérapeutique qui implique ces agents facilitant la transmission dopaminergique comprend une grande variété de produits avec des mécanismes distincts comme les agonistes directs dopaminergiques, les monoamines oxydases et les stimulants.

Agonistes dopaminergiques

Des études ont été réalisées sur différents agonistes comme l'amantadine, la bromocriptine. Elles ont montré des résultats négatifs et de nombreux effets secondaires.^{91,92}

Inhibiteurs MAO

Les résultats cliniques montrent que ces agents sont moyennement efficaces dans la réduction de l'état de manque (craving).⁹³

Stimulants

Avec la perspective similaire du traitement par la Méthadone de l'addiction aux opiacés, divers psychostimulants ont été proposés comme thérapie de substitution. Ces études ont montré que l'état de manque était diminué, mais la consommation de cocaïne n'est pas réduite. De plus, à long terme, la consommation et l'état de manque augmentent.⁹⁴

En conclusion, les essais cliniques et les approches thérapeutiques utilisant des agents facilitant la transmission dopaminergique pour le traitement de la cocaïne s'avèrent être peu efficace dans la réduction de l'utilisation de la drogue et la diminution des symptômes

⁹⁰ Caine, S. B.; Koob, G. F.; Parsons, L. H.; Everitt, B. J.; Schwartz, J. C.; Sokoloff, P. *Neuroreport*. **1997**, *8*, 2373-7. D3 receptor test in vitro predicts decreased cocaine self-administration in rats.

⁹¹ Collins, E. D.; Vosburg, S. K.; Hart, C. L.; Haney, M.; Foltin, R. W. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, *76*, 401-407. Amantadine does not modulate reinforcing, subjective, or cardiovascular effects of cocaine in humans.

⁹² Soares, B. G.; Lima, M. S.; Reisser, A. A.; Farrel, M. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2003**, *2*, CD003352. Dopamine agonists for cocaine dependence.

⁹³ Bartzokis, G.; Beckson, M.; Newton, T.; Mandelkern, M.; Mintz, J.; Foster, J. A.; Ling, W.; Bridge, T. P. *Neuropsychopharmacology*, **1999**, *20*, 582-590. Selegiline effects on cocaine-induced changes in medial temporal lobe metabolism and subjective ratings of euphoria.

⁹⁴ Grabowski, J.; Rhoades, H.; Schmitz, J.; Stotts, A.; Daruzska, L. A.; Creson, D.; Moeller, F. G. *J. Clin. Pharmacol.* **2001**, *21*, 522-526. Dextroamphetamine for cocaine-dependence treatment: a double-blind randomized clinical trial.

associés comme l'état de manque. De plus, la plupart présentent un profil neurochimique et comportemental similaire à la cocaïne.

4.3. Thérapies ciblant d'autres récepteurs

La dopamine joue un rôle essentiel dans les effets de la cocaïne. Néanmoins, d'autres sites d'action sont impliqués lors de la prise de drogue. En effet, la cocaïne bloque la recapture de neurotransmetteurs comme la noradrénaline et la sérotonine. Elle se fixe sur les récepteurs muscariniques et sigma. Lors d'une prise chronique de drogue, la densité de certains récepteurs augmente comme les récepteurs aux glutamates et aux opiacés. Enfin, ces derniers avec les récepteurs GABA jouent un rôle important dans le mécanisme lié à la cocaïne, en partie en raison de leur étroite interrelation avec le système dopaminergique.

Les récepteurs GABA

La thérapie *via* des agonistes GABA_B est considérée comme la première médication. Le Baclofène (figure 31) a montré son efficacité dans les essais cliniques en diminuant l'état de manque. La stimulation pharmacologique des récepteurs GABA_B par des agonistes directs ou des allostériques réduit le renforcement induit par la drogue.⁹⁵ L'activation tonique du récepteur n'est donc pas requise pour ces effets renforçants. En effet, les antagonistes n'altèrent pas l'auto-administration.⁹⁶ De plus, des inhibiteurs des transporteurs GABA_B, comme le Tiagabine (figure 32) ont montré une diminution dans la prise de cocaïne.⁹⁵

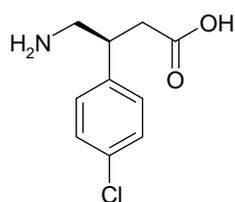


Figure 31 : **Baclofène**

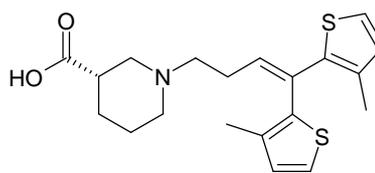


Figure 32 : **Tiagabine**

Enfin, malgré le fait que beaucoup d'agonistes GABA_A montrent des propriétés appétantes (les benzodiazépines ou l'éthanol), le Topiramate (figure 33), aussi un agoniste GABA_A, montrerait lors des premières études, une éventuelle efficacité dans le traitement des

⁹⁵ Filip, M.; Frankowska, M.; Przegaliński, E. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *574*, 148-157. Effects of GABA(B) receptor antagonist, agonists and allosteric positive modulator on the cocaine-induced self-administration and drug discrimination.

⁹⁶ Vocci, F.; Ling, W. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *108*, 94-108. Medications development: successes and challenges.

rechutes. Mais d'autres études doivent être poursuivies afin de pouvoir conclure sur sa réelle efficacité.^{96,97}

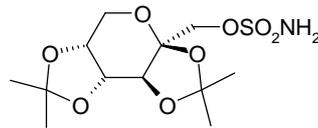


Figure 33 : **Topiramate**

Les récepteurs GABAergiques diminuent l'efficacité de la cocaïne, dans un système où l'essentiel de l'action se situe dans une modulation de la neurotransmission dopaminergique.

Les récepteurs aux opiacés

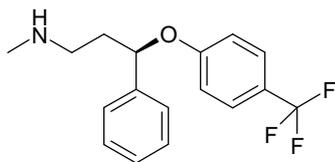
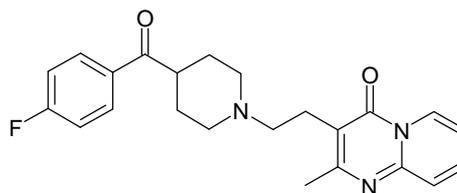
La voie des opiacés serait aussi impliquée dans les effets de la cocaïne. Après administration de la drogue, la densité de ces récepteurs augmente. Plusieurs études ont montré que les antagonistes opioïdes, les agonistes partiels μ et agonistes κ modifiaient l'auto-administration de la cocaïne.⁸⁶

Les récepteurs sérotoninergiques

Il existe de plus en plus de recherches qui montrent l'implication d'autres systèmes de neurotransmetteurs que celui de la dopamine dans l'addiction. Le système sérotoninergique participerait notamment à l'action renforçante, spécialement 5HT_{1B}, qui modulerait la récompense et le renforcement induit par les inhibiteurs des transporteurs dopaminergiques (DAT). La stimulation de ces récepteurs augmente l'action renforçante des inhibiteurs DAT et facilite l'augmentation de la dopamine induite par la cocaïne. Les molécules ciblant les récepteurs 5HT centraux pourraient donc être une nouvelle approche thérapeutique.⁸⁶ En effet, les inhibiteurs des transporteurs sérotoninergiques, comme la fluoxétine (figure 34), atténueraient les effets stimulants induits par la cocaïne.⁹⁸ Tandis que les antagonistes 5HT₂, comme la pirenpérone (figure 35), diminueraient les convulsions provoquées par la drogue.⁸⁵

⁹⁷Reis, A. D.; Castro, L. A.; Faria, R.; Laranjeira, R. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **2008**, *30*, 132-135. Craving decrease with topiramate in outpatient treatment for cocaine dependence: an open label trial.

⁹⁸Howell, L. L.; Czoty, P. W.; Byrd, L. D. *Psychopharmacology*, **1997**, *131*, 40-48. Pharmacological interactions between serotonin and dopamine on behavior in the squirrel monkey.

Figure 34 : **Fluoxetine**Figure 35 : **Pirenperone**

Les récepteurs au glutamate

Les récepteurs aux glutamates métabotropiques et ionotropiques sont impliqués dans les effets comportementaux des psychostimulants. Cette observation ouvre une approche originale dans le traitement de l'addiction. En effet, l'utilisation d'antagonistes NMDA, comme la dizocilpine (figure 24), bloque la sensibilité comportementale induite par la cocaïne. Le prétraitement avec ce médicament chez les rats, empêche l'auto-administration.⁸⁶

Les récepteurs noradrénergiques

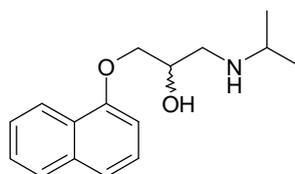
La cocaïne inhibe les transporteurs noradrénergiques α_2 , par conséquent, ils joueraient un rôle important dans la modulation des effets stimulants de la cocaïne.⁹⁹ De plus, la prise chronique de cocaïne entraîne une surrégulation des transporteurs dans les zones du cerveau impliqués dans le renforcement et la rechute (BST-bed nucleus of the stria terminalis, situé dans le système limbique, amygdale et l'hippocampe).⁹⁹ L'utilisation d'agonistes α_2 aurait une utilité dans le traitement de la prévention des rechutes. En effet, la réduction de l'activité des neurones noradrénergiques et la libération de noradrénaline dans le cerveau empêche la réinstallation du comportement d'auto-administration.¹⁰⁰

D'autre part, des antagonistes β -adrénergiques comme le propranolol (figure 36) ont montré une efficacité dans la diminution du renforcement induite par la cocaïne chez le singe.¹⁰¹

⁹⁹ Platt, M. D.; Rowlett, J. K.; Spealman, R. D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *322*, 894-902. Noradrenergic mechanisms in cocaine-induced reinstatement of drug seeking in squirrel monkeys.

¹⁰⁰ Erb, S.; Hitchcott, P. K.; Rajabi, H.; Mueller, D.; Shaham, Y.; Stewart, J. *Neuropsychopharmacology*, **2000**, *23*, 138-150. Alpha-2 adrenergic receptor agonists block stress-induced reinstatement of cocaine seeking.

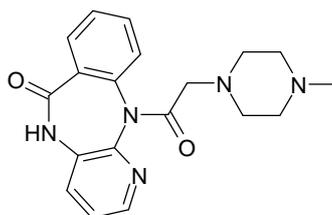
¹⁰¹ Harris, G. C.; Hedaya, M. A.; Pan, W. J.; Kalivas, P. *Neuropsychopharmacology*, **1996**, *14*, 195-204. beta-adrenergic antagonism alters the behavioral and neurochemical responses to cocaine.

Figure 36 : **Propranolol**

Enfin, les souris KO des récepteurs α_1 -adrénergiques montrent une diminution importante de l'hyperactivité locomotrice induit par la cocaïne de même pour la sensibilisation et ne présente pas d'effet CPP.¹⁰²

Les récepteurs muscariniques

Les récepteurs muscariniques joueraient un rôle dans les effets toxiques et les convulsions induits par la drogue. En effets, l'antagoniste pirenzepine (figure 37) diminue la létalité et les convulsions provoquées par la cocaïne.^{84,85}

Figure 37 : **Pirenzepine**

Les sites sigma

Une hypothèse intéressante serait peut être de s'intéresser à la protéine σ_1 . En effet, l'implication de cette protéine dans l'action de la cocaïne n'est étudiée que depuis peu. Car la cocaïne a une affinité modeste pour les sites σ_1 . Elle interagit avec les deux sous-types σ_1 et σ_2 mais avec une affinité dix fois supérieure pour σ_1 ($K_i = 29\mu\text{M}$).¹⁰³ La protéine σ_1 se trouve en forte densité dans le cerveau et le cœur, deux organes cibles importants dans l'action de la drogue³¹. En effet, la cocaïne provoque une euphorie, une importante dépendance et surtout de graves problèmes cardiaques. Des études ont montré que l'utilisation d'antagonistes pharmacologiques de σ_1 ou des souris traitées avec des oligodéoxynucléotides antisens

¹⁰² Drouin, C.; Darracq, L.; Trovero, F.; Blanc, G.; Glowinski, J.; Cotecchia, S.; Tassin, J. P. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 2873-2884. Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates.

¹⁰³ Matsumoto, R. R.; Hewett, K. L.; Pouw, B.; Bowen, W. D.; Husbands, S. M.; Cao, J. J.; Hauck Newman, A. *Neuropharmacology*, **2001**, *41*, 878-886. Rimcazole analogs attenuate the convulsive effect of cocaine: correlation with binding to sigma receptors rather than dopamine transporters.

(bloquant donc l'expression de la protéine σ_1), atténuent l'action de la cocaïne, c'est-à-dire les effets convulsifs, toxiques et comportementaux provoqués par la drogue. L'idée que la protéine σ_1 serait impliquée dans l'action comportementale de la cocaïne devient donc de plus en plus acceptée ces dernières années.⁸⁶

4.4. Immunopharmacothérapie

Une approche immunopharmacothérapeutique est en cours d'étude¹⁰⁴ pour créer un vaccin contre la dépendance à la cocaïne. Pour obtenir une réponse immunitaire de notre organisme face à la cocaïne, il faudrait greffer à la molécule de cocaïne une protéine facilement reconnaissable par le système immunitaire de façon à provoquer une production d'anticorps. Ainsi, les molécules de cocaïne ne pourront pas atteindre le cerveau et plus particulièrement les récepteurs neuronaux. La compagnie de recherche pharmaceutique Xenova, a développé le TA-CD, un vaccin contre l'addiction à la cocaïne. Il se trouve en phase II. En se liant aux petites molécules de cocaïne, il permet au système immunitaire de développer des anticorps qui reconnaissent la drogue. Si le « cocaïnomane » reprend de la drogue, elle sera détruite par le système immunitaire avant de faire effet. Le but est de supprimer l'euphorie que la cocaïne procure, donc par conséquent la dépendance. Lors des essais, le taux d'anticorps, important chez l'animal, s'avère moins élevé chez l'homme et donc moins efficace contre l'effet de manque et l'élimination de la cocaïne. La vaccination ne pourra donc pas être utilisée en monothérapie mais en complément avec d'autres médicaments.¹⁵

5. Les relations entre la protéine σ_1 et la cocaïne

La capacité des ligands à intervenir dans les effets de la cocaïne résulte de leur aptitude à intervenir dans l'action de la drogue sur plusieurs niveaux. Ils interfèrent directement avec la protéine σ_1 localisée dans les organes clés de l'action de la drogue. Ils modulent les systèmes de neurotransmetteurs impliqués dans le mécanisme d'action, principalement le système dopaminergique, mais aussi le système adrénérgique et les

¹⁰⁴ Heidbreder, C. A.; Hagan, J. J. *Curr. Opin Pharmacol.* **2005**, *4*, 107-118. Novel pharmacotherapeutic approaches for the treatment of drug addiction and craving.

récepteurs NMDA, et interviennent dans le changement d'expression des gènes provoqué par la cocaïne.³³

Les effets de la cocaïne passent par un mécanisme cellulaire impliquant la potentialisation des synapses excitatrices des neurones dopaminergiques. Ces derniers sont modulés par différents systèmes de neurotransmetteurs comme les récepteurs GABA, glutamatergiques, les récepteurs aux opiacés et les sites σ .⁸⁶

Les neurotransmetteurs GABAergiques (inhibiteurs du SNC) et glutamatergique (Glu=excitateur de SNC) contrôlent les neurones dopaminergiques au niveau de l'air tegmental ventral (VTA), mais aussi au niveau des airs cibles de la libération de dopamine comme le cortex préfrontal (CtxPf), le nucléus accumbens (NAc) ou l'amygdale.

La cocaïne bloque les transporteurs dopaminergiques et augmente ainsi la concentration de la dopamine extracellulaire, facilitant ses effets sur les récepteurs dopaminergiques post-synaptique D1, D2 et D3 (figure 38).

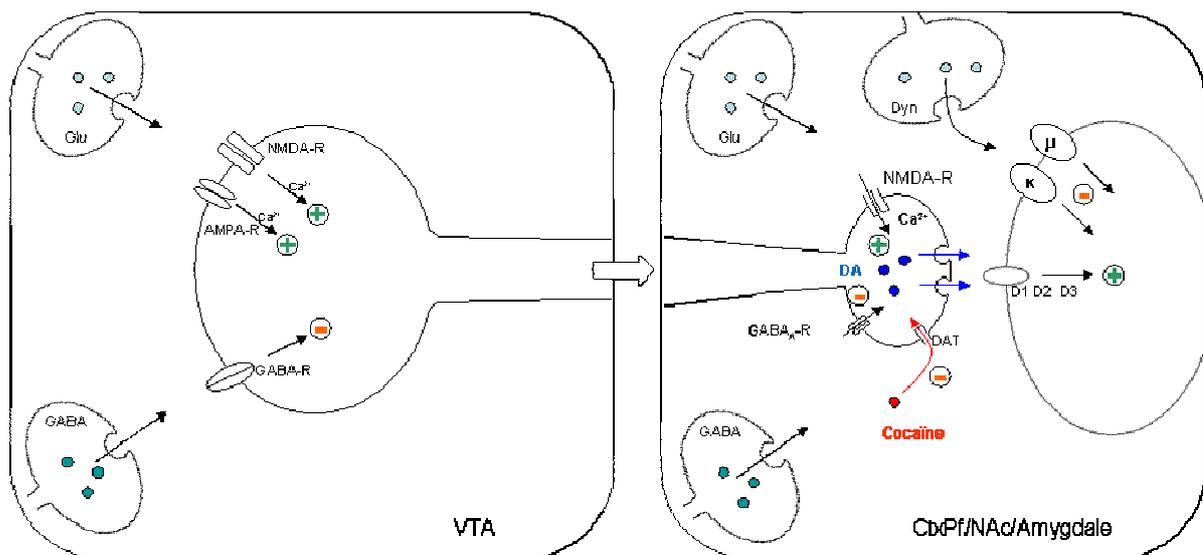


Figure 38 : Mécanisme d'action de la cocaïne, des récepteurs aux opiacés, aux glutamates et GABA sur les neurones dopaminergiques.⁸⁶

Grâce à un couplage avec une protéine G, les récepteurs dopaminergiques activent l'adénylate cyclase (AC) ou la phospholipase C (PLC) entraînant une augmentation de l'inositol triphosphate (IP₃) ou de l'AMPc, les seconds messagers (figure 39). L'IP₃ active son récepteur sur le RE. Cette activation mobilise le calcium intracellulaire qui active les voies des kinases et des facteurs de transcription des gènes pour induire les effets plastiques de la cocaïne. Au niveau pré-synaptique, les récepteurs σ_1 interagissent avec les récepteurs NMDA

et modulent leurs réponses. Au niveau du neurone post-synaptique, ils peuvent aussi être impliqués dans la délocalisation du complexe trimérique vers la membrane plasmique, où ils diminuent l'activation post-synaptique des récepteurs aux opiacés μ et κ ou vers la membrane nucléaire, où ils peuvent affecter les effets des facteurs de transcription sur l'expression des gènes.

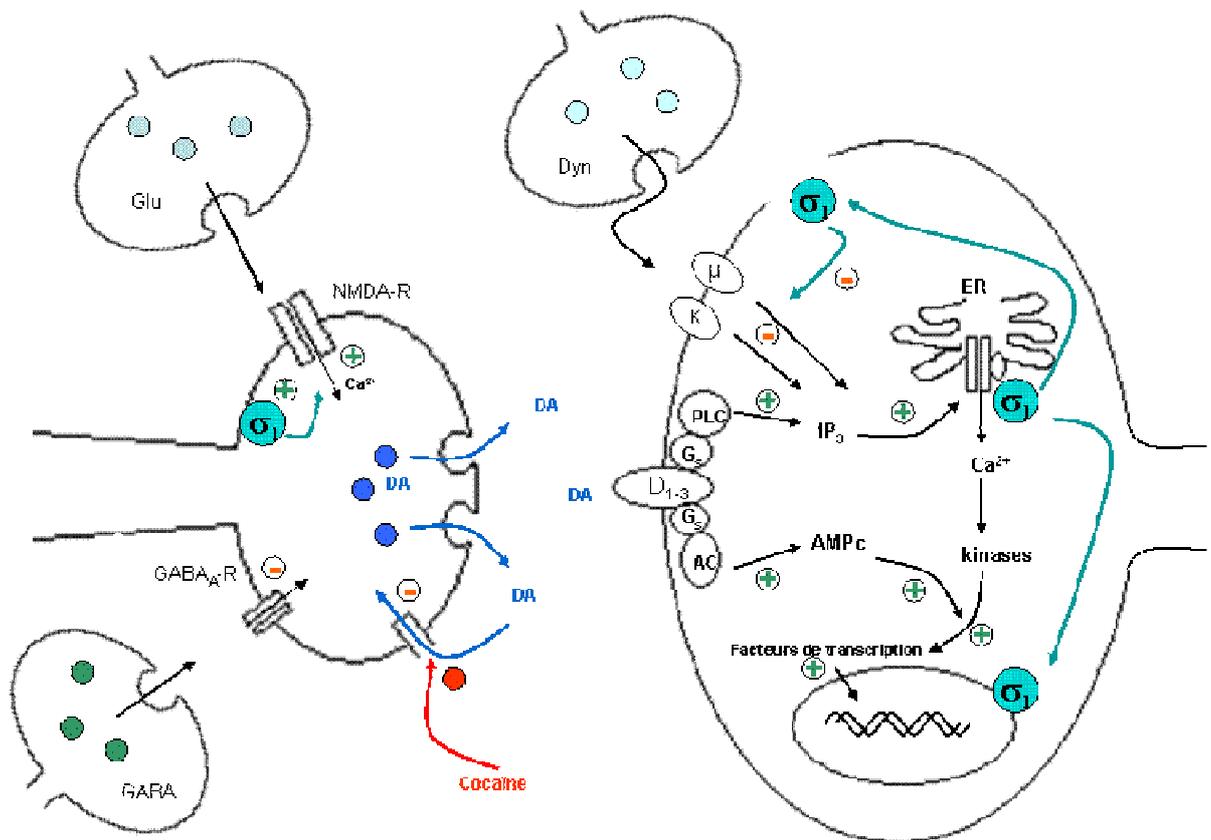


Figure 39 : Implication possible de la protéine σ_1 dans les aires du cortex préfrontal, le nucleus accumbens ou l'amygdale.⁸⁶

Les récepteurs σ_1 , situés dans le VTA, forment un complexe trimérique avec l' IP_3 via l'ankyrine B sur la membrane du RE. La cocaïne peut activer les récepteurs σ_1 grâce à une interaction directe ou indirecte. Après activation, le récepteur est délocalisé du réticulum vers la membrane plasmique, où il peut moduler l'activité des récepteurs NMDA (figure 40).

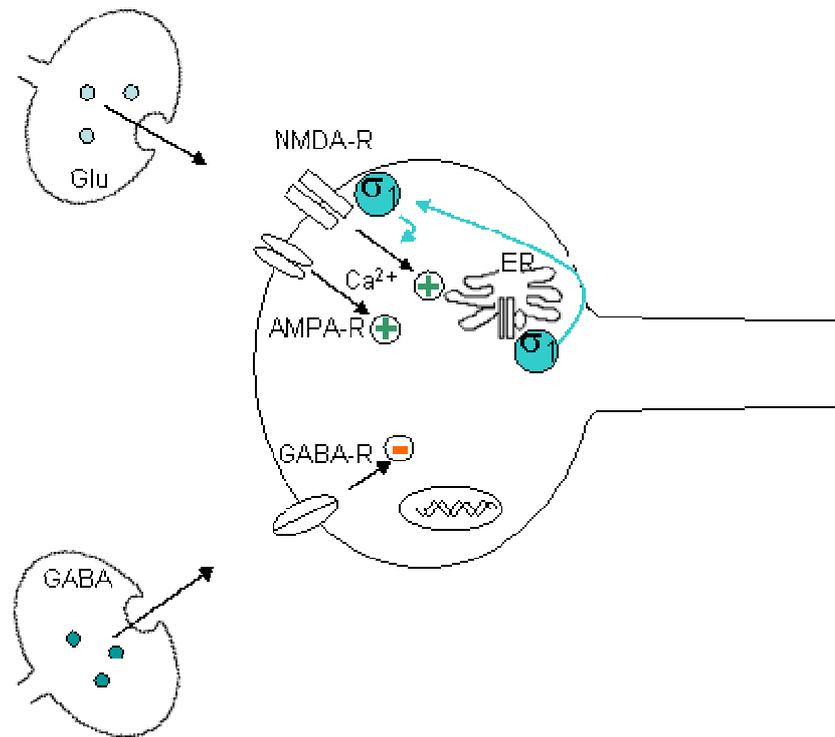


Figure 40 : **Implication possible de la protéine σ_1 au niveau de l'air tegmental ventral.**⁸⁶

En conclusion, les récepteurs σ_1 modulent l'activité des neurones dopaminergiques à différents niveaux. Au niveau pré-synaptique, ils régulent l'efficacité de la libération de la dopamine et au niveau post-synaptique, ils modulent les voies impliquées dans les réponses aux récepteurs à la dopamine.⁸⁶

La protéine σ_1 constituerait une bonne cible pour le développement d'agents anti-cocaïne et une stratégie prometteuse dans le traitement de la dépendance à la cocaïne et des overdoses.³³ De récentes études confirment cette hypothèse en montrant que σ_1 serait impliqué dans plusieurs effets induits par la cocaïne. Ce paragraphe fera un résumé des études des agonistes et antagonistes des récepteurs σ_1 et leurs actions sur les effets induits par la drogue.

5.1. Implication de σ_1 dans les effets stimulants de la cocaïne

La cocaïne induit une hyperactivité. L'interaction des récepteurs σ_1 sur ces effets locomoteurs a été montrée par l'étude des antagonistes σ_1 bloquant les effets stimulants induits par la drogue. Les antagonistes BD-1047 (figure 17), BD1008 (figure 41) diminuent

l'hyperactivité induite par la drogue. Cet effet est retrouvé avec l'utilisation d'oligodéoxynucleotides antisens.^{105,106}

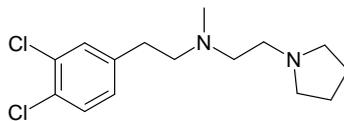


Figure 41 : **BD-1008**
K_i = 0,34nM
Antagoniste σ_1

Une administration aiguë de cocaïne induit donc une hyperactivité, mais une administration répétée provoque une sensibilité avec un renforcement et une dépendance apparaissant très peu de temps après la première injection. BMY-14,802 et le rimcazole (figure 10), antagonistes σ_1 , atténuent le développement de la sensibilité induit par la cocaïne sur la locomotion.⁸⁶

5.2. Implication de σ_1 dans les effets appétants de la cocaïne

Les récepteurs σ_1 sont aussi impliqués dans la modulation des propriétés récompensantes de la cocaïne. Ces effets appétants sont mesurés par un test caractéristique dans l'étude des drogues : le test de conditionnement de préférence de place CPP. Romieu *et al*^{107,108} ont montré que le CPP induit par la cocaïne était bloqué par les antagonistes comme le BD-1047 ou par une injection d'antisens des récepteurs σ_1 dans le cerveau. De plus, le CPP induit par un inhibiteur sélectif des transporteurs dopaminergiques, sans affinité pour σ_1 , est inhibé par les antagonistes sélectifs σ_1 , montrant ainsi le rôle de σ_1 dans la cascade du signal dopaminergique que pourrait activer la cocaïne.

Enfin, les neurostéroïdes comme la pregnenolone et la DHEA, agonistes σ_1 , n'induisent pas de CPP seul mais augmentent le CPP induit par la cocaïne. Tandis que la progestérone comme le BD-1047, antagonistes σ_1 , bloque cet effet. Des propriétés pharmacologiques similaires ont été observées entre les ligands et les neurostéroïdes. En effet, les effets de potentialisation provoqués par la DHEA et la Pregnenolone sont bloqués par une

¹⁰⁵ McCracken, K. A.; Bowen, W. D.; De Costa, B. R.; Matsumoto, R. R. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *370*, 225-232. Two novel sigma receptor ligands, BD-1047 and LR-172, attenuate cocaine-induced toxicity and locomotor activity.

¹⁰⁶ McCracken, K. A.; Bowen, W. D.; Matsumoto, R. R. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *365*, 35-38. Novel sigma receptor ligands attenuate the locomotor stimulatory effects of cocaine.

¹⁰⁷ Romieu, P.; Phan, V. L.; Martin-Fardon, R.; Maurice, T. *Neuropsychopharmacology*, **2002**, *26*, 444-455. Involvement of the sigma(1) receptor in cocaine-induced conditioned place preference: possible dependence on dopamine uptake blockade.

¹⁰⁸ Romieu, P.; Martin-Fardon, R.; Maurice, T. *Neuroreport*. **2000**, *11*, 2885-2888. Involvement of the sigma1 receptor in the cocaine-induced conditioned place preference.

pré-administration de BD-1047 et ceux provoqués par l'Igmesine, sont bloqués par l'administration de la Progestérone. Les neurostéroïdes agiraient donc comme les ligands dans la modulation des propriétés récompensantes induites par la cocaïne via les récepteurs σ_1 .¹⁰⁹

5.3. Implication de σ_1 dans les effets toxiques et convulsifs de la cocaïne

L'usage abusif de cocaïne peut produire de nombreux effets irréversibles comme les convulsions, la létalité, spécialement lors de l'overdose. Il n'y a actuellement aucun traitement pour cette urgence médicale. L'habilité de la cocaïne à interagir avec σ_1 dans les organes clés comme le cerveau, le cœur et les poumons, affectés lors d'une overdose, montre que cette protéine est une cible intéressante.

L'équipe de Matsumoto¹¹⁰ a démontré que les effets toxiques de la cocaïne étaient modulés par la protéine. Les agonistes σ_1 potentialisent et les antagonistes inhibent les convulsions induites par la cocaïne. En effet, l'utilisation d'antagonistes pharmacologiques de σ_1 , comme BMY-14,802, BD-1047, BD-1063, UMB-116^{105,111,112} (figures 42, 43, 44), ou de souris traitées avec des oligodéoxynucléotides antisens, bloquant donc l'expression de la protéine σ_1 , atténuerait l'action de la cocaïne, c'est-à-dire les effets convulsifs, toxiques, létaux et comportementaux provoqués par la drogue.

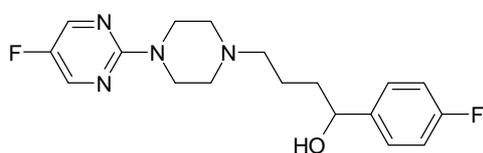


Figure 42: **BMY-14,802**
IC₅₀ = 66nM
Antagoniste σ_1

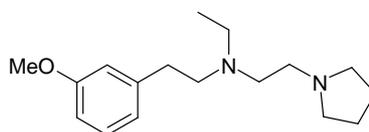


Figure 43: **UMB-116**
Ki = 57nM
Antagoniste σ_1

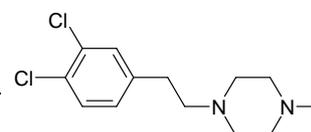


Figure 44: **BD-1063**
Ki = 9nM
Antagoniste σ_1

¹⁰⁹ Romieu, P.; Martin-Fardon, R.; Bowen, W. D. Maurice, T. *J. Neurosci.* **2003**, 23, 3572-3576. Sigma 1 receptor-related neuroactive steroids modulate cocaine-induced reward.

¹¹⁰ Matsumoto, R. R.; Liu, Y.; Lerner, M.; Howard, E. W.; Brackett, D. J. *J. Pharmacol.* **2003**, 469, 1-12. Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents.

¹¹¹ Menkel, M.; Terry, P.; Pontecorvo, M.; Katz, J. L.; Witkin, J. M. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, 201, 251-252. Selective sigma ligands block stimulant effects of cocaine.

¹¹² Daniels, A. T.; Ayala, E.; Chen, W.; Coop, A.; Matsumoto, R. R. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, 542, 61-68. -[2-(m-methoxyphenyl)ethyl]-N-ethyl-2-(1-pyrrolidinyl)ethylamine (UMB 116) is a novel antagonist for cocaine-induced effects.

5.4. Implication de σ_1 dans l'auto-administration de la cocaïne

Des tests ont été réalisés sur les effets de l'antagoniste σ_1 BD-1047 (figure 17) par rapport à l'auto-administration de cocaïne chez le rat. BD-1047 ne modifie pas le renforcement direct induit par la cocaïne. En revanche, il diminue le rétablissement, à la suite d'une extinction, du renforcement provoqué par la drogue.

5.5. Implication de σ_2 dans les effets de la cocaïne

Le rôle de σ_2 est par contre moins clair et les recherches sur son action contre la cocaïne sont compliquées en raison de l'absence d'une séquence d'acides aminés de la protéine qui pourrait permettre de construire un oligodeoxynucleotides antisens. SM-21 (figure 45), antagoniste de σ_2 , pourrait atténuer la motilité induite par la cocaïne chez les souris¹¹³. Cependant, le mécanisme d'action n'a pas encore été complètement caractérisé. De plus, la toxicité de certains ligands σ serait due probablement à leur manque de sélectivité envers σ_1 , c'est-à-dire à leur liaison avec σ_2 . Il est donc important de porter les études sur des ligands sélectifs de σ_1 .

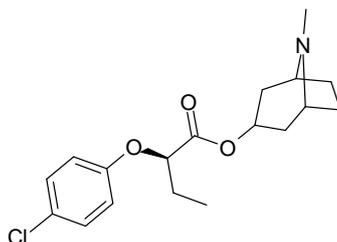


Figure 45: **SM-21**
Antagoniste σ_2
 $IC_{50} \sigma_1 > 1000nM$
 $IC_{50} \sigma_2 = 67nM$

Au laboratoire, notre recherche de ligands σ_1 s'effectue en collaboration avec le Dr Tangui Maurice (Inserm U. 710, Montpellier) pour le traitement contre l'addiction à la cocaïne, dans le cadre d'un projet financé par la MILDT.

¹¹³ Matsumoto, R. R.; Mack, A. L. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *417*, R1-R2. (+/-)-SM 21 attenuates the convulsive and locomotor stimulatory effects of cocaine in mice.

III. Projet de recherche

1. Les dérivés tétrahydroisoquinoléines

Les dérivés des hydantoïnes ont beaucoup été étudiés, ce qui a permis de découvrir de nombreuses applications thérapeutiques. En effet, des anxiolytiques,¹¹⁴ des antiandrogènes¹¹⁵ et des antibactériens¹¹⁶ ont été synthétisés sur la base d'une structure hydantoïne. Nous sommes donc partis d'une structure hydantoïne plus contrainte : tétrahydroisoquinoléine(Tic)-hydantoïne. En effet, lors d'un criblage de chimiothèques du laboratoire, le noyau Tic a été identifié comme une structure sélective de σ_1 .

Le composé **A₁** (figure 46) s'est révélé être un ligand très sélectif de σ_1 de cochon d'inde avec une IC₅₀ de 16 nM. L'affinité de cette molécule pour σ_1 pourrait s'expliquer par la présence d'une partie aromatique et d'un atome d'azote protonable d'après le modèle de Glennon et d'Ablordeppey.^{70,71}

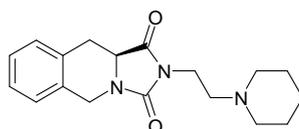


Figure 46 : composé **A₁**

Au laboratoire, le but du projet consiste à étudier les relations structure-activité de cette famille de molécules afin d'optimiser l'activité et la spécificité vis à vis de σ_1 .

Les études précédentes ont visé à étudier indépendamment l'impact de la modification du noyau Tic-hydantoïne, ainsi que la nature et la longueur des chaînes latérales.

Nous avons vu précédemment que la structure de la protéine σ_1 était transmembranaire (introduction § 2. Sous-types et structure de la protéine sigma). Cette structure rend donc difficile l'étude des relations structure-activité des ligands de la protéine car étant transmembranaire, la protéine ne peut pas être cristallisée. Ainsi, il n'existe pas de structure cristallographique pouvant expliquer les différentes liaisons, interactions entre la protéine et son ligand, obligeant ainsi une étude plus lente et progressive.

¹¹⁴ Lopez-Rodriguez, M. L.; Rosado, M. L.; Benhamu, B.; Morcillo, M. J.; Sanz, A. M.; Orensanz, L.; Beneitez, M. E.; Fuentes, J. A.; Manzanares, J. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4439-4450. Synthesis and Structure-Activity Relationships of a New Model of Arylpiperazines. 1. 2-[[4-(*o*-Methoxyphenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1,3-dioxoperhydroimidazo[1,5-*a*]pyridine: A Selective 5-HT_{1A} Receptor Agonist.

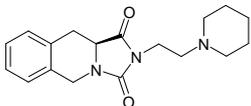
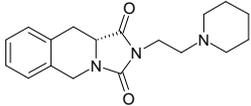
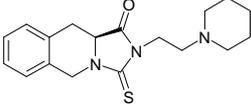
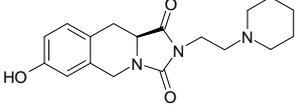
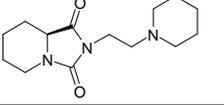
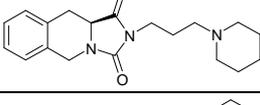
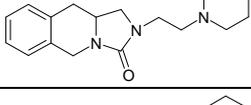
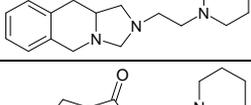
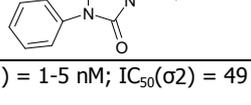
¹¹⁵ Payen, O.; Top, S.; Vessières, A.; Brulé, E.; Plamont, M. A.; McGlinchey, M.; Müller-Bunz, H.; Jaouen, G. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1791-1799. Synthesis and Structure-Activity Relationships of the First Ferrocenyl-Aryl-Hydantoin Derivatives of the Nonsteroidal Antiandrogen Nilutamide.

¹¹⁶ Barnes K.; Liang J.; Wu R.; Worley R. L.; Lee J.; Broughton R. M.; Huang T. S. *Biomaterial*, **2006**, *27*, 4825-4830. Synthesis and antimicrobial applications of 5,5'-ethylenebis[5-methyl-3-(3-triethoxysilylpropyl)hydantoin].

2. Travaux antérieurs

2.1. Modification du noyau Tic-Hydantoïne

Afin de modifier le noyau tic-hydantoïne, plusieurs stratégies de synthèse ont été développées.^{117,118} Tous les composés synthétisés de la série ont été évalués dans des tests de liaison au site cérébral σ_1 de cochon d'inde en utilisant l'Halopéridol comme ligand de référence. Les composés les plus actifs ont également été testés sur σ_2 de cortex cérébral de rat. Les résultats des tests biologiques sont répertoriés dans le tableau 1.

Pdt	structure	IC ₅₀ σ_1 (nM) ^a cochon d'inde	IC ₅₀ σ_2 (nM) ^{a,b} rat	Ratio σ_2/σ_1 ^b
A ₁		16 ± 3	>1000	>60
A ₂		6,6 ± 1,9	>1000	>150
A ₃		0,9 ± 0,1	507 ± 80	563
A ₄		>1000	nd	nd
A ₅		>1000	nd	nd
A ₆		21,5 ± 4,0	>1000	>45
A ₇		54 ± 5	>1000	>15
A ₈		77 ± 6	>1000	>10
A ₉		66 ± 8	>1000	>15

a halopéridol : IC₅₀(σ_1) = 1-5 nM; IC₅₀(σ_2) = 49 nM. b nd: non déterminé.

Tableau 1

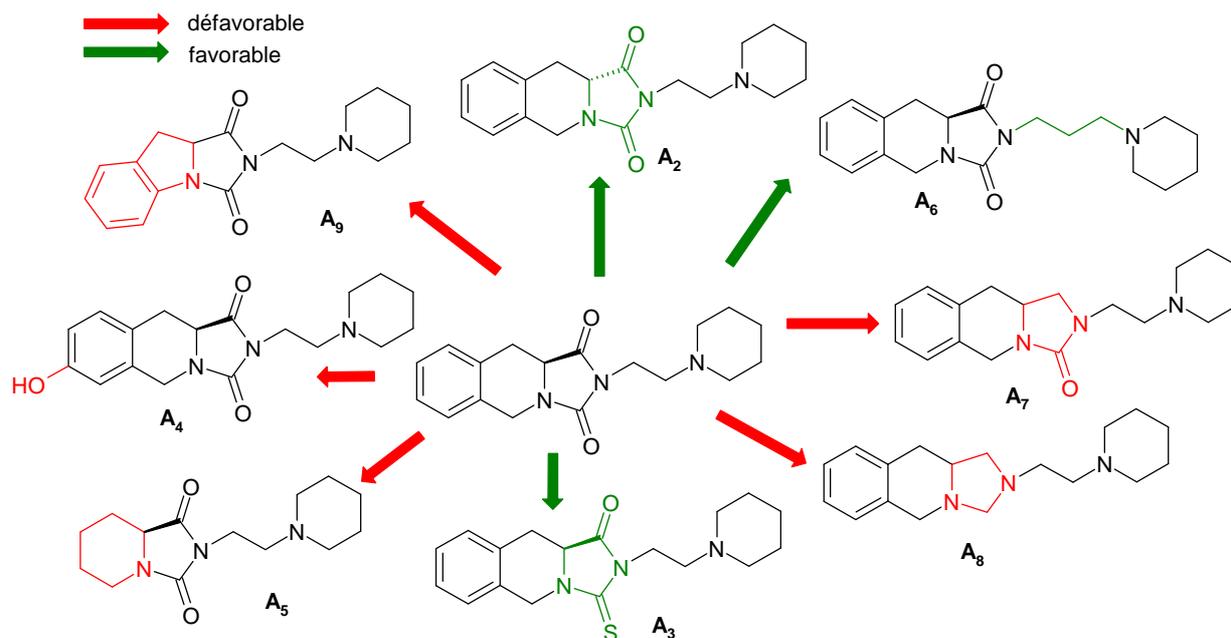
¹¹⁷Charton, J.; Cazenave Gassiot, A.; Girault-Mizzi, S.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Melnyk, P.; Sergheraert, C.. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4833-4837. Synthesis and pharmacological evaluation of Tic-hydantoin derivatives as selective σ_1 ligands. Part 1.

¹¹⁸Cazenave Gassiot, A.; Charton, J.; Girault-Mizzi, S.; Gilleron, P.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Sergheraert, C.; Melnyk, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4828-4832. Synthesis and pharmacological evaluation of Tic-hydantoin derivatives as selective σ_1 ligands. Part 2.

Les résultats de cette première étude ont montré que :

- Le carbone asymétrique a une influence sur l'affinité : le dérivé (R) **A₂** est plus affiné que le dérivé (S) **A₁** avec une sélectivité préservée.
- Le remplacement de l'urée par une thiourée **A₃** entraîne un accroissement de l'affinité, bien que l'atome de soufre soit un moins bon accepteur de liaison hydrogène.
- L'élimination de la partie aromatique du Tic **A₅** ou la substitution de ce dernier en position 7 par un groupement hydroxyle **A₄**, en accord avec le modèle de Glennon et d'Ablordeppey,⁴¹ entraîne une perte importante de l'affinité.
- l'allongement de la chaîne latérale d'un groupement méthylène **A₆** ne change ni l'affinité, ni la sélectivité.
- Le remplacement du noyau Tic par un noyau indoline **A₉** diminue l'affinité d'un facteur quatre.
- La réduction de l'hydantoïne en urée **A₇** ou en amine **A₈** est défavorable. Donc il est peut-être nécessaire d'avoir un accepteur de liaisons hydrogènes pour l'affinité ou peut être que le trop grand nombre d'azotes protonables est défavorable pour l'affinité. Cette dernière supposition renforce l'hypothèse précédente d'Ablordeppey et de Glennon⁴¹ sur la nécessité d'avoir un seul site protonable.

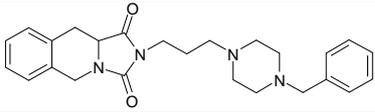
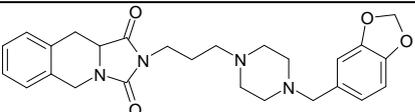
En conclusion, cette première étude a mis en valeur l'importance de : l'atome d'azote protonable, la présence d'un groupement hydrophobe, la stéréochimie du carbone asymétrique et enfin la structure hydantoïne ou thiohydantoïne. En revanche la longueur de chaîne ne paraît pas moduler l'affinité (figure 47).



2.2. Modification de la nature et des longueurs des chaînes latérales

Après avoir étudié la structure du noyau Tic-hydantoïne, les recherches ont été portées sur la chaîne latérale. L'importance des substituants de l'azote a été évaluée sur σ_1 . Dans cette étude, tous les composés synthétisés de la série ont aussi été évalués dans des tests de liaison au site cérébral σ_1 de cochon d'inde en utilisant l'Halopéridol comme ligand de référence. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Pdt	Structure	IC ₅₀ σ_1 (nM) ^a Cochon d'inde
A ₁		16 ± 3
B ₁		>100
B ₂		>1000
B ₃		>100
B ₄		>100

B ₅		32 ± 6
B ₆		23,8 ± 3,7

^a halopéridol : IC₅₀(σ₁) = 1-5 nM

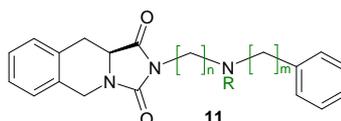
Tableau 2

Cette série permet de confirmer le peu d'influence sur l'affinité du remplacement de la chaîne éthyle par une chaîne propyle (**B₁** et **B₂**, **B₃** et **B₄**).

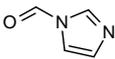
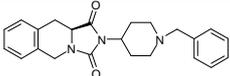
L'introduction du motif benzylpiperazine (**B₅** et **B₆**) permet de conserver une bonne affinité par rapport à celle du composé **A₁**, alors que les autres dérivés pipérazines (**B₁₋₄**), non substitués par un groupement aromatique, ne sont pas affins pour le site étudié. Un second groupement aromatique semble donc nécessaire à l'affinité pour σ₁. Ce qui renforce encore l'hypothèse du modèle pharmacophorique d'Ablordeppey et de Glennon.⁴¹

2.3. Modification des longueurs de part et d'autre de l'azote protonable

Les recherches précédentes ont donc montré que l'atome d'azote protonable entouré par deux groupements hydrophobes était favorable à l'affinité, conformément au modèle pharmacophorique. La structure **C₁** a donc fait l'objet d'étude plus approfondie afin de valider l'importance ou non des longueurs de chaîne de part et d'autre de l'azote protonable. Les résultats sont répertoriés dans le tableau 3. Les composés les plus actifs ont également été testés sur σ₂ de cortex cérébral de rat.



Pdt	n	m	R	IC ₅₀ σ ₁ (nM) ^a Cochon d'inde	IC ₅₀ σ ₂ (nM) ^{a,b} rat	Ratio σ ₂ /σ ₁ ^b
A ₁	/	/	/	16 ± 3	>1000	>60
C ₁	3	1	H	9,6 ± 1,4	>1000	>100
C ₂	3	4	H	10,5 ± 2,0	nd	nd
C ₃	2	1	CH ₃	4,5 ± 0,1	972 ± 41	216
C ₄	2	2	CH ₃	12,6 ± 1,6	nd	nd
C ₅	2	3	CH ₃	13,6 ± 1,9	nd	nd
C ₆	2	4	CH ₃	3,2 ± 0,2	358 ± 60	112
C ₇	2	5	CH ₃	2,9 ± 0,1	>1000	>340
C ₈	3	0	CH ₃	>100	nd	nd
C ₉	3	1	CH ₃	3,9 ± 0,1	502 ± 98	129

C ₁₀	3	2	CH ₃	2,1 ± 0,1	21 ± 11	10
C ₁₁	3	1		>100	nd	nd
C ₁₂	4	1	CH ₃	4,1 ± 0,1	>100	>20
C ₁₃	4	2	CH ₃	9,9 ± 0,1	nd	nd
C ₁₄	5	1	CH ₃	5,0 ± 0,9	81 ± 16	16
C ₁₅	5	2	CH ₃	11,7 ± 0,3	nd	nd
C ₁₆	6	1	CH ₃	9,4 ± 1,8	nd	nd
C ₁₇	6	2	CH ₃	29,5 ± 3,6	nd	nd
C ₁₈				2,4 ± 0,1	24 ± 0,1	10

a halopéridol : IC₅₀(σ₁) = 1-5 nM; IC₅₀(σ₂) = 49 nM. b nd: non déterminé.

Tableau 3

Tous les composés (excepté **C₈**, **C₁₁** et **C₁₇**) sont plus affins que le composé **A₁**, tout en préservant une bonne sélectivité. Il semblerait donc qu'il n'y ait pas de longueur de chaîne minimale nécessaire pour l'affinité. Par contre, une trop longue chaîne entre les 2 noyaux aromatiques semble défavorable (composé **C₁₇** : n = 6 et m = 2).

Les composés **C₃**, **C₇** et **C₁₄** ont une affinité similaire. Il semble donc qu'il n'y ait pas de corrélation directe entre l'affinité et la longueur respective des chaînes des deux côtés de l'atome d'azote central.

Ces résultats ne semblent pas en accord total avec le modèle d'Ablordeppey⁴¹. En effet, celui-ci montre que la longueur optimale de la chaîne entre l'atome d'azote et l'hydantoïne devrait être d'environ 3Å. Tandis qu'une longueur de 8,3Å (m=5) apparaîtrait idéale entre l'atome d'azote et le groupement phényle.

Néanmoins, la perte importante d'affinité pour les composés **C₈** et **C₁₁** confirme la contribution de l'atome d'azote protonable pour la liaison au site σ₁.

Enfin, le dérivé aminé secondaire **C₁** présente une plus faible affinité que son analogue tertiaire méthylé **C₉**.

Des tests de toxicité ont été réalisés sur certaines molécules possédant un IC₅₀ entre 1 et 15nM, pour vérifier la toxicité d'une molécule avec une forte affinité comme le composé **C₉** et avec une plus faible affinité comme le composé **C₅**. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Pdt	Composés	IC ₅₀ (nM) Cochon d'inde	CC ₅₀ (μM)	IS
-----	----------	--	-----------------------	----

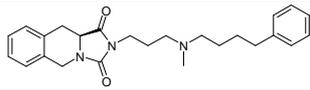
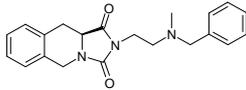
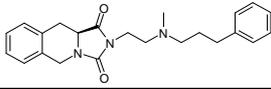
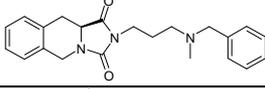
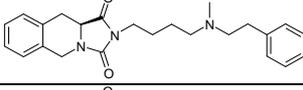
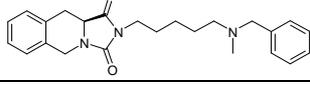
C ₂		10,5±0,1	31±1	2950
C ₃		4,5±0,1	107±4	23770
C ₅		13,6±1,9	136±7	10000
C ₉		3,9±0,1	196±11	50260
C ₁₃		9,9±0,1	106±3	10710
C ₁₄		5,0±0,1	101±20	20200

Tableau 4

Tous les composés ont une IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire alors que les CC₅₀ sont de l'ordre du micromolaire. Les index de sélectivité IS (rapport CC₅₀ sur IC₅₀) sont très bons, tous supérieurs ou égaux à 10000. Le composé le moins affin C₅ possède un IS moyenne par rapport aux autres, alors que le composé C₉ ayant une bonne affinité envers σ_1 possède le meilleur IS.

Les résultats des premières études ont révélé que la configuration R et qu'un noyau thiohydantoïne rendaient la molécule plus active. Les secondes études ont montré que le composé C₉ (figure 48), de par sa faible toxicité et son nombre de degrés de liberté, possédait les longueurs de chaînes idéales autour de l'azote : 3-1.

Le criblage permettant de trouver la structure du composé A comme affine des récepteurs σ_1 et les premières pharmacomodulations en relation avec le modèle d'Ablordepey, ont permis de mettre en valeur le composé C₉ comme une nouvelle tête de série.

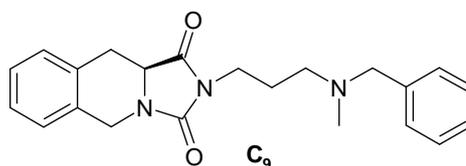


Figure 48

3. Objectif du travail

L'objectif du projet a été de poursuivre cette pharmacomodulation autour de cette tête de série pour ainsi augmenter l'affinité et la sélectivité vis-à-vis de σ_1 . Des études ont été

réalisées d'une part sur la structure Tic-hydantoïne tout en gardant la chaîne latérale intacte et d'autre part sur la chaîne latérale tout en gardant la structure Tic-hydantoïne.

La stéréochimie du carbone asymétrique et le remplacement de l'hydantoïne par une thiohydantoïne ont d'abord été évalués avec la chaîne latérale optimale 3-1. D'autres pharmacomodulations ont ensuite été réalisées autour du noyau Tic-hydantoïne. Notamment, en étudiant l'impact au niveau de l'affinité sur σ_1 , d'une ouverture du cycle tétrahydroisoquinoléine, d'un remplacement de ce noyau par une pyridine ou une tétraline, de la modification de la liaison Tic-hydantoïne et sa fonctionnalisation. Au niveau de la chaîne latérale, nous avons évalué l'importance d'une fonctionnalisation de l'aromatique, du petit groupement sur l'atome d'azote protonable, nécessaire d'après le modèle d'Ablordepey et enfin l'importance d'une rigidification de la chaîne latérale (figure 49).

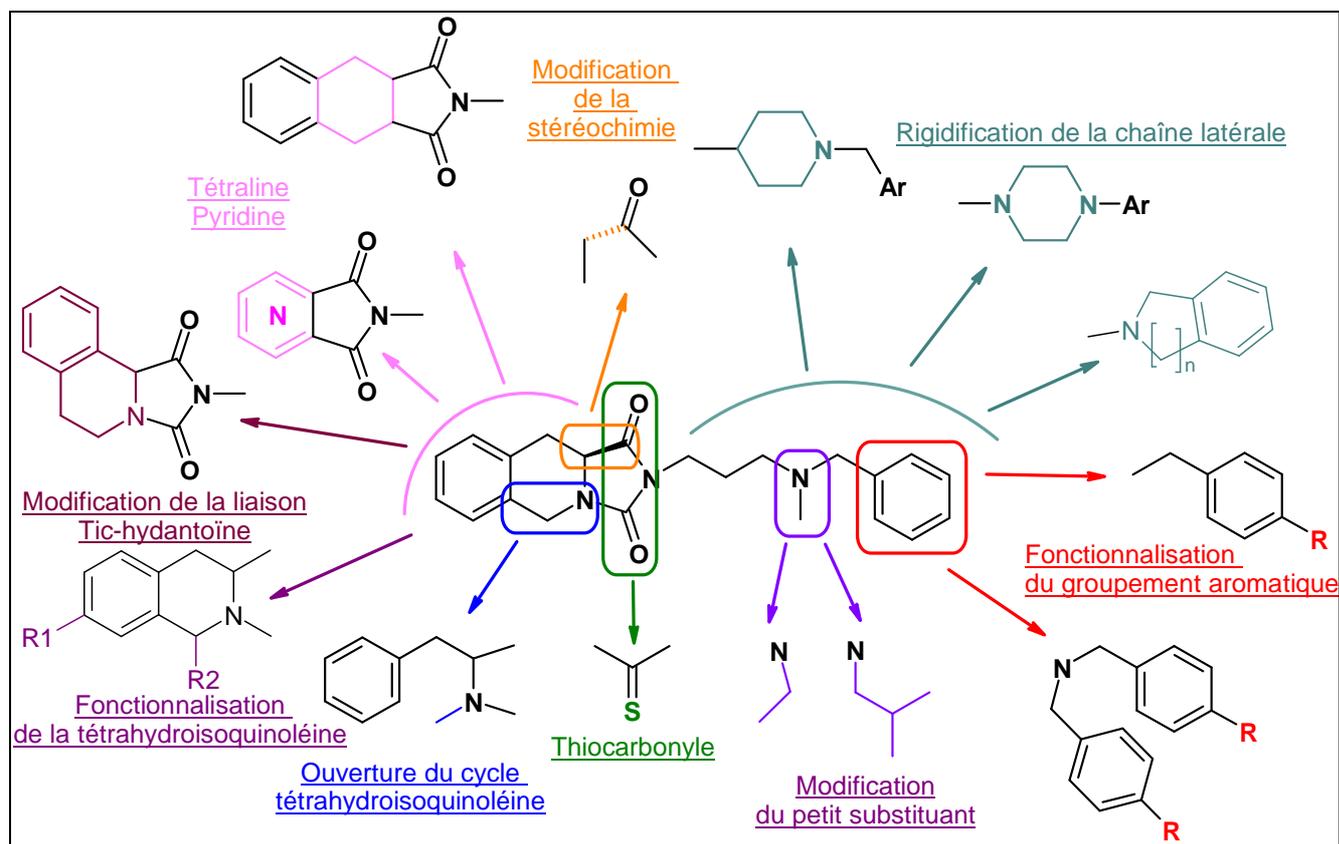
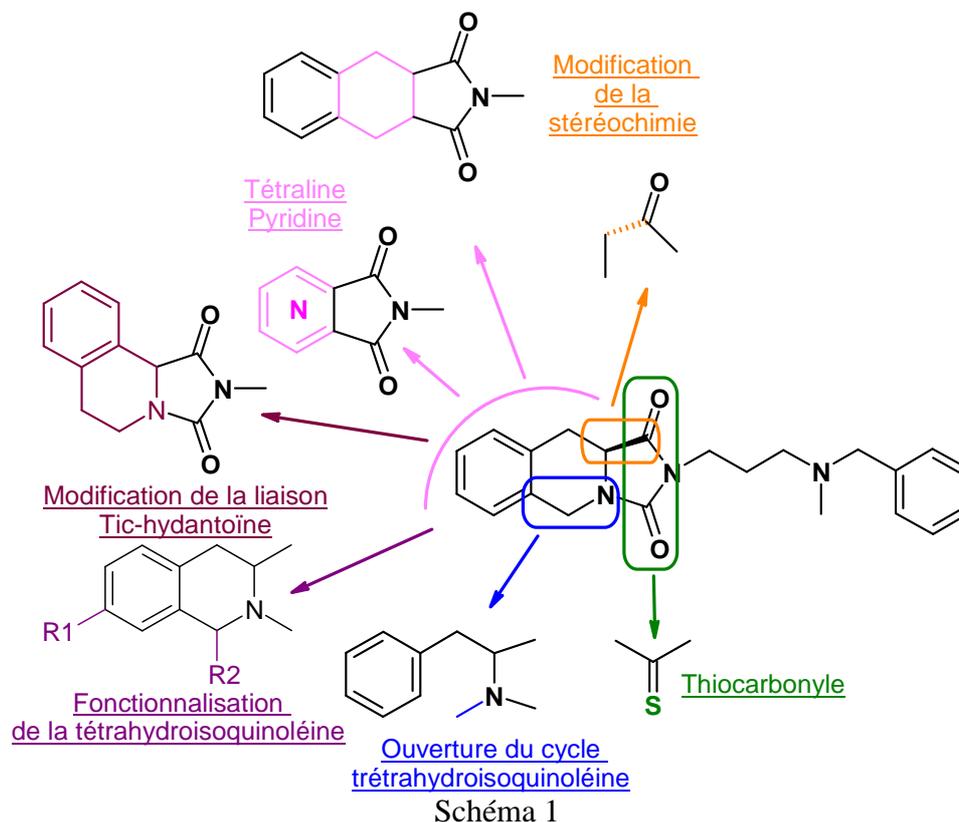


Figure 49 : Pharmacomodulation autour du hit.

Synthèse des ligands sigma : résultats et discussion

I. Modification du noyau Tic-hydantoïne

Afin d'étudier les relations structure-activité de la série, nous avons dans un premier temps évalué l'importance du noyau Tic-hydantoïne pour l'affinité et la spécificité vis à vis de σ_1 . Pour cela, les molécules représentées dans le schéma 1 ont été envisagées et synthétisées.



En préparant ces molécules, nous avons voulu évaluer l'importance de la stéréochimie, de l'introduction d'un groupement plus lipophile (thiohydantoïne, thiocarbonyle), de la rigidification et la fonctionnalisation de la structure tétrahydroisoquinoléine, de la présence et la localisation de l'atome d'azote sur cette structure, et enfin de la modification de la liaison Tic-hydantoïne.

1. Stratégie de synthèse

Plusieurs voies de synthèses ont été envisagées pour permettre d'effectuer les modifications sur la structure Tic-hydantoïne.

Pour synthétiser les composés, trois stratégies de synthèse, utilisées lors des travaux précédents réalisés à l'IBL, ont été étudiées (schéma 2).

La rétrosynthèse A^{119,120} consiste à obtenir le composé voulu à partir d'une substitution nucléophile de la *N*-méthylbenzylamine sur le dérivé halogéné **1** en milieu basique. Cette dernière molécule peut résulter soit d'une attaque de l'azote du composé **2** sur un alcane dihalogéné en milieu basique (voie rétrosynthétique A'), soit d'une cyclisation de l'urée **3** avec le CDI et la DIEA (voie rétrosynthétique A'').

Le composé **2** est obtenu à partir de la Tic-OH qui sera transformée en amide puis cyclisée en présence de CDI et de DIEA. Le composé **3** est formé à partir d'une réaction entre un isocyanate chloré sur la fonction amine de la Tic-OH estérifiée.

Pour la voie rétrosynthétique B^{119,120}, le composé voulu est issu d'une cyclisation en présence de CDI et de DIEA du composé **4**. Ce dernier provient d'un couplage entre la Tic-OH et la diamine dont le précurseur est la 3-amino-1-propanol.

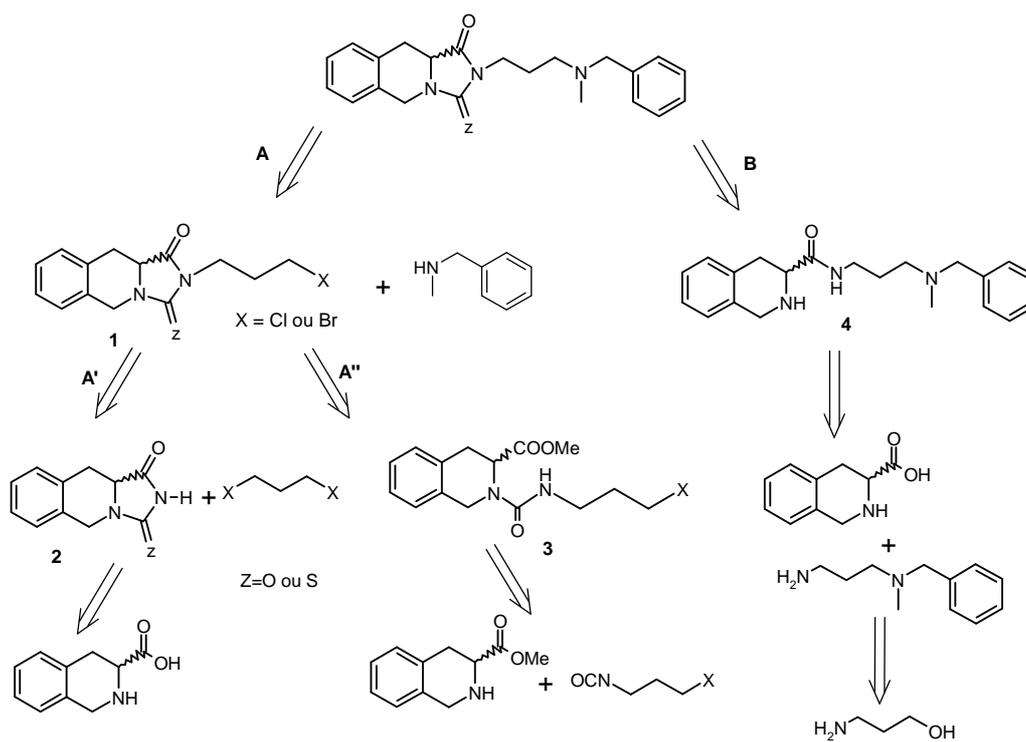


Schéma 2 : stratégies de rétrosynthèse^{119,120}

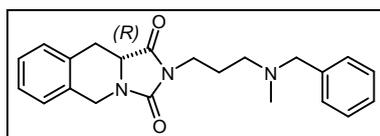
¹¹⁹ Charton, J.; Cazenave Gassiot, A.; Melnyk, P.; Girault-Mizzi, S.; Sergheraert, C. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7081-7085.

¹²⁰ Cazenave Gassiot, A.; Charton, J.; Girault-Mizzi, S.; Gilleron, P.; Debreu-Fontaine, M. A.; Sergheraert, C.; Melnyk, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4828-4832.

Malgré le peu d'étapes de la voie de synthèse A', la dernière étape présente un rendement faible. Pour la voie A'', le 1-isocyanate-3-chloropropane n'est pas disponible commercialement.

Ainsi, pour réaliser la synthèse des ligands, nous avons opté pour la synthèse B qui présente une meilleure efficacité et qui permet d'introduire les modifications lors des dernières étapes de synthèse.

2. Synthèse de l'énantiomère R



2.1. Protection de l'aminopropanol

Le 3-aminopropanol de départ, est d'abord protégé par un groupement *tert*-butoxycarbonyle en présence de Boc_2O à 0°C dans du DCM. Après une nuit sous agitation à température ambiante, le carbamate **5** est isolé avec un rendement de 95% (schéma 3). L'utilisation de ce groupe protecteur a été choisie en raison de sa stabilité dans les conditions réactionnelles. De plus, il est aisément clivé de façon quantitative en milieu acide (pH=3).

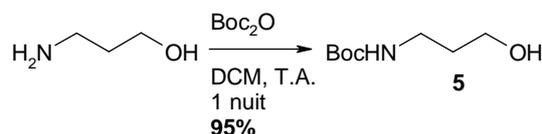


Schéma 3

2.3. Méthylation

L'alcool est ensuite méthylé grâce au chlorure de méthyle en milieu basique au sein du DCM pour conduire au composé **6** avec 95% de rendement (schéma 4). La TEA est utilisée préférentiellement à la DIEA car le sel de triéthylamine est insoluble dans l'acétate d'éthyle et peut donc être éliminé facilement par filtration.

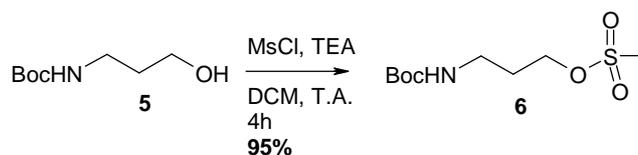


Schéma 4

2.4. Addition de la *N*-méthylbenzylamine

Grâce au groupement partant ainsi formé, la *N*-méthylbenzylamine peut ainsi réagir sur le dérivé mésylé **6** en présence de DIEA dans de l'acétonitrile à 40°C, accédant après 5 jours au composé **7** avec 55% de rendement (schéma 5). Ce résultat modeste mais acceptable s'explique par la difficulté de purification du produit et la faible réactivité de l'amine secondaire benzylique. L'augmentation de la température ne peut néanmoins pas être envisagée pour accélérer la réaction du fait de la dégradation des réactifs.

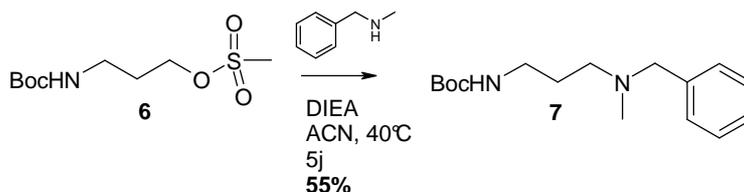


Schéma 5

2.5. Déprotection de l'amine **7**

Enfin, après déprotection dans un mélange équimolaire de TFA/DCM dont le mécanisme est décrit dans le schéma 7, l'amine **8** est obtenue sous forme de sel de TFA de façon quantitative (schéma 6).

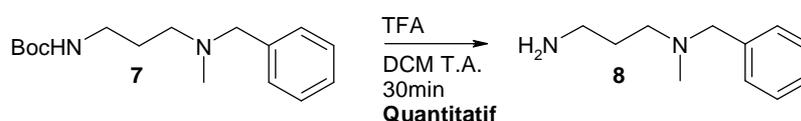


Schéma 6

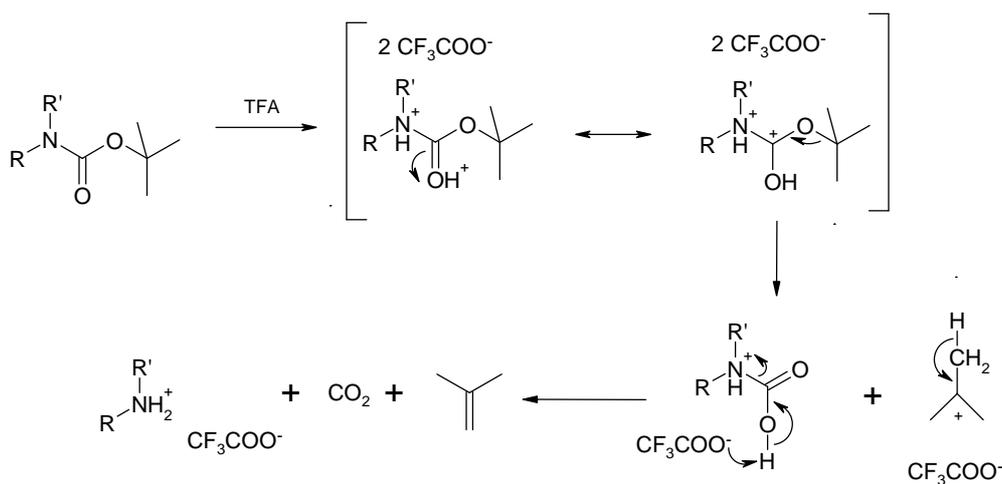


Schéma 7

2.6. Condensation de l'amine 8

La déprotection est suivie par un couplage aminoacide¹²¹ dans du DCM avec un excès de DIEA pour neutraliser l'excédant de TFA de l'étape précédente (schéma 8). Dans un premier temps, l'acide Boc-D-Tic-OH est activé en formant l'ester d'HOBt grâce à HBTU et HOBt d'après le mécanisme du schéma 9. L'amine peut donc dans un deuxième temps réagir sur le carbonyle de l'ester d'HOBt et former le composé **9** avec un rendement de 62% (schéma 9).

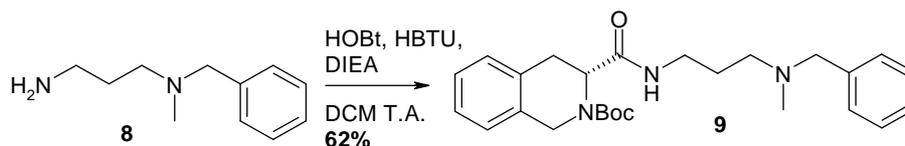


Schéma 8

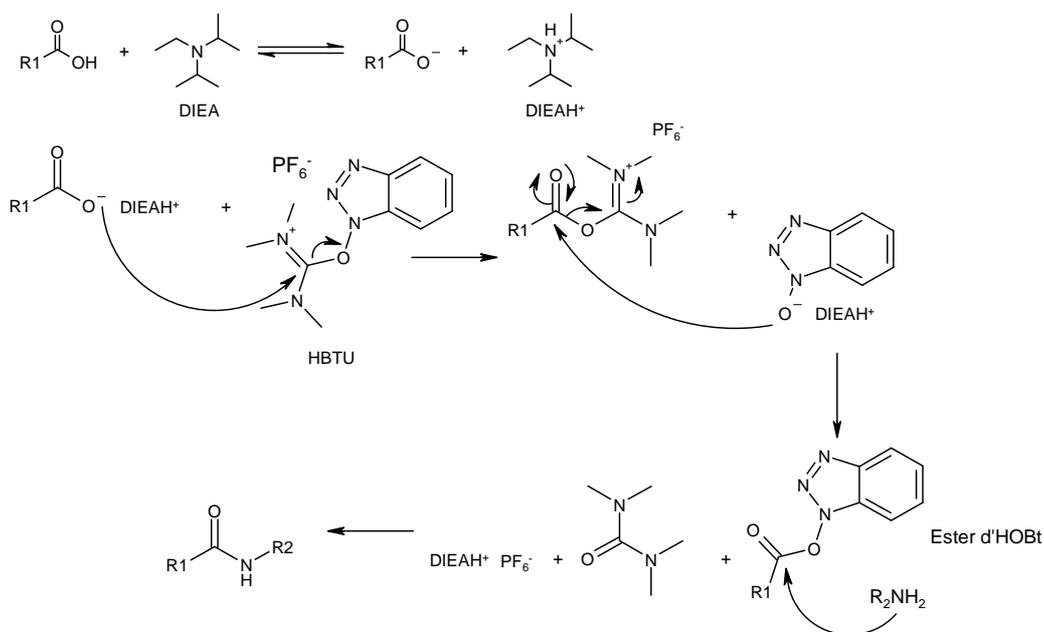


Schéma 9

Malgré la pureté apparente du produit **9**, déterminée par HPLC, et l'identification de la masse vérifiée par MALDI-TOF, le spectre RMN est difficile à interpréter. En effet, les pics de protons sont en coalescence sur le spectre RMN. En réalisant les spectres dans différentes conditions, de température et de solvant, il n'a pas été possible d'obtenir des pics résolus (figure 50).

¹²¹ Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852. Amide bond formation and peptide coupling.

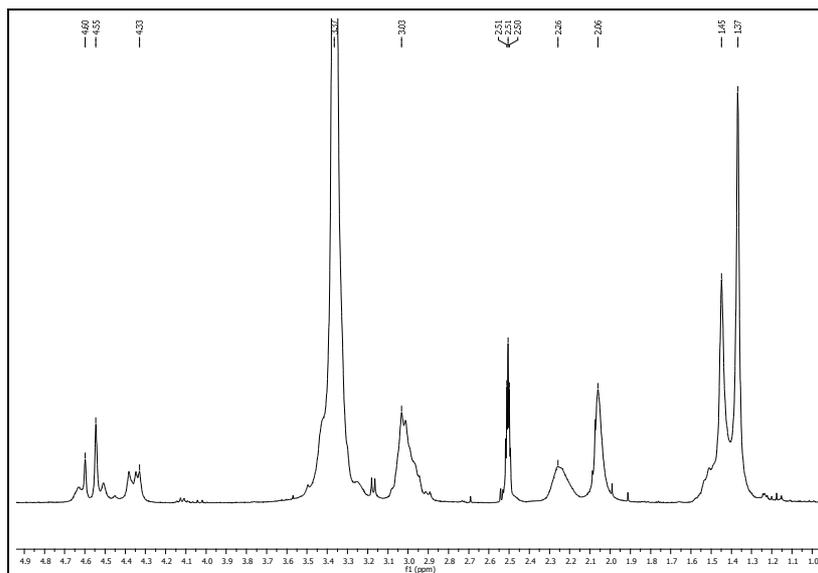


Figure 50 : Spectre RMN¹H du composé **9** (300MHz CDCl₃).

2.7. Déprotection de l'amine **9** suivie de la cyclisation

Afin d'accéder au composé **10**, l'amine **9** est déprotégée par du TFA, puis cyclisée par action de CDI et d'un excès de DIEA au sein du THF, conduisant au composé **10** avec 87% de rendement (schéma 10). La réaction est suivie en HPLC afin de vérifier la disparition du produit intermédiaire, l'imidazolidine, pouvant être isolé et caractérisé si le chauffage est insuffisant (mécanisme réactionnel, schéma 11).

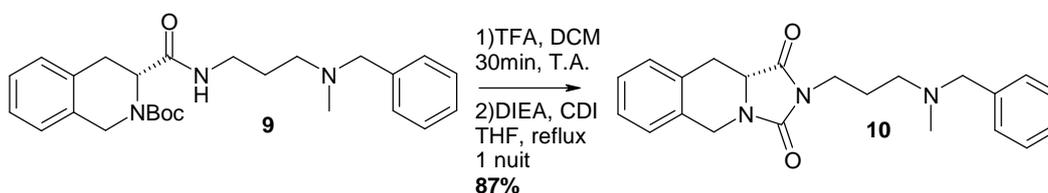


Schéma 10

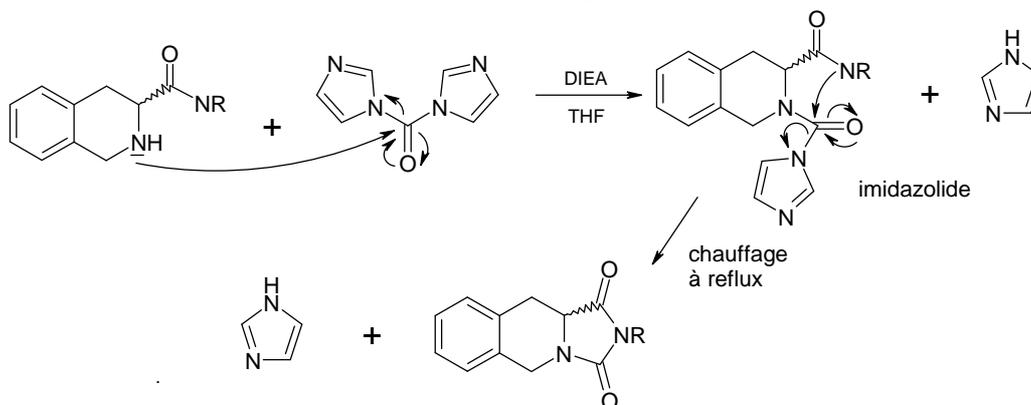


Schéma 11

Le phénomène de coalescence des pics, pour les molécules non cyclisées, se retrouve dans tous les spectres des molécules de cette famille Tic-hydantoïne. En revanche, dès que la molécule est cyclisée, les pics deviennent résolus (figure 51).

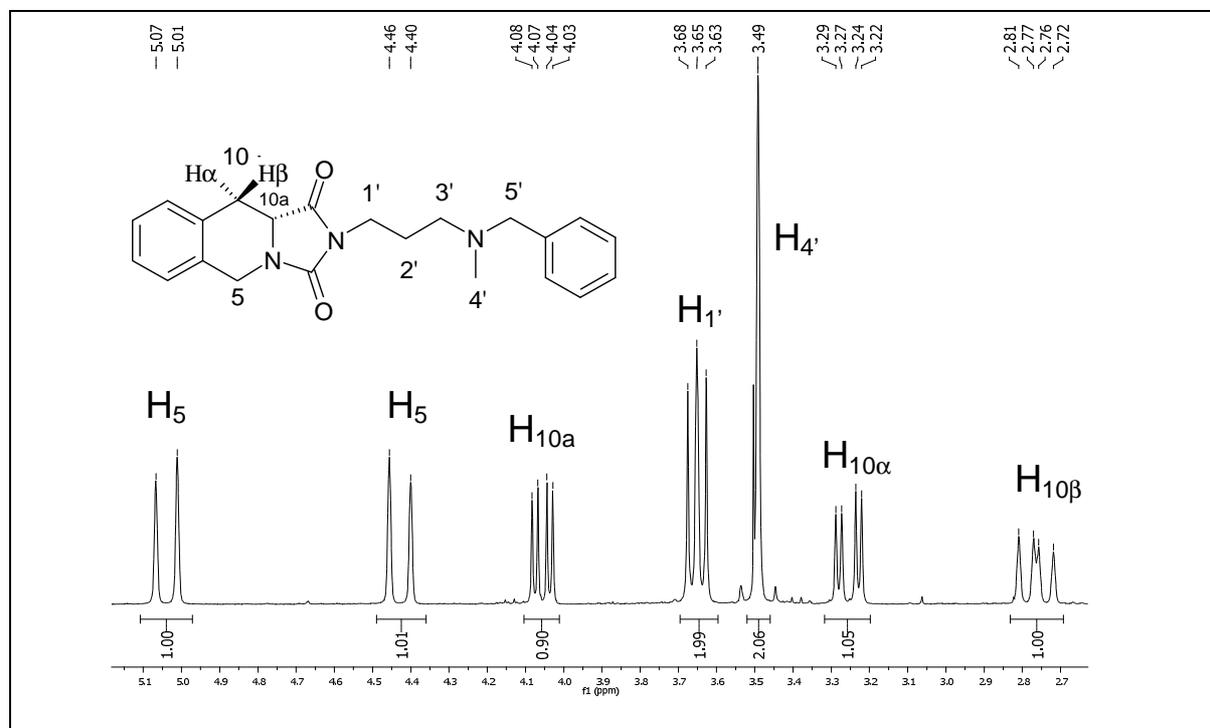


Figure 51 : Spectre RMN¹H du composé 10 (300MHz CDCl₃).

Ce spectre RMN est spécifique à la plupart de nos molécules (celles possédant une structure Tic-hydantoïne). En effet, les protons H₁₀ forment deux doublets de doublets vers 2,75 et 3,25ppm avec des constantes de couplage de $^2J = 16\text{Hz}$, $^3J = 12\text{Hz}$ et $^3J = 4\text{Hz}$. Le pic du proton H_{10a} représente un doublet de doublet vers 4ppm dont les constantes de couplage s'élèvent à $^3J = 12\text{Hz}$ et $^3J = 4\text{Hz}$. Ces constantes de couplage permettent de différencier les deux protons H_{10α} et H_{10β}. En effet, les protons H_{10α} et H_{10a} en anti ont une constante de couplage de 4Hz en revanche celles des protons H_{10β} et H_{10a} en syn s'élèvent à 12Hz. Enfin, les protons H₅ forment deux doublets vers 4,5 et 5ppm avec une constante de couplage de $^2J = 16\text{Hz}$.

La constante de couplage 3J entre les deux protons vicinaux H₁₀ et H_{10a} dépend de la valeur de l'angle dièdre, θ , entre les liaisons C-H. La relation entre l'angle et la constante de couplage est représentée par la courbe de Karplus¹²² (figure 52).

¹²² Karplus, M J. *Chem. Phys.* **1959**, 30, 11-15. Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments.

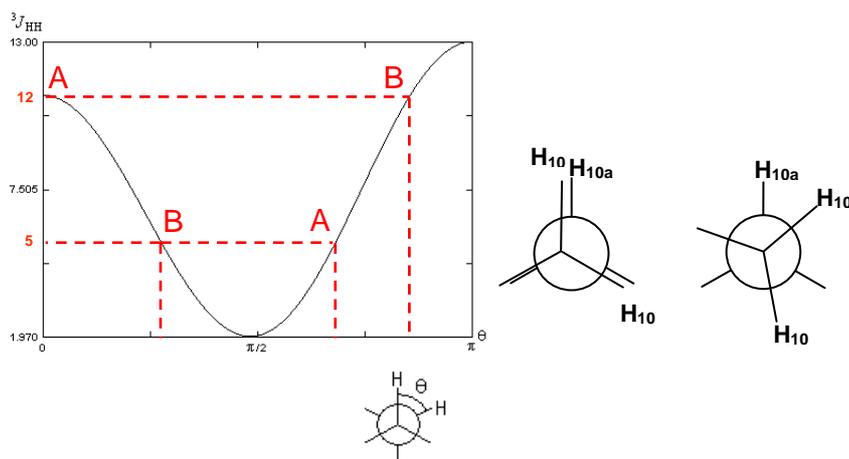


Figure 52 : Courbe de Karplus.

Grâce aux constantes de couplages et à la courbe nous pouvons déterminer les possibilités d'inclinaison des protons H_{10} par rapport à H_{10a} , représentées dans la figure 52. Le proton H_{10a} formerait deux angles de 0° et 120° avec les deux protons H_{10} ou deux angles de 45° et 165° .

2.8. Synthèse de l'énantiomère S

Afin de procéder à des études analytiques de pureté et de stabilité énantiomériques de l'hydantoïne R **10**, nous avons préparé l'énantiomère S **12** (figure 53). Le composé **12** est obtenu, en 7 étapes, suivant le même schéma réactionnel que le composé **10**, en remplaçant le Boc-D-Tic-OH par le Boc-L-Tic-OH avec un rendement global de 26% (schéma 12).

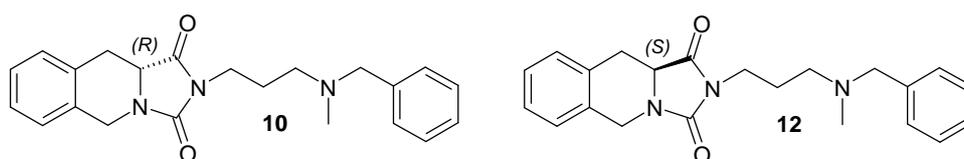


Figure 53

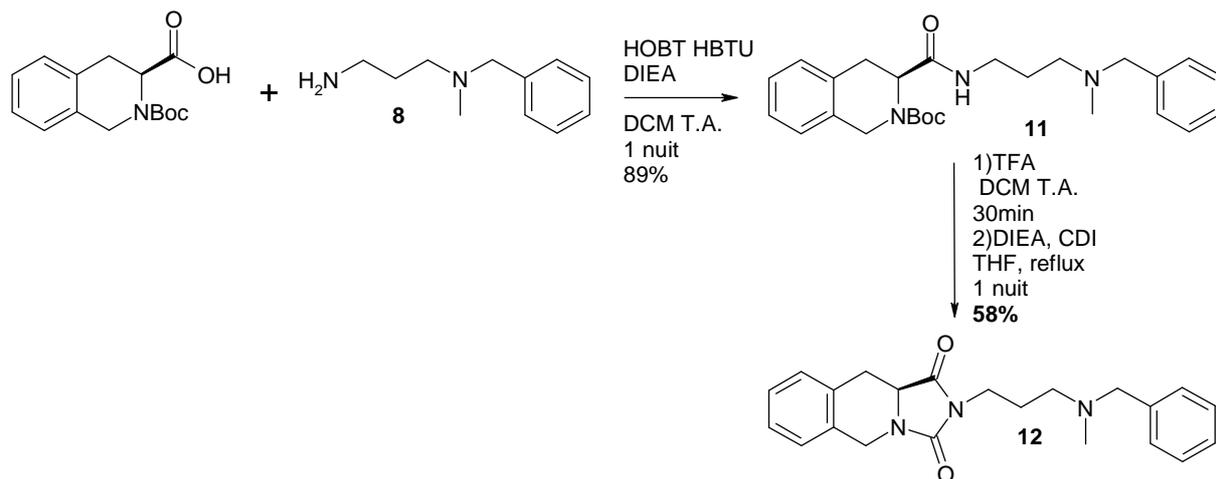
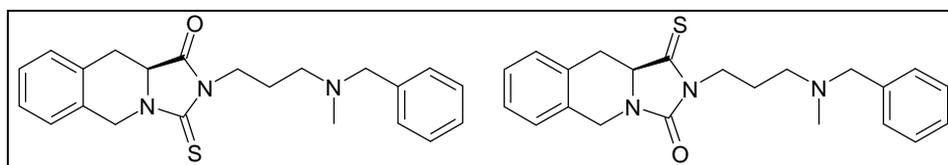


Schéma 12

3. Synthèse des dérivés thiocarbonyles



3.1. Synthèse de l'analogue thiohydantoïne

La synthèse de la thiohydantoïne **13** s'effectue selon le même schéma de synthèse que l'énantiomère S (**12**) (schéma 13), en utilisant l'équivalent soufré du CDI, le thioCDI (figure 54).

Nous obtenons ainsi le composé **13**, malheureusement impur malgré plusieurs tentatives de purification, avec un rendement de 50% pour la dernière étape et un rendement global de 22% sur les 8 étapes.

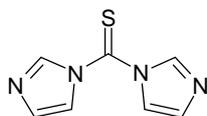
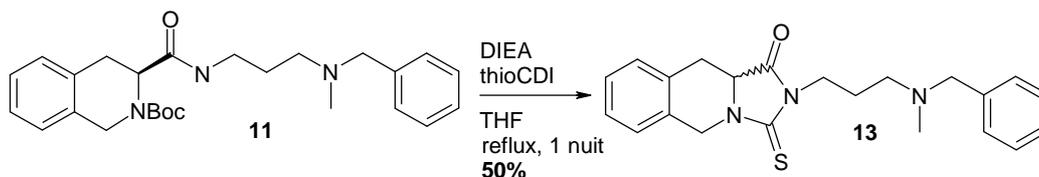
Figure 54 : *N,N*-thiocarbonyldiimidazole (thioCDI).

Schéma 13

3.2. Remplacement du carbonyle par un thiocarbonyle

Dans le but d'évaluer l'importance du deuxième carbonyle dans l'étude des relations structure-activité, nous avons envisagé la synthèse d'un autre analogue soufré, en modifiant le deuxième carbonyle par un thiocarbonyle (schéma 14). Pour ce faire, le composé **12** est mis en présence du réactif de Lawesson (figure 55) au reflux du toluène.¹²³

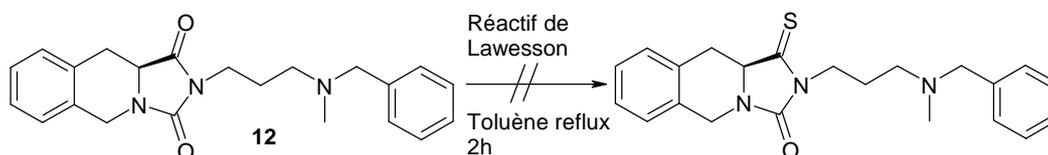


Schéma 14

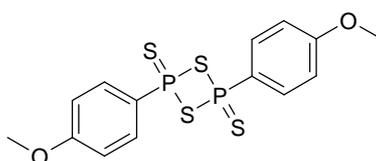
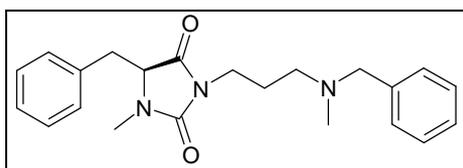


Figure 55 : Réactif de Lawesson.

Nous n'avons pu, malgré les différents essais, isoler le composé désiré. Ceci s'explique par la complexité du milieu réactionnel. Ne disposant plus suffisamment de temps pour effectuer d'autres essais nous nous sommes limités à ces résultats.

4. Synthèse de l'analogue ouvert



4.1. Schéma de synthèse

Pour réaliser la synthèse de l'analogue « ouvert », nous avons suivi la même voie de synthèse que précédemment en utilisant la phénylalanine comme précurseur à la place de l'acide Tic-OH (schéma 15).

¹²³ Bartolomé-Nebreda, J. M.; García-Lopez, M. T.; González-Muñiz, R.; Cenarruzabeitia, E.; Latorre, M.; Del Rio, J.; Rosario, H. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4196-4206. 5-(Tryptophyl)amino-1,3-dioxopiperidino[1,2-c]pyrimidine-Based Potent and Selective CCK₁ Receptor Antagonists: Structure-Activity Relationship Studies on the Central 1,3-Dioxopiperidino[1,2-c]pyrimidine Scaffold

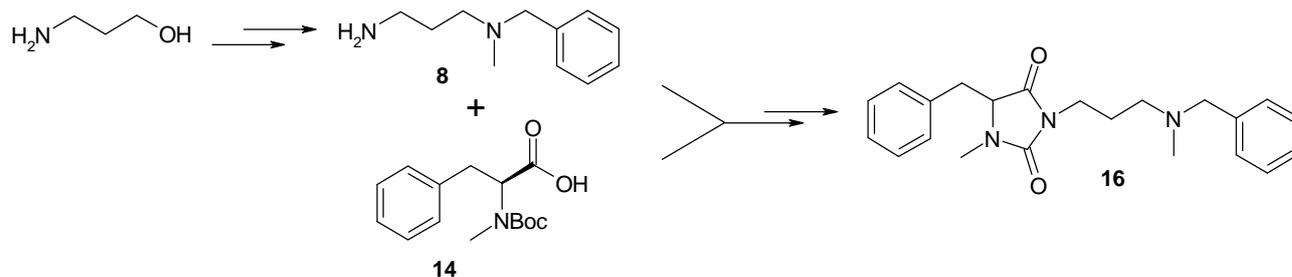


Schéma 15

4.2. Synthèse de la *N,N'*-Boc-méthyl-L-phénylalanine

L'acide aminé, protégé par un groupement *tert*-butoxycarbonyle, est monosubstitué par un méthyle pour conduire au composé **14** avec un rendement de 56% (schéma 16). La substitution se réalise en présence de l'iodure de méthyle en milieu basique selon une procédure décrite par Rivas *et al.*¹²⁴

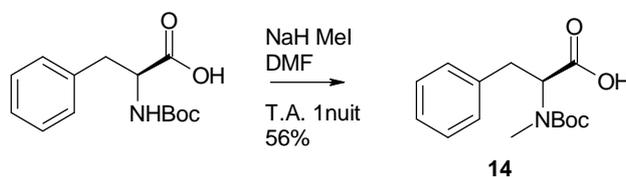


Schéma 16

4.3. Déprotection et condensation de l'amine **8**

L'amine déprotégée **8** est couplée avec l'acide **14** en présence d'HOBt, HBTU et DIEA (schéma 17) pour conduire au composé **15** avec un rendement de 28% (mécanisme schéma 9).

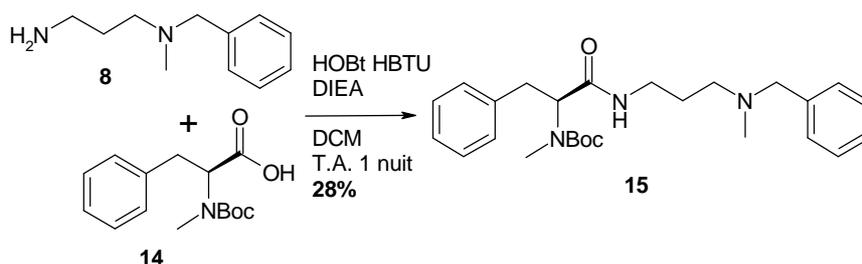


Schéma 17

De même que pour les composés **9** et **11**, malgré la pureté apparente des produits **14** et **15**, déterminée par HPLC, et l'identification de leur masse vérifiée par MALDI-TOF, les spectres RMN sont difficiles à caractériser du fait des effets de coalescence.

¹²⁴ Rivas, L.; Quintero, L.; Fourrey, J. L.; Benhida, R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7639-7642. A short synthesis of aspergillamide B. The marine natural product from *Aspergillus* sp.

4.4. Déprotection de l'amine 15 suivie de la cyclisation

Après déprotection de l'amine du composé **15**, la molécule est cyclisée en présence de CDI et DIEA (schéma 18) pour donner le composé **16** avec un rendement de 36%. Ce résultat modeste, non optimisé, pourrait s'expliquer par une conversion non totale de la réaction de cyclisation.

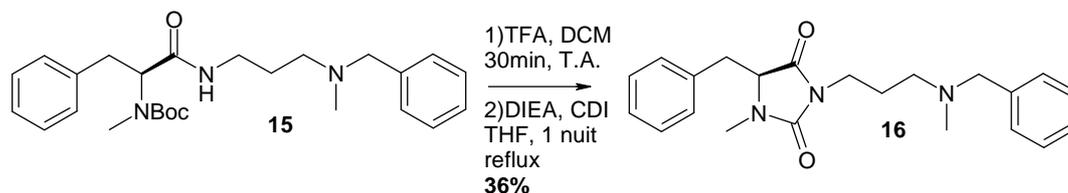
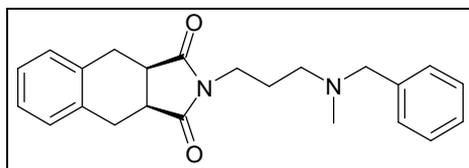


Schéma 18

5. Synthèse du dérivé tétraline



5.1. Stratégie de synthèse

Afin de remplacer le noyau tétrahydroisoquinoléine par une tétraline, nous avons envisagé une nouvelle stratégie de synthèse convergente basée sur la réaction de cycloaddition de Diels-Alder (schéma 19). Le dérivé tétraline **23** serait obtenu par une Diels-Alder entre le diène et le diénophile **20**. Le diène proviendrait du α,α' -dichloro-o-xylène commercial, et le maléimide **20** serait obtenu soit par une réaction de l'amine **8** sur l'anhydride maléique (voie A) soit par une réaction de l'alcool **18** sur le maléimide (voie B).

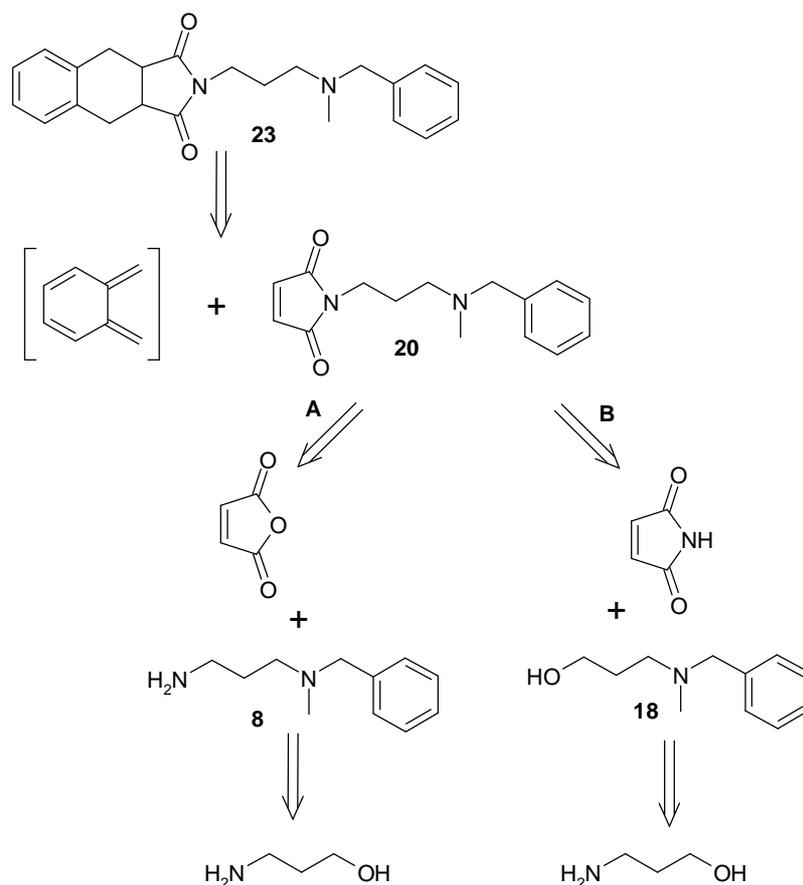


Schéma 19 : Stratégie de rétrosynthèse

Nous avons donc, dans un premier temps, entrepris la préparation des deux précurseurs l'amine libre **8** et l'alcool **18**. Par la suite, nous verrons les différentes voies utilisées pour la synthèse du dérivé maléimide et enfin, nous étudierons la réaction de cycloaddition.

5.2. Synthèse de l'amine libre 8

La stratégie de synthèse A utilise l'amine libre **8**. Il suffit donc de désalifier le sel de TFA obtenu précédemment, en le solubilisant dans un minimum d'H₂O, d'ajouter du NaOH jusqu'à pH basique et d'extraire au DCM. L'amine libre **8** est obtenue avec un rendement de 90%.

5.3. Synthèse de l'alcool 18

La stratégie de synthèse B, en revanche, est réalisée à partir de l'alcool **18** dont le précurseur est l'aminopropanol. Une amination réductrice¹²⁵ en présence de borohydrure de

¹²⁵ Dagan, D. I.; Lowden, C. T. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7575-7577. Solution-phase parallel synthesis of substituted 1,2-ethyl and 1,3-propyl diamines.

sodium et du benzaldéhyde à température ambiante au sein du méthanol (schéma 20), permet d'obtenir l'alcool **17** avec 90% de rendement.

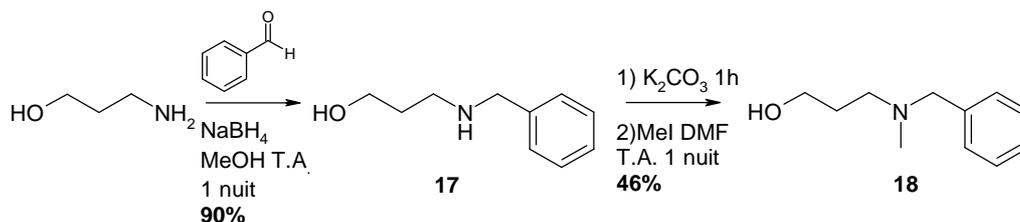


Schéma 20

Le benzaldéhyde réagit d'abord avec l'amine pour former l'imine. Celle-ci est ensuite réduite par le borohydrure de sodium pour former l'amine monosubstituée. Dans un même temps, le benzaldéhyde est réduit en alcool empêchant ainsi la disubstitution (schéma 21).

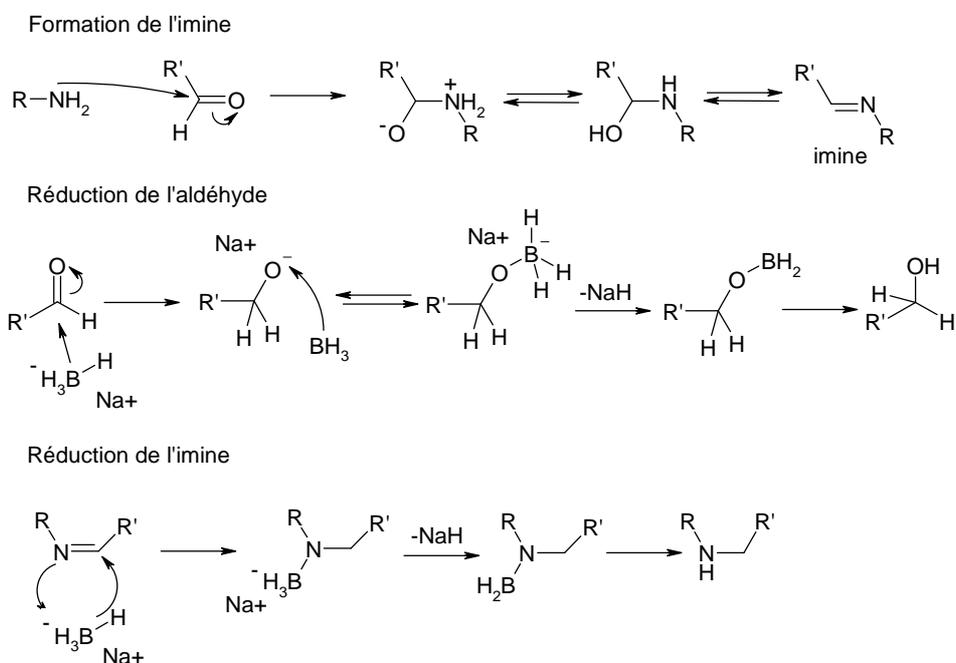


Schéma 21

L'aminoalcool **17** est ensuite méthylié par de l'iodure de méthyle en milieu basique. La réaction n'étant pas totale, le rendement n'excède pas les 46%. Il reste du produit de départ dans le milieu ne réagissant ni au bout de plusieurs jours ni en chauffant. Cette réaction n'est réalisable de manière satisfaisante que sur de petites quantités, de l'ordre de 300mg. C'est pourquoi, nous avons préféré utiliser la méthylbenzylamine, malgré la lenteur de la réaction, pour préparer la diamine **8**. Il est à noter qu'il s'est aussi avéré très difficile de méthyler des azotes dans d'autres types de synthèse (voir partie II § 2.2.f.).

5.4. Synthèse du maléimide substitué

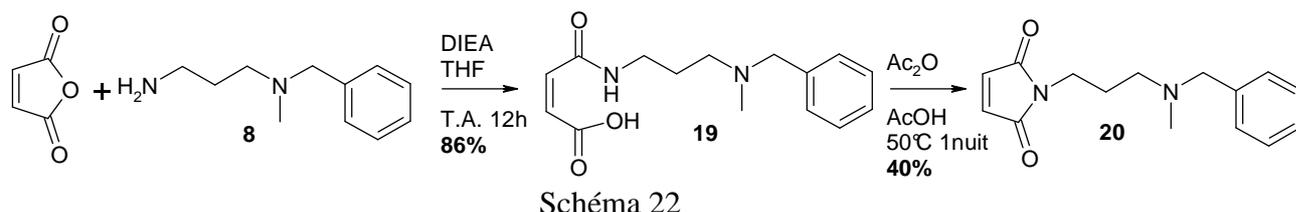
Afin de préparer le maléimide substitué **20**, deux voies de synthèse ont été développées, en partant soit de l'anhydride maléique (voie A) soit du maléimide (voie B).

a) Voie A, précurseur : anhydride maléique

Plusieurs méthodes ont été évaluées pour former le composé **20** à partir de l'anhydride maléique et de l'amine **8**.

Voie A, essai 1:

La première méthode s'effectue en deux étapes. Celle-ci débute par l'ouverture de l'anhydride maléique par le composé **8** suivie d'une réaction de cyclisation (schéma 22). Le couplage amine-anhydride, en milieu basique, conduit à l'acide **19** avec un rendement de 86%. Puis la réaction de cyclisation est réalisée dans l'acide acétique glacial en présence d'anhydride acétique. La réaction est d'abord réalisée à température ambiante, celle-ci n'évoluant pas, nous avons augmenté la température à 50°C. Le rendement reste un peu faible 40%, du fait de la présence de nombreux produits secondaires empêchant une bonne purification. Le rendement global de ces deux réactions est de 34%.



Voie A, essai 2:

Une deuxième méthode est alors envisagée.^{126,127} L'amine et l'anhydride maléique sont dissous dans un mélange d'acide acétique (schéma 23). La réaction a d'abord été réalisée à température ambiante comme précédemment mais aucune évolution n'a été observée. Nous avons donc chauffé le milieu à 50°C et obtenu le dérivé maléimide **20** avec un rendement de 32%. Ce faible rendement pourrait s'expliquer par la présence du produit de départ qui n'aurait pas réagi avec l'anhydride maléique.

¹²⁶ Robertson, A.; Philp, D.; Spencer, N. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11365-11384. Recognition-induced control of Diels-Alder cycloaddition.

¹²⁷ Stewart, S. G.; Polomska, M. E.; Lim, R. W. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2241-2244. A concise synthesis of maleic anhydride and maleimide natural products found in *antrodia camphorata*.

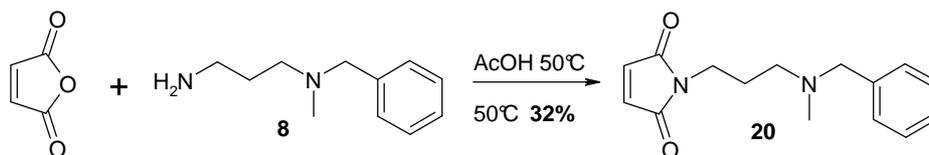


Schéma 23

Voie A, essai 3:

Au vue de ces résultats, une troisième méthode,¹²⁸ en deux étapes, a été étudiée. L'amine réagit avec l'anhydride maléique dans du DCM à température ambiante pendant 1h. Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite, et repris dans de l'ACN. Après ajout du chlorotriméthylsilane en milieu basique, le milieu est chauffé à 80°C pendant 1h. Nous isolons ainsi le dérivé maléimide **20** avec un rendement de 25% (schéma 24).

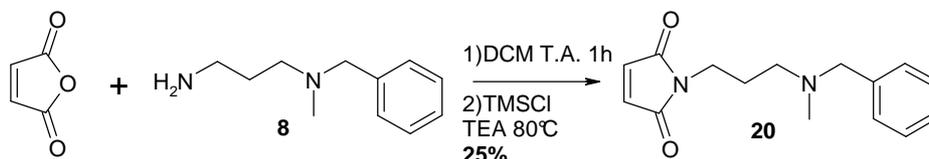


Schéma 24

b) Voie B, précurseur : maléimide

Les essais avec l'anhydride maléique n'étant pas concluants, nous avons donc envisagé de partir sur d'autres précurseurs : le maléimide et l'alcool **18**.

Voie B, essai 1:

Le dérivé maléimide **20** est obtenu par une réaction de Mitsunobu de l'alcool **18** sur le maléimide. Ce type de réaction a prouvé son utilité dans une variété de synthèse impliquant des alcools.¹²⁹ Elle comprend 3 étapes (schéma 25) :

- (1) formation du zwitterion
- (2) activation de l'alcool
- (3) réaction SN2

¹²⁸ Dubowchik, G. M.; Radia, S.; Mastalerz, H.; Walker, M. A.; Firestone, R. A.; King, H. D.; Hofstead, S. J.; Willner, D.; Lasch, S. J.; Trail, P. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1529-1532. Doxorubicin immunoconjugates containing bivalent, lysosomally-cleavable dipeptide linkages.

¹²⁹ Hughes, D. L.; Reamer, R. A.; Bergan, J. J.; Grabowski, E. J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6487-6491. A mechanistic study of Mitsunobu esterification reaction.

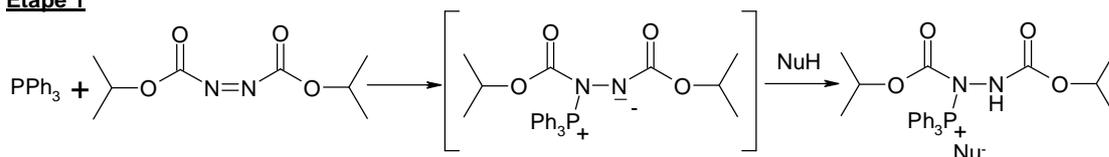
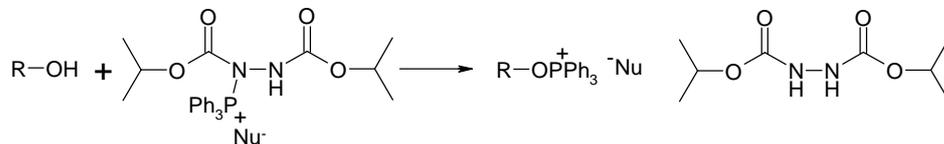
Etape 1**Etape 2****Etape 3**

Schéma 25

D'après le mécanisme et la réactivité des produits, l'ordre d'introduction des réactifs est très important. En effet, la triphénylphosphine est un bon nucléophile, capable d'attaquer les doubles liaisons. Le diisopropylazodicarboxilate (DIAD) doit donc être introduit en premier pour former le complexe PPh_3DIAD avant l'ajout du maléimide.

Un premier essai a donc été réalisé en introduisant le PPh_3 et le DIAD dans du THF distillé à -78°C . Après quelques minutes de temps de contact, le maléimide et l'alcool sont ajoutés goutte à goutte à -78°C . La réaction revient ensuite à température ambiante. Malheureusement nous obtenons le produit désiré avec un rendement très faible de 6%.

Ce faible rendement serait dû au complexe PPh_3DIAD qui inhiberait la réaction en réagissant sur le maléimide (schéma 26).¹³⁰ Ce phénomène a été observé par Hughes et *al*¹²⁸ et Castro et *al*¹³¹ en étudiant des acides carboxyliques ou des sulfamides cycliques qui formeraient un complexe inerte avec PPh_3DEAD .

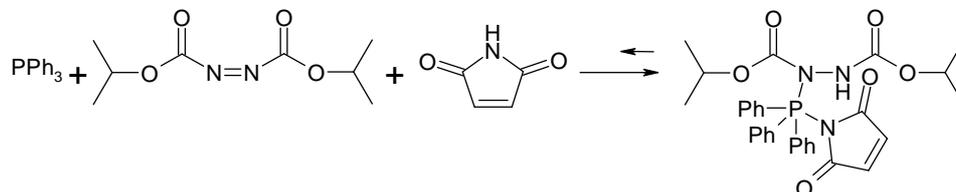


Schéma 26

¹³⁰ Walker, M. A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5352-5355. A high yielding synthesis of *N*-alkyl maleimides using a novel modification of Mitsunobu reaction.

¹³¹ Castro, J. L.; Matassa, V. G. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2289-2291. Mitsunobu-like processes with a novel triphenylphosphine-cyclic sulfamide betain.

Afin de palier à ce problème, Hughes et Castro utilisent un excès l'alcool qui réagit sur le surplus de PPh_3DIAD . Le maléimide peut donc être ajouté sans risquer d'être désactivé par le complexe (schéma 27).

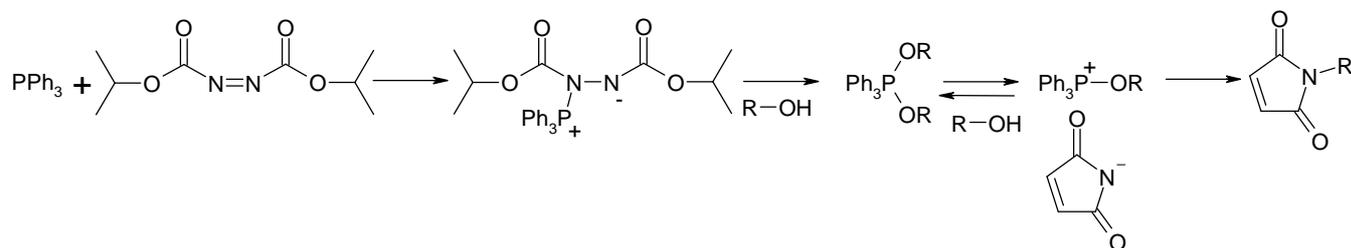


Schéma 27

Dans notre cas, l'alcool **18** n'étant pas commercial et sa préparation nécessitant deux étapes avec un rendement global de 41%, nous avons donc préféré ajouter 0,5 équivalent d'un alcool encombré, le néopentylalcool (figure 56), en plus de l'alcool **18**. Le néopentylalcool réagirait ainsi sur l'excès de PPh_3DIAD . Des études ont montré une nette amélioration des rendements en ajoutant cet alcool, au lieu d'utiliser uniquement l'alcool désiré.^{129,132}

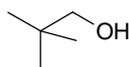


Figure 56 : Néopentylalcool

Voie B, essai 2:

Un deuxième essai a donc été réalisé en ajoutant d'abord PPh_3 et DIAD à -78°C , puis l'alcool **18**. Après quelques minutes de temps de contact, 0,5 équivalent de néopentylalcool est additionné. Enfin, le maléimide est ajouté goutte à goutte à -78°C . Après une nuit à température ambiante, le dérivé maléimide est obtenu avec 33% de rendement (schéma 28). Celui-ci bien que fortement amélioré reste néanmoins faible. Les effets de π -stacking de l'oxyde de triphénylphosphine avec le composé **20** rendent la séparation difficile.

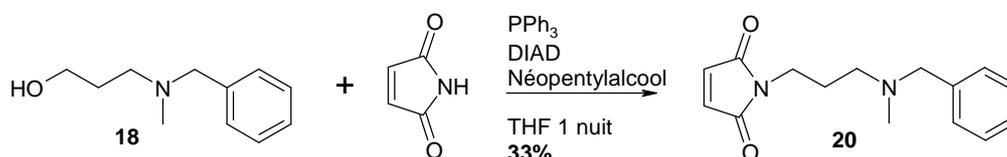


Schéma 28

¹³² King, D. H.; Dubowchik, G. M.; Walker, M. A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 1987-1990. Facile synthesis of maleimide bifunctional linkers.

Voie B, essai 3:

Une dernière méthode, ayant comme précurseur le maléimide, a été testée. Le composé **20** serait obtenu en deux étapes : le méthylchloroformate réagirait avec le dérivé maléimide pour former le *N*-(méthoxycarbonyl)maléimide, puis ce dernier, en présence de l'amine **8** en milieu basique formerait le composé voulu **20** (schéma 29).¹³³

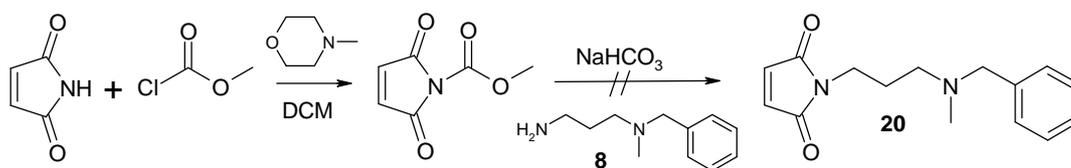
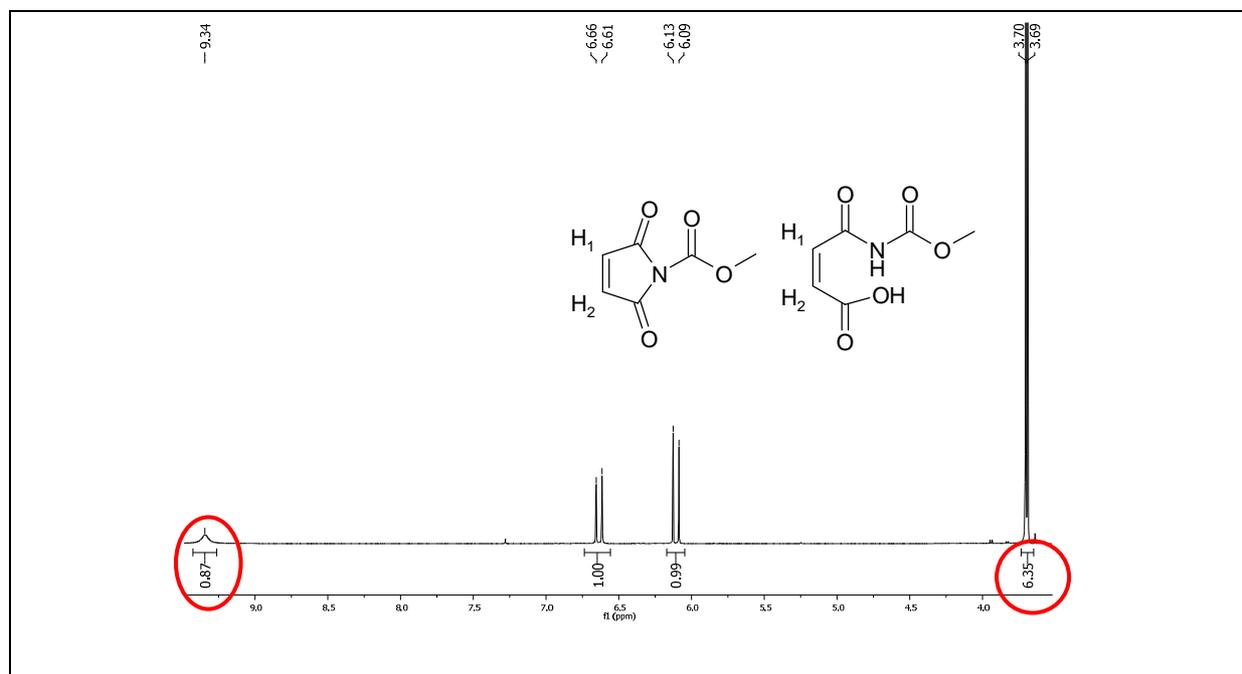


Schéma 29

Lors de la première étape, nous obtenons un produit ne correspond pas au produit attendu en RMN. En effet le pic correspondant au méthyle possède une intégration de 6 au lieu de 3 et un pic supplémentaire est présent vers 9,5ppm qui ne correspond à aucun proton du composé. De plus les protons H₁ et H₂ ne forment pas de singulet mais 2 doublets (figure 57). Ce phénomène serait probablement dû à une ouverture partielle du composé.

Figure 57 : Spectre RMN¹H (300MHz CDCl₃).

¹³³ Wakisaka, K.; Arano, Y.; Uezono, T.; Akizawa, H.; Ono, M.; Kawai, K.; Ohomomo, Y.; Nakayama, M.; Saji, H. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2643-2652. A Novel Radioiodination Reagent for Protein Radiopharmaceuticals with L-Lysine as a Plasma-Stable Metabolizable Linkage To Liberate m-Iodohippuric Acid after Lysosomal Proteolysis.

Ce même phénomène se retrouve lorsque nous utilisons du chloroformiate d'éthyle à la place du chloroformiate de méthyle (schéma 30).

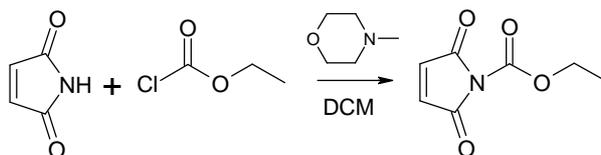


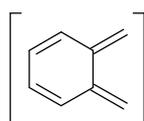
Schéma 30

Les HPLC et les RMN des produits de départ n'ont révélé aucune impureté, n'expliquant pas le problème rencontré en RMN pour ces deux réactions. La deuxième partie de la réaction a quand même été tentée. Le composé est mis en contact avec l'amine dans une solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La réaction est suivie en LC-MS, aucun produit n'est visible en masse, nous n'observons que des produits de dégradation.

Malgré l'étude de plusieurs conditions nous n'obtenons pas de bons rendements, de l'ordre de 30%. Ces réactions *a priori* simples en théorie, possèdent en pratique des résultats médiocres, il serait donc nécessaire de rechercher de nouvelles conditions opératoires susceptibles d'améliorer les rendements.

5.5. Réaction de cycloaddition de Diels-Alder

Le dérivé maléimide **20** réagit sur le diène *o*-quinodiméthane (figure 58) grâce à une réaction de cycloaddition de Diels-Alder pour former le composé voulu **23**.

Figure 58 : *o*-quinodiméthane.

Parmi les différentes méthodes de synthèse de l'*o*-quinodiméthane, plusieurs approches sont envisageables¹³⁴ (schéma 31).

¹³⁴ Kotha, S.; Ghosh, A. K. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10833-10841. Cycloaddition approach to benzo-annulated indane-based α -amino acid derivatives.

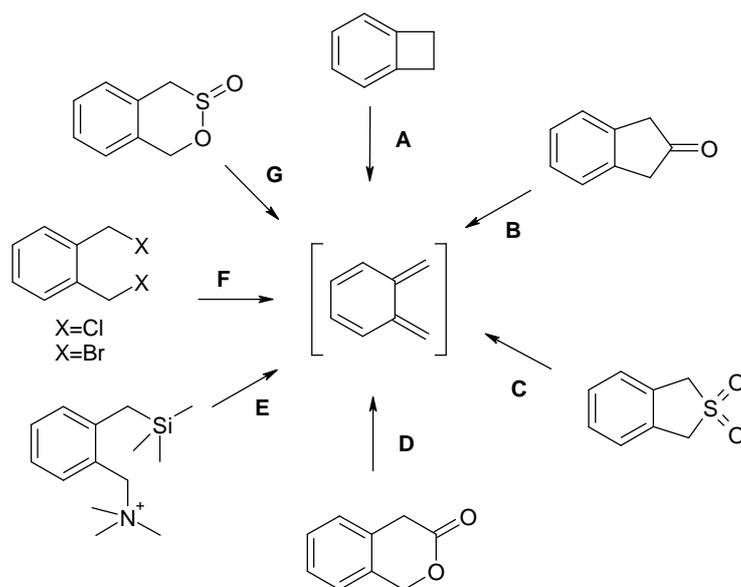


Schéma 31

L'*o*-quinodiméthane peut être préparé à partir du benzocyclobutène (voie A),¹³⁵ de l'indanone (voie B),¹³⁶ du dérivé sulfone (voie C),¹³⁷ de la 3-isochromanone (voie D),¹³⁸ de l'ammonium (voie E),¹³⁹ du dérivé halogéné (voie F)¹⁴⁰ et du sulfone (voie G).¹⁴¹

Pour les voies A, B, C et D les synthèses se réalisent dans des conditions assez difficiles, à de très hautes températures dans des tubes scellés. En ce qui concerne la voie E, la synthèse du précurseur se fait en quatre étapes.¹³⁹

Nous avons donc choisi de tester d'abord la voie F. Le α,α' -dichloro-*o*-xylène est dissout dans du DMF en présence de NaI à 65°C (schéma 32). Le dérivé diiodé se forme mais une décomposition du produit est observée ne pouvant générer l'*o*-quinodiméthane et donc former le dérivé tétraline. Apparemment, un certain degré de stabilisation du composé par certains substituants sur l'aromatique serait requis comme un groupement donneur en ortho de la liaison CH₂Cl (alcool, éther).¹⁴⁰

¹³⁵ Mehta G.; Kotha, S. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 625-659. Recent chemistry of benzocyclobutenes.

¹³⁶ Fujiwara, M.; Mishima, K.; Tamai, K.; Tanimoto, Y. *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 4912-4915. Spectroscopic studies on photochemical formation of *o*-xylylene in solution.

¹³⁷ Carly, P. R.; Govaerts, T. C.; Cappelle, S. L.; Compennolle, F.; Hoornaert, G. J. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 4203-4212. 1,3-Dihydro-2,2-dioxothieno[3,4-*c*]pyridines as precursors for pyridine *o*-quinodimethane systems.

¹³⁸ Tamura, Y.; Wada, A.; Sasho, M.; Kita, Y. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *21*, 4283-4286. Cycloaddition of homophthalic anhydride: A new and simple route to linearly condensed phenolic compounds.

¹³⁹ Ito, Y.; Nakatsuka, M.; Saegusa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7609-7622. Syntheses of polycyclic ring systems based on the new generation of *o*-quinodimethanes.

¹⁴⁰ Kerdesky, F. A. J.; Ardecky, R.; Lakshmikantham, M. V.; Cava, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1992-1996. Simple *o*-quinodimethane route to (+)-4-demethoxydaunomycinone.

¹⁴¹ Hoey, M. D.; Dittmer, D. C. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1947-1948. A convenient synthesis of 1,4-dihydro-2,3-benzoxathiin 3-oxide, a useful precursor of *o*-quinodimethane.

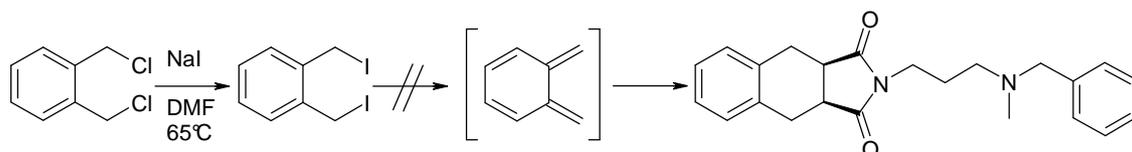


Schéma 32

La voie G a ensuite été étudiée. L'*o*-quinodiméthane serait généré à partir du sultine **21** (schéma 33).

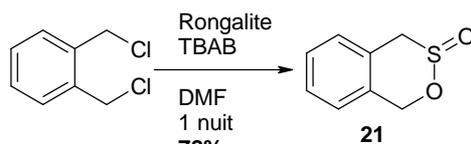


Schéma 33

Le α,α' -dichloro-*o*-xylène réagit avec la rongalite (hydroxyméthanesulfinate de sodium hydraté) et le TBAB¹⁴¹ à température ambiante pour former le sultine avec un rendement de 78%. La formation du sultine débute par une substitution nucléophile, la rongalite réagit sur le α,α' -dichloro-*o*-xylène pour former le sulfinate, suivie d'une réaction intramoléculaire.

Le sultine est ensuite chauffé dans du toluène à 80°C en présence d'un diénophile. Par cet apport calorifique, le sultine se décompose en *o*-quinodiméthane pouvant ainsi réagir avec le diénophile et donner le produit attendu. L'avantage de cette méthode, par comparaison aux autres stratégies de synthèse, est de travailler à une température peu élevée, permettant ainsi d'éviter la polymérisation de l'*o*-quinodiméthane.

Nous avons d'abord testé la réaction sur un diénophile disponible commercialement, le *N*-éthylmaléimide (schéma 34), conduisant au composé **22** avec 28% de rendement.

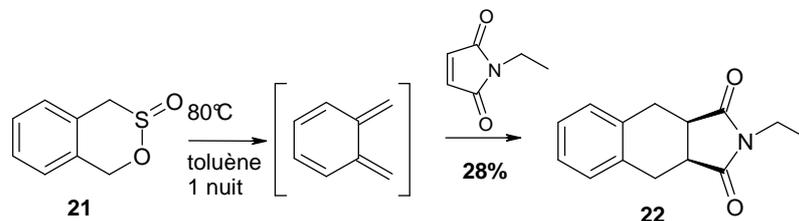


Schéma 34

La réaction a ensuite été réalisée sur le diénophile **20** pour conduire au composé **23** avec un rendement de 52% (schéma 35).

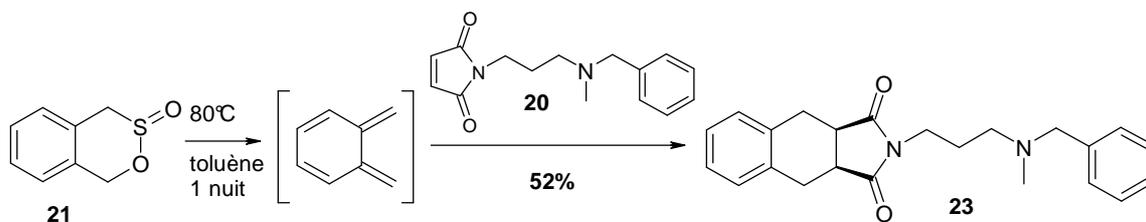


Schéma 35

Après plusieurs essais infructueux, nous avons donc synthétisé avec succès le dérivé tétraline par une cycloaddition de Diels-Alder à partir du précurseur clé : le sultine **21**.

6. Déplacement de l'atome d'azote sur le noyau tétrahydroisoquinoléine

En vu d'étudier l'importance de la position de l'atome d'azote sur la structure Tichydantoïne, les 2 composés suivants ont été préparés (figure 59). De plus, étant *a priori* moins hydrophobes que les dérivés tétrahydroisoquinoléines, ces composés ont aussi un intérêt dans l'étude du caractère hydrophobe des substituants de part et d'autre de l'azote protonable proposés par le modèle de Glennon.⁴¹

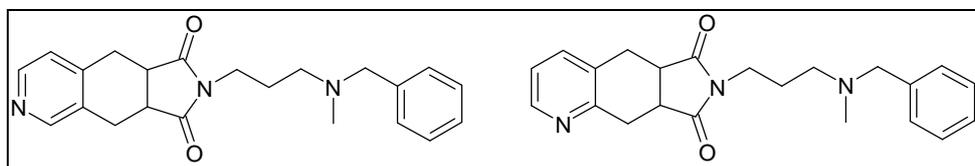


Figure 59

6.1. Stratégie de synthèse

Nous nous sommes basés sur une réaction de cycloaddition, selon le même schéma de synthèse décrit précédemment (Schéma 36).

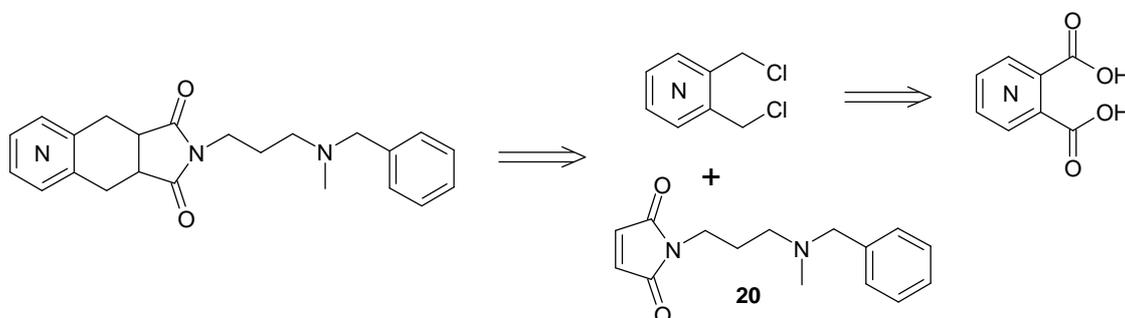


Schéma 36

6.2. Synthèse du dérivé chloré

La 2,3-bis(chlorométhyl)pyridine n'étant pas disponible commercialement, celle-ci est préparée en trois étapes selon les conditions décrites par Yoshiizumi *et al.*¹⁴² Le diacide est d'abord estérifié en présence de MeOH en milieu acide avec un rendement de 81%. Le diester **24** ainsi obtenu est réduit en alcool par action du borohydrure de sodium dans l'EtOH à reflux conduisant au dialcool **25** avec un rendement de 64%. Ce dernier est engagé dans une réaction d'halogénéation grâce au chlorure de thionyle au reflux du DCM pour donner le composé désiré **26** avec un rendement de 86% (schéma 37).

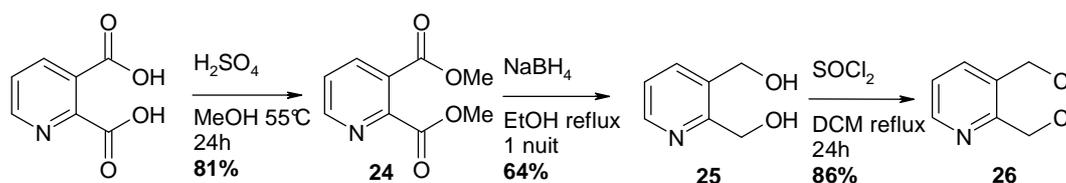


Schéma 37

Parallèlement, l'analogue 3,4-bis(chlorométhyl)pyridine **29** est synthétisé selon la même méthode (schéma 38). Les rendements sont plus modestes, en raison de la plus faible réactivité des produits. En effet, pour l'estérification, la réaction est 4 fois plus longue pour former l'ester **27** que pour l'ester **24**.

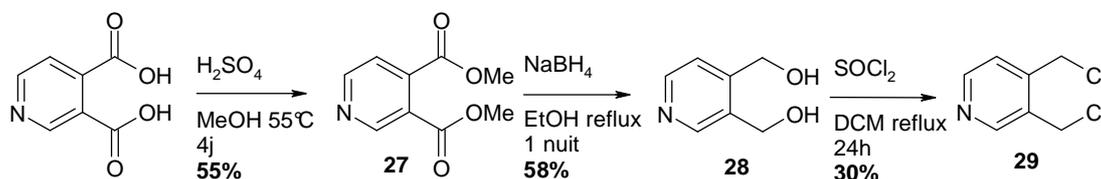


Schéma 38

6.3. Cycloaddition de Diels-Alder

Nous avons envisagé de préparer, comme précédemment le dérivé sultine dans le but de réaliser la réaction de cycloaddition de Diels-Alder. Le dichloré **26** est dissout dans du DMF en présence de TBAB et de rongalite (schéma 39). Malheureusement nous n'observons aucune évolution de la réaction, nous isolons uniquement le produit de départ.

¹⁴²Yoshiizumi, K.; Yamamoto, M.; Miyasaka, T.; Ito, Y.; Kumihara, H.; Sawa, M.; Kiyoi, T.; Yamamoto, T.; Nakajima, F.; Hirayama, R.; Kondo, H.; Ishibushi, E.; Ohmoto, H.; Inoue, Y.; Yoshino, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 433-450. Synthesis and structure–Activity relationships of 5,6,7,8-Tetrahydropyrido[3,4-*b*]pyrazine-based hydroxamic acids as HB-EGF shedding inhibitors.

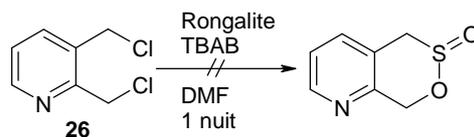


Schéma 39

Suite à ces résultats, nous avons testé une autre méthode. Le composé **26** est dissout dans du DMF à 65°C en présence de NaI (schéma 40).¹⁴³ Cette réaction conduit, cette fois-ci, à des produits de dégradation, sans observer l'intermédiaire iodé.

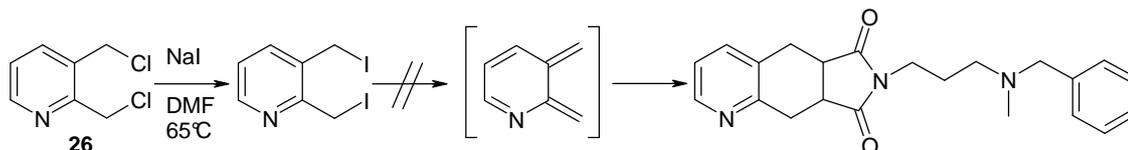


Schéma 40

Le même phénomène a été observé quand le DMF est remplacé par l'acétone. L'atome d'azote ne stabilise pas l'intermédiaire diiodé.

Malgré les différents essais, nous n'avons pas réussi à obtenir les composés désirés. Ne disposant pas d'assez de temps, nous n'avons pas étudié d'autres voies d'accès basées sur différents précurseurs comme par exemple le benzocyclobutène, l'indanone, le dérivé sulfone, la 3-isochromanone, l'ammonium (schéma 31).

7. Remplacement du noyau tétrahydroisoquinoléine par une pyridine

Afin d'étudier l'importance du noyau Tic-hydantoïne et la localisation de l'atome d'azote, nous avons également procédé à une modification du noyau tétrahydroisoquinoléine par une pyridine. Nous avons ainsi préparé les composés **30** et **31** (figure 60). De même, étant *a priori* moins hydrophobes que les dérivés tétrahydroisoquinoléines, ces composés présentent aussi un intérêt dans l'étude du caractère hydrophobe des substituants proposés par le modèle de Glennon.⁴¹

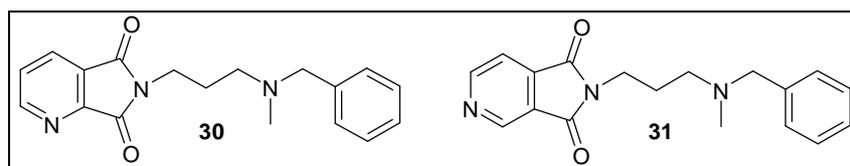


Figure 60

¹⁴³ Carly, P. R.; Cappelle, S. L.; Compennolle, F.; Hoornaert, G. J. *Tetrahedron* **1996**, *36*, 11889-11904. Diels-Alder reactions of pyridine *o*-quinodimethane analogues generated from functionalised *o*-bis(chloromethyl)pyridines.

L'amine libre **8** réagit sur l'anhydride en présence d'APTS dans du toluène, à 110°C, en utilisant un montage de Dean Stark (schéma 41).¹⁴⁴

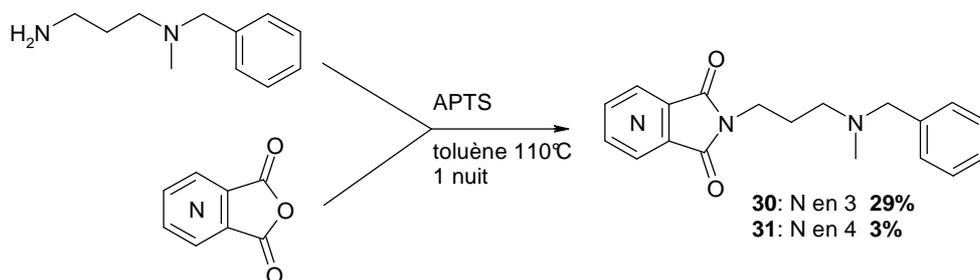


Schéma 41

La réaction est suivie en LC-MS. Nous observons un pic correspondant à notre produit attendu de masse 310. En revanche, après purification, nous remarquons deux pics confondus en LC-MS correspondant à deux produits différents de masse 310 (le produit attendu) et 342. Ce dernier proviendrait peut être d'une ouverture de la molécule provoquée par la présence de MeOH lors de la purification. Notre structure serait donc sensible aux nucléophiles. Ce phénomène a été confirmé par l'ajout d'éthanol, nous obtenons les masses 310 et 356 correspondant au produit voulu et l'ester éthylique (schéma 42). Les anhydrides de départ, commerciaux ont été analysés en RMN et n'ont révélé aucune impureté. Cette ouverture est due à l'instabilité des produits finaux en présence de nucléophiles.

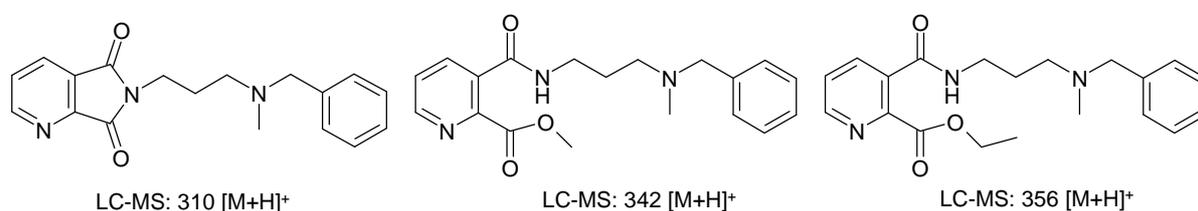


Schéma 42

Il est à noter que les très faibles rendements peuvent s'expliquer par des problèmes d'extraction des produits lors de la purification sur plaques CCE, du fait que nous ne pouvons pas utiliser de MeOH. Par conséquent, la majeure partie des produits est restée adsorbée sur la silice. Néanmoins, nous avons récupéré les produits en quantité suffisante pour effectuer les tests d'affinité. Les rendements pourront être aisément améliorés en effectuant la purification par chromatographie sur colonne avec un éluant non nucléophile comme le cyclohexane et l'acétate d'éthyle.

¹⁴⁴Muth, M.; Bender, W.; Scharfenstein, O.; Holzgrabe, U.; Balatkova, E.; Trankle, C.; Mohr, K. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1031-1040. Systematic Development of High Affinity Bis(ammonio)alkane-type Allosteric Enhancers of Muscarinic Ligand Binding.

8. Fonctionnalisation de la tétrahydroisoquinoléine

L'impact de l'ajout de fonctions sur le noyau tétrahydroisoquinoléine a été ensuite évalué (Figure 61).

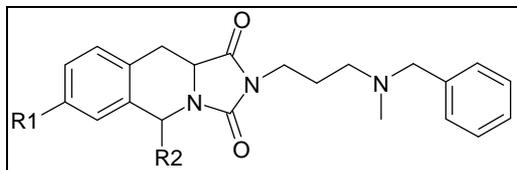


Figure 61

Les composés voulus proviendraient d'une réaction de condensation de l'amine **8** sur l'acide aminé de départ suivi d'une réaction de Pictet-Spengler et d'une cyclisation (schéma 43).

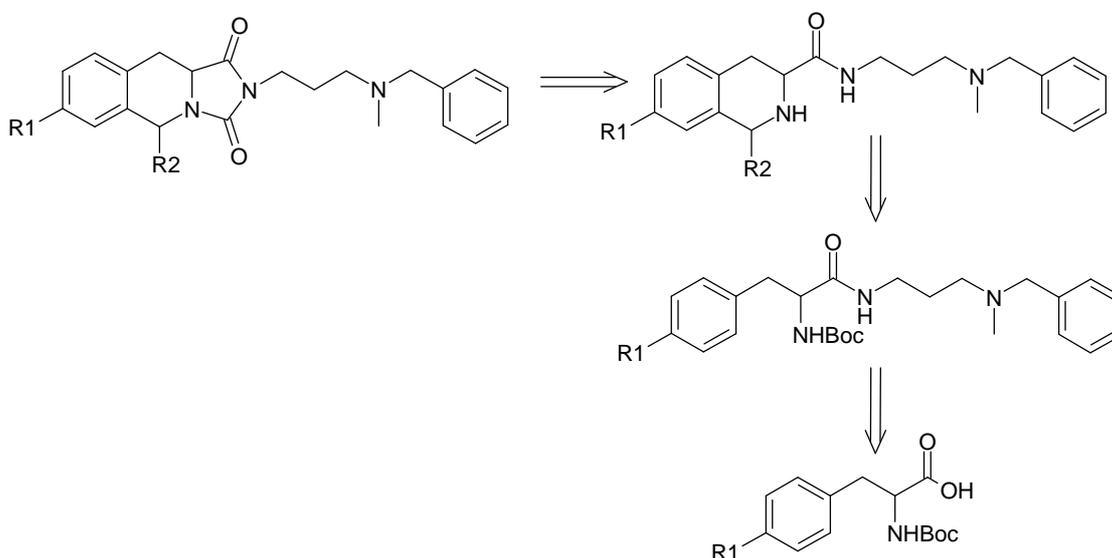


Schéma 43

Cette synthèse est en cours de réalisation au laboratoire.

9. Modification de la liaison Tic-hydantoïne

L'importance de la liaison entre la tétrahydroisoquinoléine et l'hydantoïne a enfin été étudiée. Pour cela nous avons souhaité synthétiser le composé suivant (figure 62).

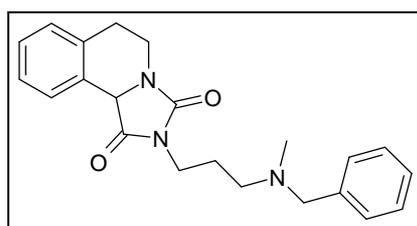


Figure 62

Il proviendrait d'une réaction de Pictet-Spengler sur la 2-phényléthylamine de départ suivi d'une condensation en présence de l'amine **8** et enfin d'une cyclisation en présence de CDI (schéma 44).

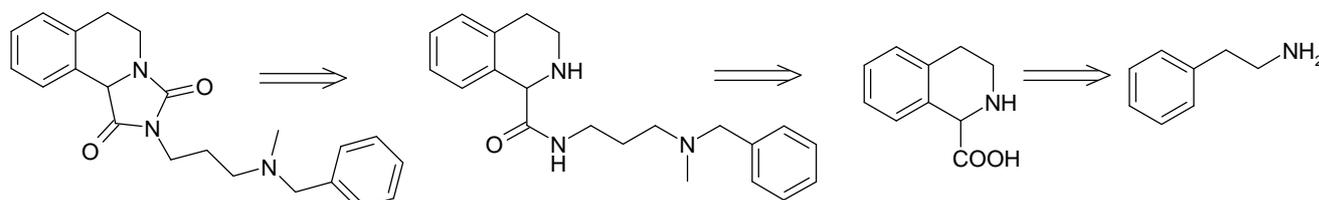


Schéma 44

Cette synthèse est en cours d'étude au laboratoire.

10. Caractérisation physico-chimique des composés 10, 12 et 13

Nous avons étudié la pureté énantiomérique des composés **10**, **12** et **13**. Une étude par HPLC sur phase stationnaire chirale et par électrophorèse capillaire a été effectuée en collaboration avec le laboratoire de chimie analytique EA 3034 du Pr. Claude Vaccher de la faculté de pharmacie de Lille.

10.1 Pureté énantiomérique des dérivés hydantoïnes et thiohydantoïnes

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer la pureté énantiomérique d'une structure chirale, notamment la chromatographie (HPLC) et l'électrophorèse capillaire (EC). La séparation chirale est basée sur la formation de diastéréoisomères entre les énantiomères et un sélecteur chiral énantiomériquement pur.

a) HPLC

Principe

En HPLC, il existe deux modes de séparation chirales permettant d'obtenir des énantiomères purs.

- La séparation en mode direct (formation de diastéréoisomères labiles) : soit par l'utilisation d'une phase stationnaire chirale, soit par l'addition d'un agent chiral dans la phase mobile.
- La séparation en mode indirect (formation de diastéréoisomères vrais) : basée sur une réaction entre un réactif chiral et les deux énantiomères pour former des diastéréoisomères séparables en milieu achiral.

La méthode la plus couramment utilisée au laboratoire repose sur l'utilisation d'une phase stationnaire chirale et d'une phase mobile achirale.

Optimisation de la séparation

Parmi toutes les phases stationnaires chirales (PSC) disponibles les phases stationnaires de type polysaccharide utilisées en phase normale sont les plus performantes. Une étude comparative de la rétention et de la séparation des énantiomères des dérivés hydantoïne et thiohydantoïne a été menée à l'aide des PSC Chiralcel OD-H (cellulose tris 3,5-diméthylphénylcarbamate) et Chiralpak AD (amylose tris 3,5-diméthylphénylcarbamate) (figure 63), à l'aide de différentes phases mobiles et à différentes températures.

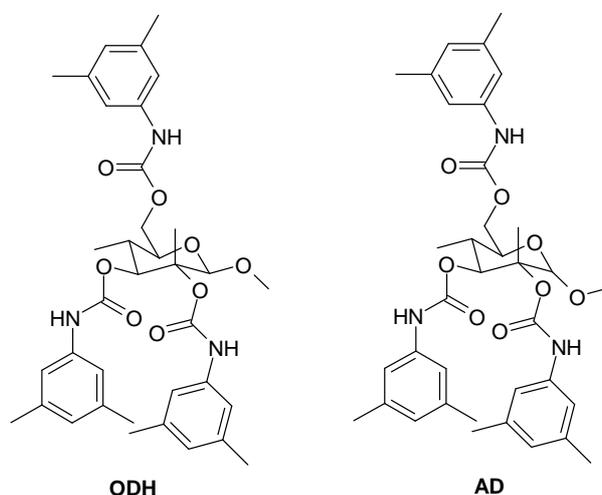


Figure 63 : Phases stationnaires chirales

Les phases mobiles généralement utilisées sont des mélanges binaires hexane/alcool (éthanol, propan-1-ol ou propan-2-ol).

Dans le but de déterminer les conditions chromatographiques permettant de séparer les énantiomères de chacun des dérivés, nous avons dans un premier temps analysé, les composés issus de la synthèse énantiosélective. Les premiers résultats obtenus ont montré que la thiohydantoïne **13** correspondait à un mélange racémique, contrairement aux dérivés hydantoïnes **10** et **12** qui semblaient énantiomériquement purs. L'optimisation de la séparation des énantiomères a donc dans un deuxième temps été menée respectivement à l'aide d'un mélange 50/50 des isomères **10** et **12**, et du composé **13**.

Les conditions optimales recherchées consistent à obtenir une résolution maximale en un temps le plus court possible, autrement dit une résolution par unité de temps maximale. A

ce titre, pour les deux dérivés, les performances de la PSC Chiralcel OD-H sont inférieures à celle de la PSC Chiralpak AD.

Quelques exemples de chromatogrammes obtenus dans différentes conditions opératoires sur la PSC Chiralpak AD sont représentés dans les figures 64 et 65.

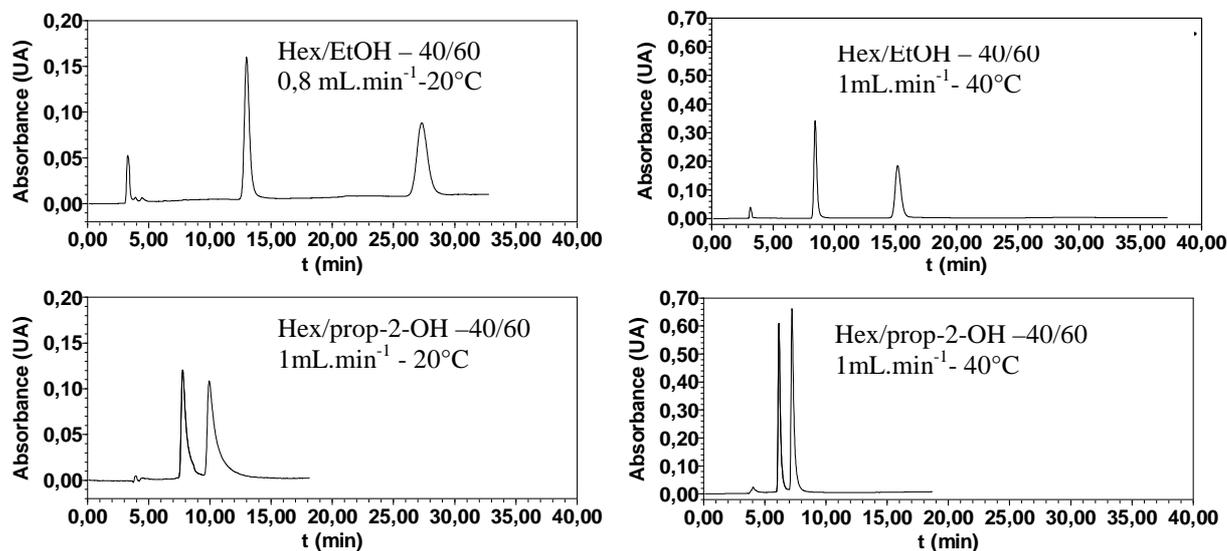


Figure 64 : Chromatogrammes obtenus sur la phase stationnaire Chiralpak AD pour un mélange équimolaire des énantiomères 10 et 12 à la concentration de 0,5mM; premier pic (P_1) = composé 12 ; deuxième pic (P_2) = composé 10.

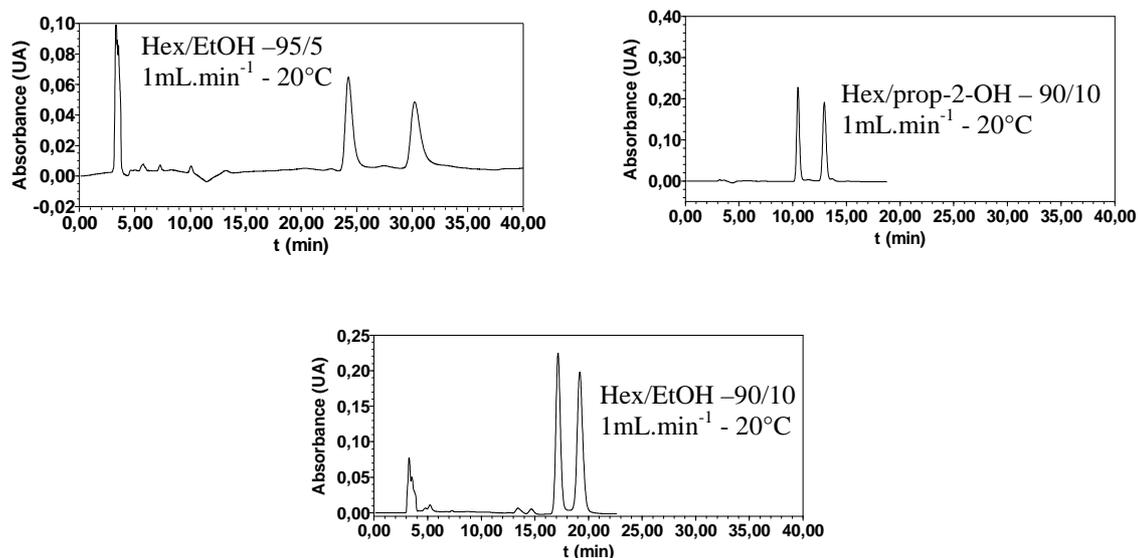


Figure 65: Chromatogrammes obtenus sur la phase stationnaire Chiralpak AD pour le dérivé 13 à la concentration de 0,5mM.

Les conditions optimales de séparation retenues pour la détermination de la pureté énantiomérique sont regroupées dans le tableau 5.

Composé	Phase stationnaire	Phase mobile	Température (°C)	Débit (mL.min ⁻¹)	λ (nm)	V _{inj} (μL)
10-12	AD	Hex/prop-2-ol 40/60	40	1	206	20
13	AD	Hex/prop-2-ol 90/10	20	1	206	20

Tableau 5: Conditions optimales choisies pour la détermination de la pureté énantiomérique.

Détermination des limites de détection et de quantification

Les limites de détection (« LOD ») et de quantification (« LOQ ») sont des éléments indispensables à la validation de la méthode de séparation. Elles sont déterminées grâce à l'évaluation du rapport Signal sur Bruit (S/B). Des rapports S/B de l'ordre de 3 et 10 sont habituellement pris en compte pour estimer respectivement les limites de détection et de quantification.

L'évaluation du bruit de fond s'effectue par injection d'un blanc (éthanol) ; l'amplitude du bruit de fond (hauteur) est mesurée sur un temps équivalent à au moins dix fois la largeur des pics des énantiomères. La LOD et la LOQ sont tout d'abord évaluées à partir des signaux des énantiomères injectées à une concentration totale de 0,5mM. Elles sont ensuite vérifiées par injection de solution de concentration correspondante aux valeurs de LOD et LOQ évalué préalablement.

Le tableau 6 regroupe les résultats obtenus dans les conditions optimales. Les valeurs exprimées en % ont été calculées pour une concentration cible de l'énantiomère majoritaire égale à 0,5mM.

Composé	LOD (μM)	LOD (%)	LOQ (μM)	LOQ (%)
12	0,55	0,11	1,84	0,37
10	0,64	0,13	2,1	0,40
13 premier pic (P1)	0,39	0,16	1,30	0,52
13 deuxième pic (P2)	0,47	0,19	1,55	0,62

Tableau 6 : LOD et LOQ des différents énantiomères.

Pureté énantiomérique

La pureté énantiomérique se calcule à partir des concentrations des énantiomères majoritaires et minoritaires. Ainsi pour l'énantiomère R, elle est définie selon :

$$\text{Pureté énantiomérique en \% : } [R] \times 100 / ([R] + [S])$$

En pratique la surface des pics étant directement proportionnelle à la concentration, la pureté énantiomérique est calculée à partir des surfaces des pics.

Composés hydantoïnes 10 et 12

Afin d'évaluer l'incertitude sur les résultats de pureté énantiomérique, chaque échantillon a été injecté 5 fois. La figure 66 présente un des chromatogrammes obtenus pour chacun des énantiomères.

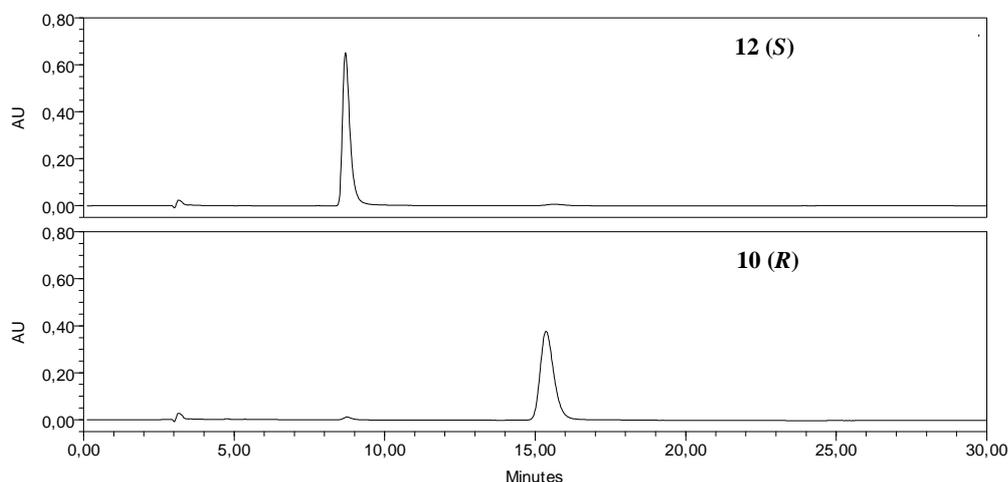


Figure 66 : **Chromatogrammes obtenus sur la phase stationnaire AD pour les énantiomères 10 et 12 (C = 0,5mM) ; 20 μ L ; Hex/EtOH-60/40 ; 40°C, 1mL.min⁻¹.**

Pureté énantiomérique des composés issus de la synthèse : **10** 98,1 \pm 0,5 % ; **12** : 98,1 \pm 0,5 %

Une étude complémentaire a été menée sur la phase stationnaire Chiralpak AD à l'aide d'une phase mobile hexane/propan-2-ol 40/60 à 20°, afin de contrôler l'influence de la température d'analyse sur le résultat de pureté énantiomérique obtenu. Un résultat identique a été obtenu.

Composé thiohydantoïne

Le composé **13** est constitué d'un mélange de deux énantiomères en proportion 50,8 \pm 0,9 % (P1) et 49,2 \pm 0,9 % (P2). Il s'agit d'un racémique.

cyclodextrines neutres ou ionisées. Stalcup *et al.*¹⁴⁷ ont démontré les performances séparatives des cyclodextrines sulfatées dans le cas de différents dérivés de type hydantoïne. Nous avons choisi d'étudier les performances séparatives de cyclodextrines neutres natives (α -CD, β -CD et γ -CD) ou hydroxypropylées (HP- α -CD, HP- β -CD et HP- γ -CD) ou hautement sulfatées (HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD) en milieu acide.

L'étude montre que la séparation est optimale pour les cyclodextrines sulfatées. Elles conduisent à des résolutions supérieures pour des temps d'analyse plus courts. Les électrophérogrammes obtenus avec les CDs sulfatées sont représentés en figures 67 et 68.

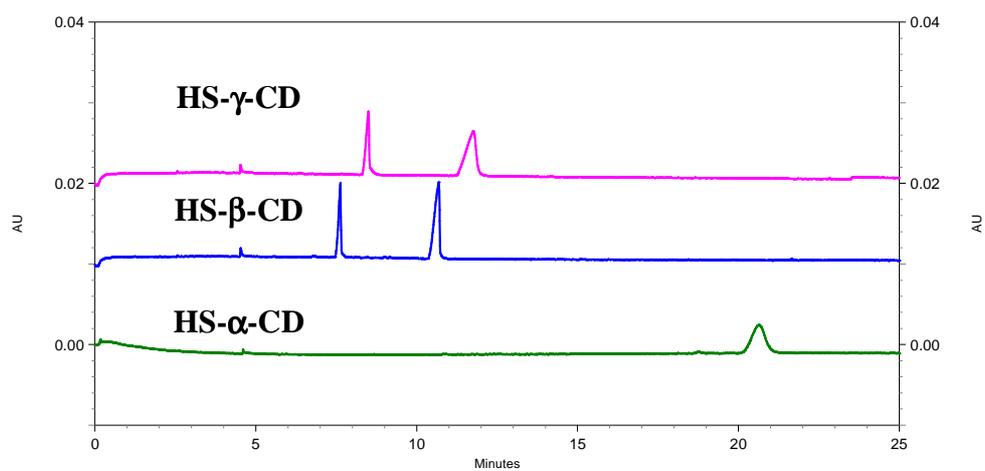


Figure 67 : Electrophérogrammes obtenus pour les hydantoïnes 10 et 12 de concentrations respectives 0,2mM et 0,3mM à l'aide des différentes HS-CD ; L = 50,2cm, l = 40,2cm, injection à la cathode, à 25°C.

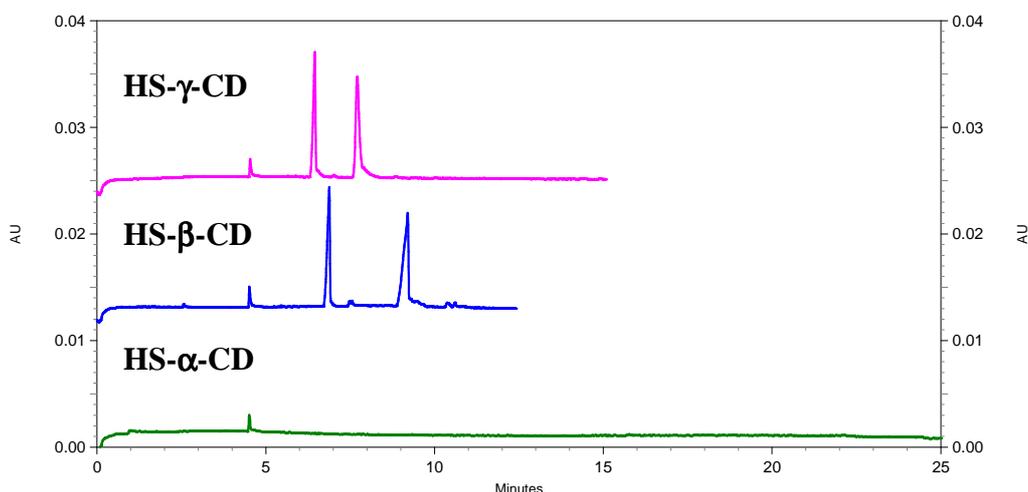


Figure 68 : Electrophérogrammes obtenus pour la thiohydantoïne 13 de concentration 0,5mM à l'aide des différentes HS-CD ; L=50,2cm, l = 40,2cm, injection à la cathode, 25°C.

¹⁴⁷ Stalcup, A. M.; Gahm, K. H. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1369-74. A sulfated cyclodextrin chiral stationary phase for high-performance liquid chromatography.

L'utilisation de HS- α -CD ne permet pas d'éluer les énantiomères du composé **13** en moins de 30 minutes. Dans le cas du dérivé hydantoïne, aucune séparation n'est observée. Les CDs de type HS- β -CD sont les plus intéressantes. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que la taille de la cavité chirale de type β semble plus adaptée à l'inclusion du soluté.

Concentration de la cyclodextrine

Compte tenu de la qualité des séparations obtenues, nous avons choisi de travailler sur une longueur utile de capillaire plus faible afin de réduire la durée des analyses. La suite de l'optimisation a donc été menée en mode « short end », c'est-à-dire en injectant du côté court du capillaire. Dans ces conditions, la longueur utile est de 10cm.

Afin d'optimiser la séparation, une étude a ensuite été menée à différentes concentrations en cyclodextrine. Les électrophérogrammes obtenus sont présentés ci-dessous (figures 69-70).

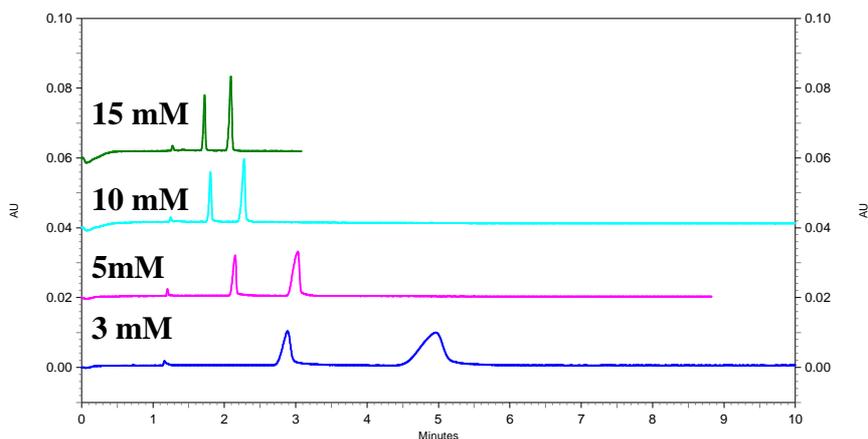


Figure 69: **Electrophérogrammes obtenus pour les hydantoïnes 10 et 12 de concentrations respectives 0,2mM et 0,3mM à l'aide de différentes concentrations de HS- β -CD (3-15mM); L = 50,2cm, l = 10cm, injection à la cathode, à 25°C.**

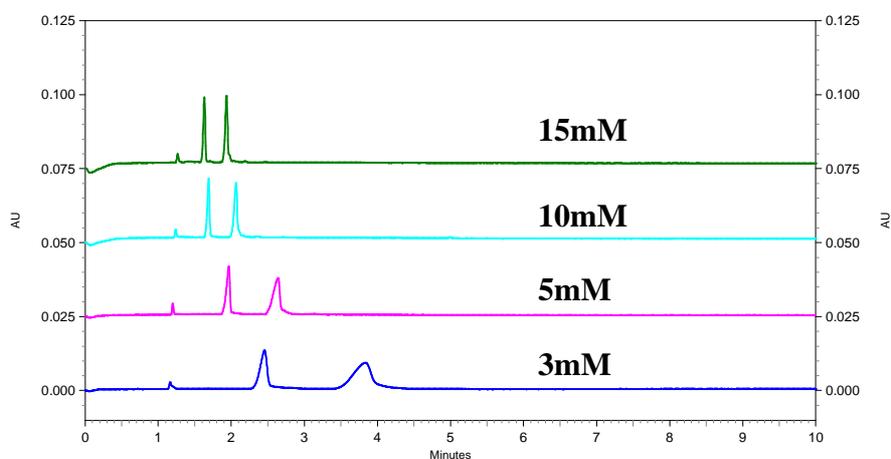


Figure 70: **Electrophérogrammes obtenus pour la thiohydantoïne 13 de concentration 0,5mM à l'aide de différentes concentrations de HS- β -CD (3-15mM); L=50,2cm, l = 10cm, injection à la cathode, 25°C.**

Pour les composés étudiés, la résolution par unité de temps augmente quand la concentration varie de 1 à 10mM. Par ailleurs la diminution du temps de migration entraîne une augmentation de la hauteur des pics, donc une amélioration de la détection. La concentration optimum retenue est de 10mM en HS- β -CD pour les deux dérivés.

Les conditions optimales de séparation sont donc les suivantes :

- Capillaire : silice fondue, L = 50,2cm (longueur effective 10 cm), 50 μ m de diamètre
- Electrolyte de séparation : tampon phosphate 50mM, pH = 2,6 (acide phosphorique à 80 % + triéthanolamine) ; [HS- β -CD] = 10mM
- Echantillons analysés :
 - Hydantoïne **10** à 0,5mM dans une solution tampon phosphate 50mM, pH = 2,6 contenant 25 % d'éthanol
 - Hydantoïne **12** à 0,5mM dans une solution tampon phosphate 50mM, pH = 2,6 contenant 25 % d'éthanol
 - Thiohydantoïne **13** à 0,5mM dans une solution tampon phosphate 50mM, pH = 2,6 contenant 25 %
- Injection hydrodynamique : 0,5 psi, 5s à la cathode
- Voltage : 20 kV
- Température : 25°C
- Détection à 200nm

Détermination des limites de détection et de quantification

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées dans les conditions optimales de séparation, selon une procédure identique à celle utilisée précédemment en HPLC.

Le tableau 8 regroupe les résultats obtenus. Les valeurs exprimées en % ont été calculées pour une concentration cible de l'énantiomère majoritaire égale à 0,5mM.

Composé	LOD (μ M)	LOD (%)	LOQ (μ M)	LOQ (%)
12	1,27	0,25	4,23	0,85
10	1,00	0,20	3,34	0,67
13 premier pic (P1)	0,88	0,18	2,92	0,58
13 deuxième pic (P2)	1,11	0,22	3,69	0,74

Tableau 8 : **LOD et LOQ des différents énantiomères.**

Pureté énantiomérique

La pureté énantiomérique des différents composés a été déterminée dans les conditions optimales de séparation. Afin d'évaluer l'incertitude sur les résultats de pureté énantiomérique, chaque échantillon a été injecté 5 fois.

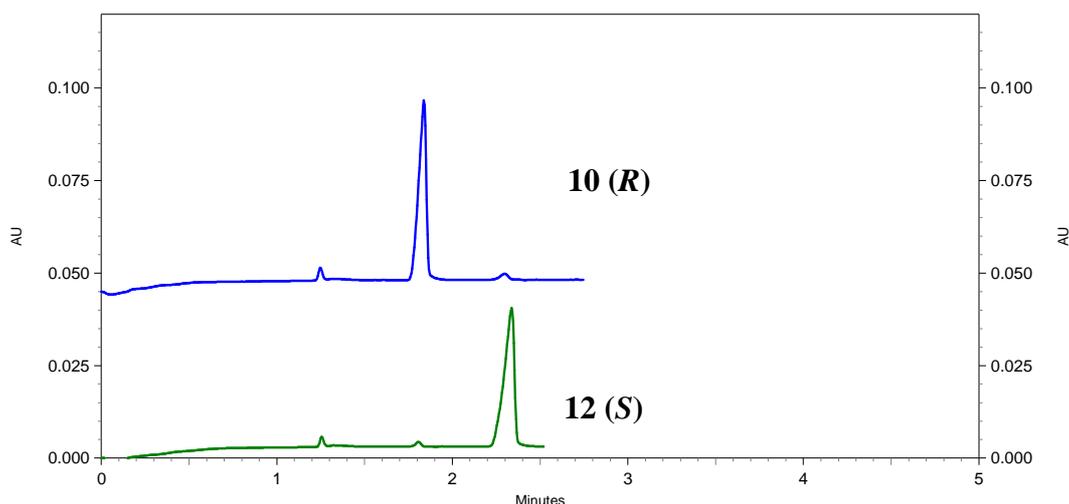
Composés hydantoïne

Figure 71: **Electrophérogrammes des énantiomères 10 et 12.**

Les puretés énantiomériques (figure 71) des composés sont les suivantes :

Enantiomère **10 (R)** : $97,9 \pm 0,2$ % ; Enantiomère **12 (S)** : $97,9 \pm 0,2$ %

Composés thiohydantoïne

Le composé **13** est constitué d'un mélange de deux énantiomères en proportion $50,4 \pm 0,6$ % (P1) et $49,6 \pm 0,6$ % (P2). Il est donc sous forme racémique.

Les résultats obtenus en HPLC et en EC sont concordants. Les hydantoïnes **10** et **12** sont énantiomériquement purs tandis que la thiohydantoïne **13** correspond à une forme racémique.

10.2. Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires des composés dans du méthanol à 1mg/mL ont été mesurés grâce à un polarimètre. Ils sont respectivement de $\alpha_D = -132^\circ$ pour l'énantiomère S (composé **12**) et $\alpha_D = +132^\circ$ pour l'énantiomère R (composé **10**).

11. Séparation préparative des énantiomères du dérivé thiohydantoïne

Dans le but d'étudier la stabilité des énantiomères vis-à-vis de la chiralité et d'élucider le phénomène à l'origine de la composition des dérivés thiohydantoïnes obtenus, il est indispensable de disposer des énantiomères purs et donc de les séparer à l'échelle préparative.

11.1. Séparation préparative

Nous avons choisi de préparer de petites quantités des énantiomères. Nous avons donc mené la séparation préparative sur la colonne analytique utilisée précédemment. Pour des quantités d'ordre supérieur, nous transposerons nos conditions opératoires à une colonne de taille supérieure. Afin de déterminer la quantité maximale pouvant être injectée, une étude de surcharge a été menée en augmentant la concentration des solutions injectées et le volume des injections. Au cours de cette étude les conditions optimales sélectionnées pour la détermination de la pureté énantiomérique ont été adaptées pour compenser la perte de résolution obtenue. L'utilisation de la phase stationnaire Chiralpak AD et d'une phase mobile Hexane/éthanol 95/5 (moins éluante) à 20°C a finalement été choisie. La figure 72 présente les chromatogrammes obtenus lors de l'étude de surcharge.

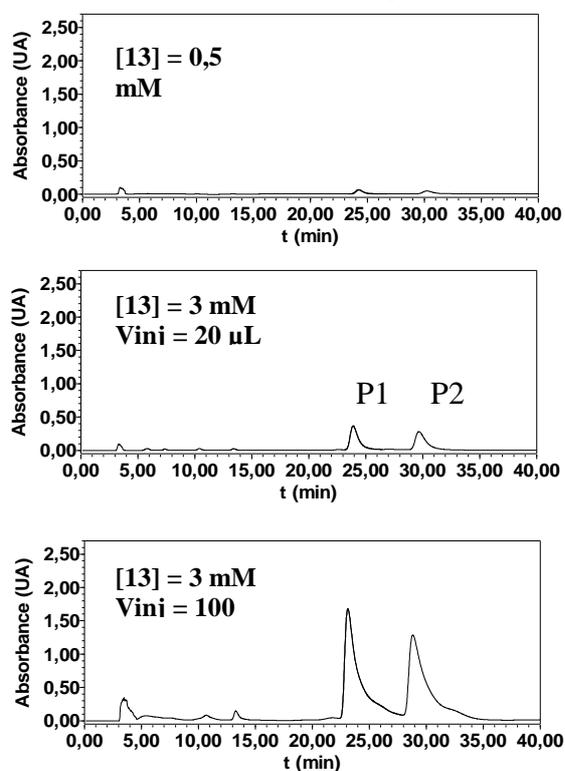


Figure 72 : Chromatogrammes obtenus sur la phase stationnaire Chiralpak AD pour le dérivé 13 ; phase mobile hexane/EtOH-95/5, 20°C, 1mL.min⁻¹.

Sur la colonne analytique Chiralpak AD utilisée (250 x 4,6mm ; 5 μ m), dans les conditions expérimentales choisies, il est donc possible d'injecter 100 μ L d'une solution à 3mM de dérivé **13** tout en conservant une séparation correcte des énantiomères.

La séparation préparative de 1,2mg de composé **13** a finalement été menée. Au total 10 injections ont été réalisées. Les deux énantiomères ont été obtenus après évaporation du solvant sous pression réduite à température ambiante. Les quantités isolées nous ont permis de réaliser une étude préliminaire du comportement des énantiomères.

11.2. Pureté énantiomérique des énantiomères isolés

La pureté énantiomérique des énantiomères obtenus a été déterminée en HPLC à partir de solutions éthanoliques à 0,5mM dans les conditions optimales établies précédemment. Cinq injections ont été réalisées.

Pureté énantiomérique des énantiomères isolés :

$$P1 = 97,5 \pm 0,8 \%$$

$$P2 = 98,5 \pm 0,8 \%$$

12. Etude de la stabilité chirale des énantiomères

Afin d'étudier l'origine de l'obtention d'un racémique pour le dérivé thiohydantoïne à l'issue de la synthèse asymétrique, une étude de la stabilité chirale des énantiomères hydantoïnes doit être menée.

Conditions opératoires

- Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude de la stabilité chirale du dérivé le plus stable et disponible en quantité importante, à savoir le composé **10**, à 25°C et 50°C dans différents solvants :
 - Ethanol
 - Ethanol+triéthylamine (100 ou 1000 eq par rapport au composé étudié)
 - Ethanol+acide acétique (100 ou 1000 par rapport au composé étudié)

Dans chaque cas 5mL d'une solution à 0,125mM en composé **10** ont été préparés. Ces solutions ont été placées dans un bain-marie à la température souhaitée (temps zéro : t_0). Des prélèvements de 60 μ L ont ensuite été effectués à divers temps de chauffage (temps t) et ont immédiatement été stockés au congélateur (-20°C). Les échantillons prélevés ont ensuite été

analysés en HPLC sur la phase stationnaire Chiralpak AD dans des conditions permettant une séparation satisfaisante et rapide des énantiomères, à savoir :

Composé 10
Phase mobile : hexane/propan-2-ol 40/60
Debit : 0,8mL.min ⁻¹
Temperature 20°C
Volume injecté : 20µL

- Dans un second temps, une étude préliminaire de la stabilité d'un des énantiomères du dérivé **13** (P1 isolé préparativement) a été menée dans les conditions suivantes :

Ethanol-25°C et 50°C

Cette étude a été réalisée à partir de 2mL d'une solution à 0,07mM en composé **13** (P2). La procédure expérimentale suivie est identique à celle utilisée pour le dérivé hydantoïne, à l'exception de la méthode chromatographique qui est la suivante :

Thiohydantoïne 13 P1
Phase mobile : hexane/propan-2-ol 90/10
Debit : 1mL.min ⁻¹
Temperature 20°C
Volume injecté : 20µL

Résultats

Dans une solution éthanolique à 50°C, après 500 heures, pour l'hydantoïne **10**, le pourcentage de l'autre énantiomère est de 18%, ce qui nous amène, en extrapolant, à une racémisation totale au bout de 7000 heures. En revanche, il ne faut que 30 minutes dans le cas du dérivé thiohydantoïne pour avoir une racémisation totale. Le schéma représentant les variations du pourcentage d'impureté énantiomérique observées en fonction du temps pour les dérivés **10** et **13** P2 en solution dans l'éthanol à 50°C est représenté dans la figure 73.

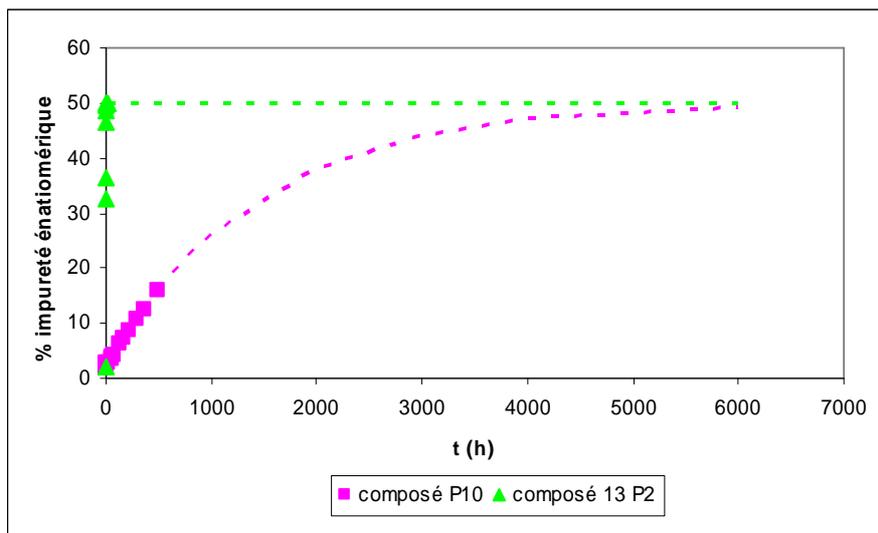


Figure 73: Etude de la cinétique de racémisation des dérivés 10 et 13 P2 dans l'éthanol à 50°C ; évolution du pourcentage d'impureté énantiomérique en fonction du temps.

D'autres études sur la stabilité dans d'autres conditions sont en cours au laboratoire.

13. Etudes des paramètres de Lipinski des composés

La règle des 5 de Lipinski est une règle pour évaluer si un composé possède des propriétés « drug-like ». Cette règle, formulée par Lipinski en 1997,¹⁴⁸ est basée sur l'observation de composés administrables par voie orale. Ces critères permettent d'éliminer des composés présentant a priori des propriétés ADME-Tox peu satisfaisantes. Les critères sont les suivants :

- Masse moléculaire (MWt) < 500
- LogP < 5
- Nombre de donneurs de liaisons hydrogène < 5
- Nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène < 10

Les paramètres de Lipinski des composés synthétisés ont été calculés grâce au logiciel ACDLabs et sont présentés dans le tableau 9.

¹⁴⁸ Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. *Adv. Drug. Del. Rev.* **1997**, *23*, 3-25. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.

Composé	MWt	LogP	Donneurs lh	Accepteurs lh	pKa
10	363	2,7	0	5	8,49
12	363	2,7	0	5	8,49
13	379	3,3	0	4	8,49
16	365	2,8	0	5	8,50
22	229	3,0	0	3	-
23	362	4,8	0	4	8,49
30	309	2,8	0	5	8,39
31	309	2,8	0	5	8,34

Tableau 9 : Paramètres de Lipinski (logiciel ACDLabs).

Tableau 9 : Paramètres de Lipinski (logiciel ACDLabs).

Les composés entrent tous dans les critères. En général, nous avons cherché à salifier les molécules obtenues afin de les rendre solubles dans l'eau pour les tests sur modèles animaux.

14. Etude de l'affinité

Les tests de liaison σ_1 ont été réalisés par la société Cerep. Ils ont été effectués sur des cellules humaines en utilisant la $[H^3](+)$ pentazocine (concentration de 8nM) comme radioligand de référence et l'halopéridol (concentration de 10 μ M) comme ligand non spécifique. Les pourcentages d'inhibition de la liaison spécifique sont évalués par scintillation après une incubation de 120min à 22°C. Les tests sont évalués en duplicate. En raison du faible nombre de manipulation, les résultats représentés dans les tableaux sont des indications d'IC₅₀.

Les tests précédents sur l'affinité des molécules avaient été réalisés sur la protéine σ_1 de cochon d'inde. Le composé **12** a donc été retesté sur la protéine humaine afin de pouvoir comparer les différentes IC₅₀ des autres produits par la suite (tableau 10).

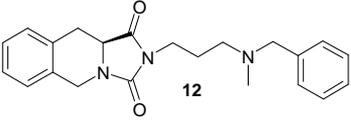
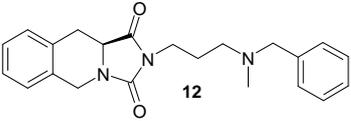
Composé	Protéine σ_1	IC ₅₀ (nM)
 12	Cochon d'inde	3,9
 12	Humain	8,7

Tableau 10

Le composé **12** a une plus faible affinité sur la protéine σ_1 humaine que celle du cochon d'inde. Mais les IC_{50} restent du même ordre de grandeur. La protéine σ_1 possède de fortes homologues de séquences inter-espèce, avec plus de 90% d'identité. Par conséquent, les IC_{50} ne changeront pas d'ordre de grandeur entre les différentes espèces.

Le composé **12** a aussi été testé sous plusieurs formes : sous forme d'oxalate ou sous forme de base libre (tableau 11).

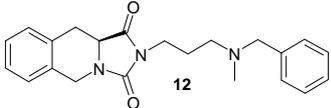
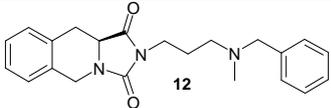
Composés	Forme	C_{50} (nM) humain
	Base libre	8,7
	Oxalate	33,8

Tableau 11

Nous remarquons que les affinités ne sont pas les mêmes. Le passage à l'état de sel d'oxalate provoque une perte d'affinité. En effet le composé **12** a une IC_{50} de 8,7nM sous forme de base libre alors que sous forme de sel d'oxalate son affinité diminue d'un facteur quatre. Cette perte d'activité serait due soit à une mauvaise solubilité du sel dans le DMSO ou soit à une interaction de l'oxalate sur le récepteur. Les produits seront donc évalués et comparés sous la même forme : sous la forme libre.

Ensuite les IC_{50} des autres composés ont été réalisés. Les composés présentant les meilleures affinités ont également été testés sur σ_2 de cortex cérébral de rat. Les résultats sont représentés dans le tableau 12.

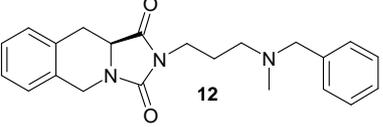
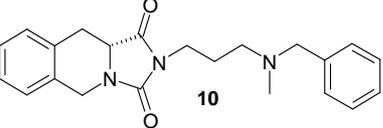
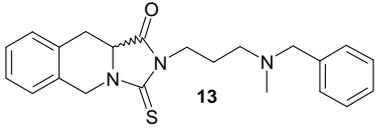
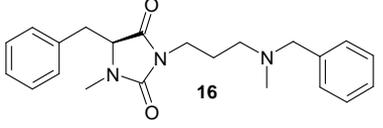
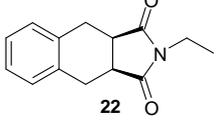
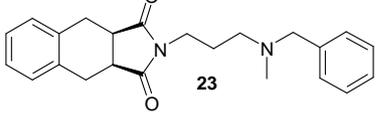
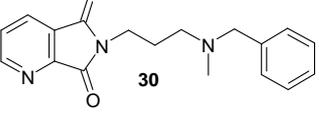
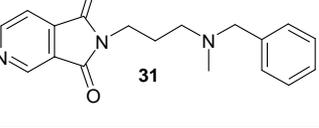
Composés	Stéréochimie	IC ₅₀ (nM) σ ₁ humain	IC ₅₀ (nM) σ ₂ rat	Ratio σ ₁ /σ ₂
 12	S	8,7	650	75
 10	R	13,7	1000	76
 13	R et S	4,5	-	-
 16	S	>100	-	-
 22	-	>1000	-	-
 23	-	57	-	-
 30	-	>200	-	-
 31	-	>200	-	-

Tableau 12

L'énantiomère (R) **10** montre une très bonne affinité et une bonne sélectivité. L'énantiomère (S) **12**, présente la meilleure affinité. Les sélectivités sont équivalentes pour les deux composés avec un ratio de 75 et 76. Les tests étant effectués sur la protéine σ₂ de rat et sur la protéine σ₁ humain, en toute rigueur, nous ne pouvons pas comparer les deux IC₅₀. Le ratio calculé représente un ordre de grandeur. Comme σ₁ possède de fortes homologues de

séquences inter-espèce, et que les valeurs des IC_{50} σ_1 , σ_2 sont très différentes, le ratio calculé devrait être du même ordre de grandeur qu'un ratio σ_1 de rat- σ_2 de rat.

Le remplacement de l'hydantoïne par une thiohydantoïne (composé **13**) augmente d'un facteur deux l'affinité. Néanmoins, le composé étant sous forme racémique et n'étant pas pur, nous n'avons pas poursuivi les études sur l'affinité et la sélectivité envers σ_2 .

L'ouverture du cycle tétrahydroisoquinoléine (composé **16**) provoque une perte complète de l'affinité, montrant ainsi l'importance de la structure rigide de la Tic-hydantoïne.

L'affinité est diminuée (composé **23**) voire complètement perdue (composé **22**) quand la tétrahydroisoquinoléine est remplacée par la tétraline, soulignant l'importance de l'hydantoïne. La perte d'affinité du composé **22** valide l'importance de la présence d'un azote protonable entouré de deux groupements hydrophobes.

Enfin, d'après les affinités de l'ensemble de ces molécules, les informations apportées par le modèle de Glennon⁴¹ et la perte d'affinité des dérivés pyridiniques (composés **30** et **31**) possédant une structure plus polaire que celle de la Tic-hydantoïne, celle-ci apparaît être le noyau hydrophobe idéal pour la liaison aux récepteurs σ_1 (figure 74).

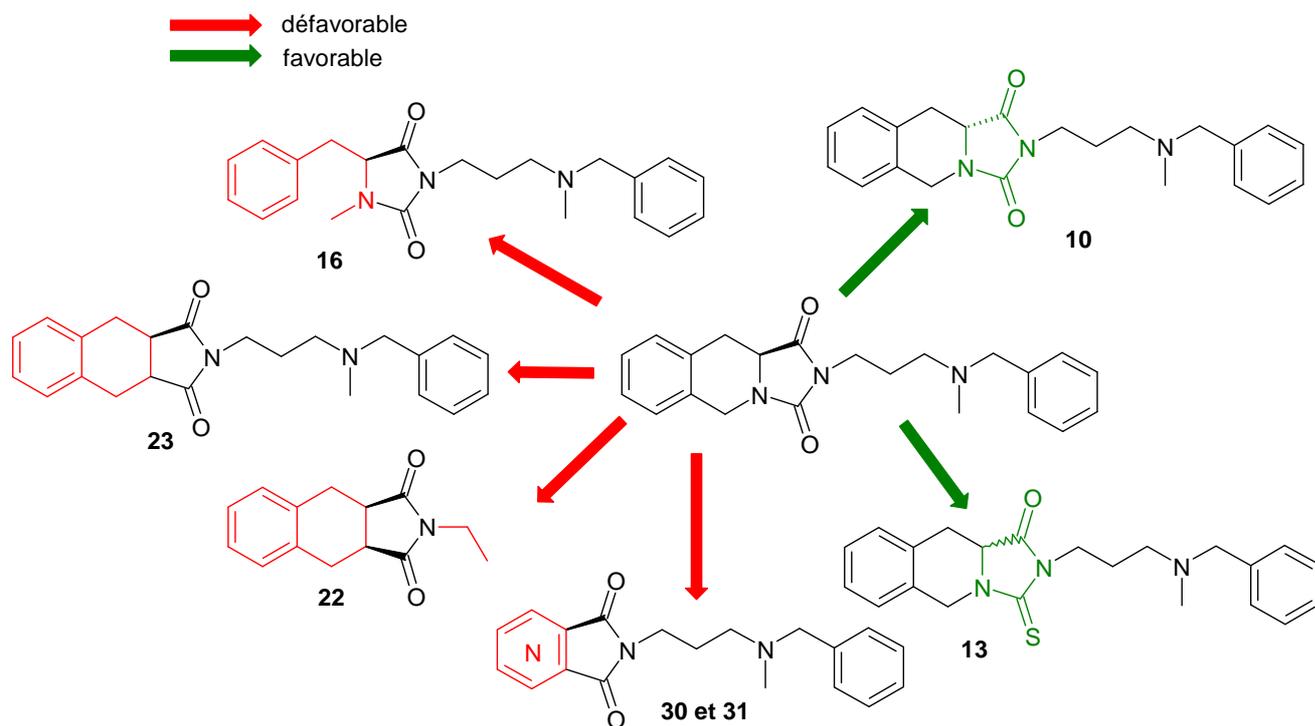
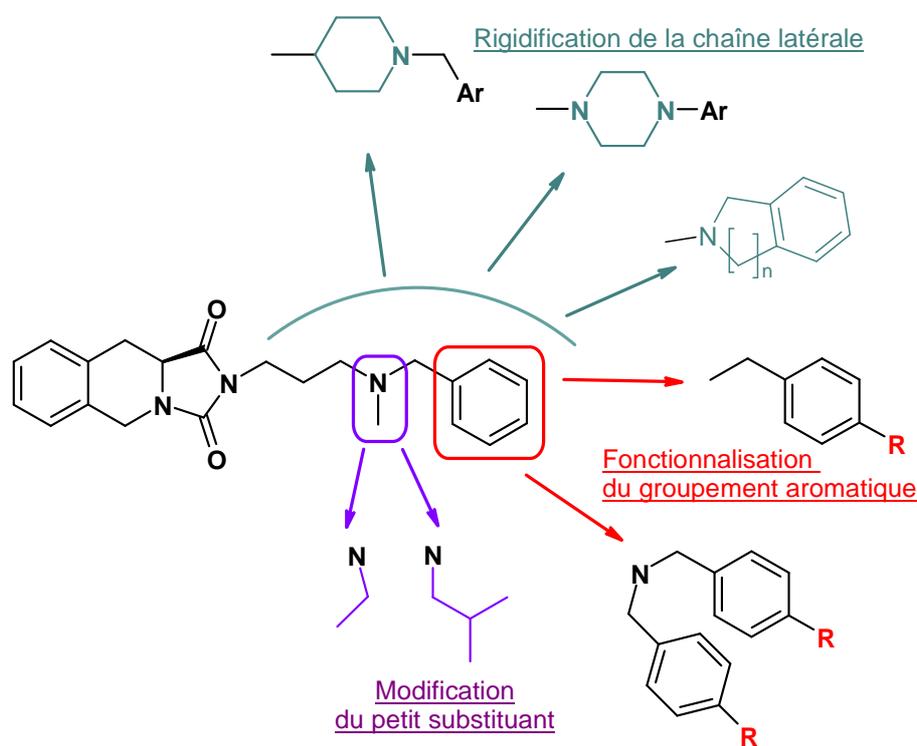


Figure 74 : **Relation Structure-Activité.**

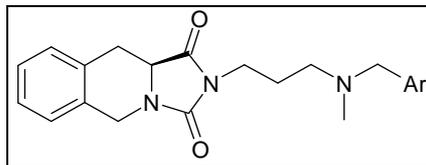
II. Modification de la chaîne latérale

Afin de mieux cerner les relations structure-activité de la série et d'étudier le pharmacophore, nous avons évalué en parallèle l'importance du noyau phényle pour l'affinité et la spécificité vis à vis du récepteur σ_1 . Pour cela, plusieurs séries de molécules ont été synthétisées pour évaluer l'impact du noyau aromatique, du petit substituant sur l'atome d'azote protonable et une éventuelle rigidification de la chaîne (schéma 45). Nous avons choisi de garder la structure Tic-hydantoïne de stéréochimie S du fait qu'elle présente une meilleure affinité que celle de l'énantiomère R.

Afin d'étudier les relations structure-activité de toutes les séries, les mêmes substituants sur le noyau aromatique ont été évalués. Nous avons choisi d'étudier le rôle d'un groupement aliphatique simple (méthyle), encombré (*t*-butyle), attracteur (nitro), donneur (méthoxy) et fluoré. De même, les groupements aliphatiques étudiés sont le méthyle, l'éthyle, l'isobutyle (encombré) et le cyclohexyle.



1. Fonctionnalisation du groupement phényle



1.1. Stratégie de synthèse

Il n'était pas intéressant de reprendre les stratégies de synthèse précédentes. En effet, il est beaucoup plus intéressant de développer une synthèse convergente afin d'introduire les différents substituants lors des dernières étapes de synthèse (schéma 46).

Les composés cibles peuvent être obtenus par amination réductrice à partir d'une Tic-hydantoïne portant une fonction aldéhyde (**voie A**) ou une fonction amine **36** (**voie B**).

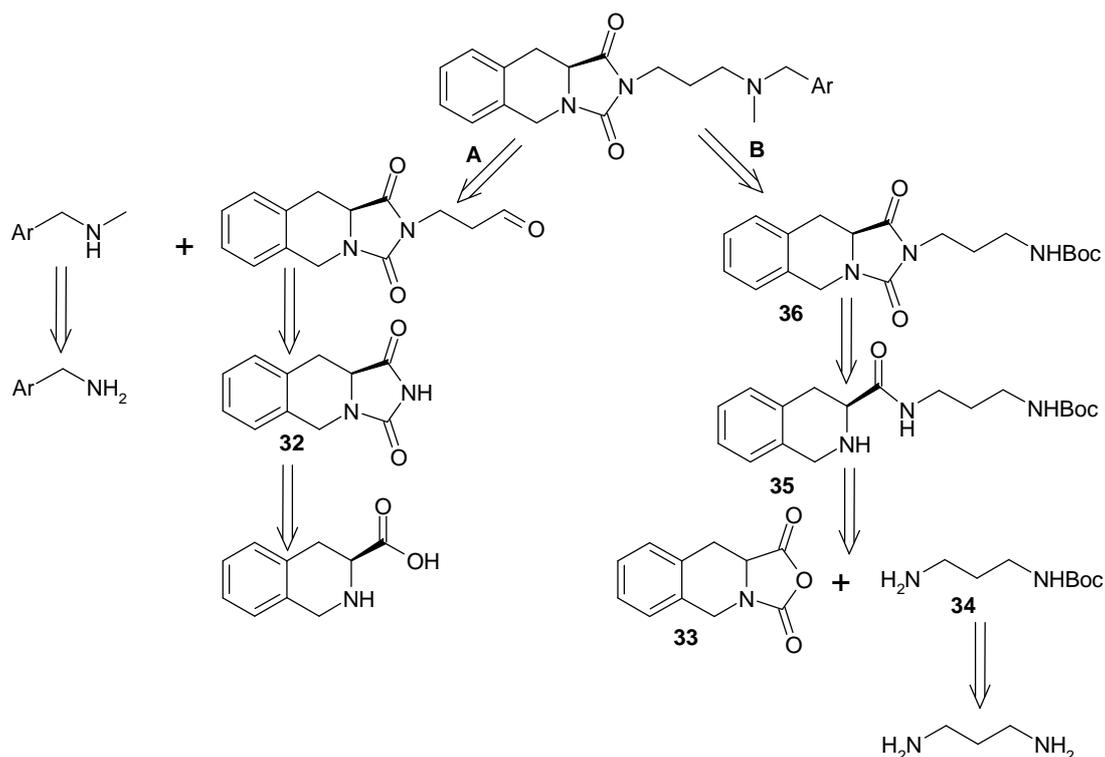


Schéma 46: **Stratégie de rétrosynthèse**

La voie A nécessite, parallèlement à l'obtention de l'aldéhyde, la synthèse des *N*-méthylbenzylamines. L'aldéhyde proviendrait de la réaction du bromoéthylidioxolane sur la Tic-hydantoïne **32**, obtenue classiquement à partir de l'acide Tic-OH.

Pour la voie B, le noyau Tic-hydantoïne portant une fonction amine protégée **36**, est obtenu par cyclisation du composé **35**. Ce dernier est formé à partir d'un couplage entre l'anhydride **33** et la diamine monoprotégée **34**.

1.2. Etude de la stratégie A

a) Voie de synthèse

La voie A, nécessitant la synthèse de l'aldéhyde a permis la synthèse des composés **37** et **38** (figure 74).

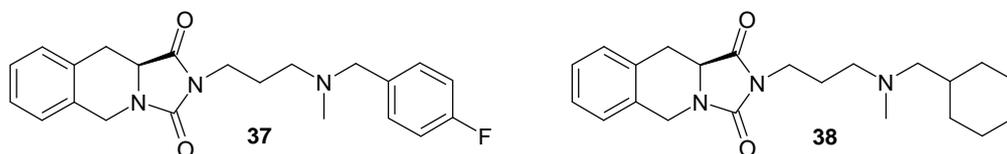


Figure 74

b) Synthèse du noyau Tic-Hydantoïne **32**

Méthode 1

Le groupement amine de l'acide Tic-OH est dans un premier temps protégé par un groupement *tert*-butoxycarbonyle en présence de Boc₂O dans un mélange NaOH(1M)/1,4-dioxane/H₂O (1/2/1) à température ambiante pour donner l'acide Boc-Tic-OH avec un rendement de 96%. L'acétamide **39** est formé par couplage entre l'acide et le chlorure d'ammonium en présence d'HOBt, d'HBTU et de DIEA au sein du DMF avec un rendement de 68% (schéma 47).

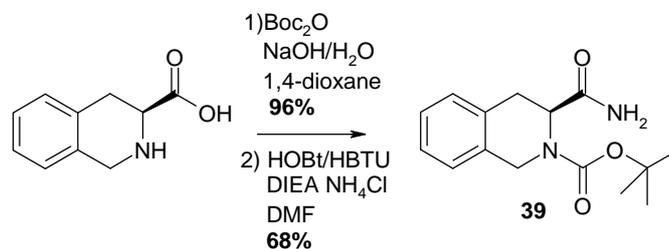


Schéma 47

Enfin après déprotection de l'amine grâce à un mélange DCM/TFA, la molécule **39** est cyclisée en présence de CDI et de DIEA dans du THF pour conduire au composé cyclisé **32** avec un rendement de 48% (schéma 48).

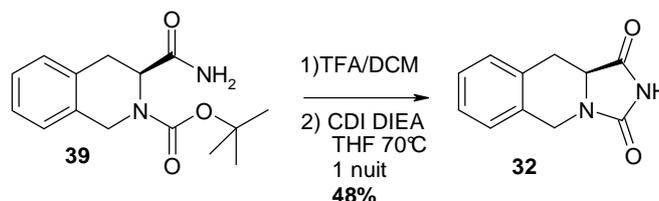
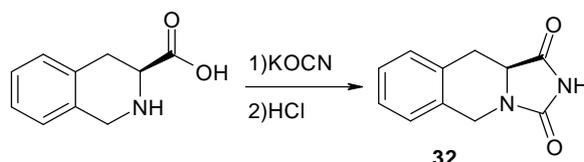


Schéma 48

Le rendement global de ces synthèses de 31%, étant très peu élevé, nous avons donc évalué d'autres méthodes pour optimiser cette réaction.

Méthode 2

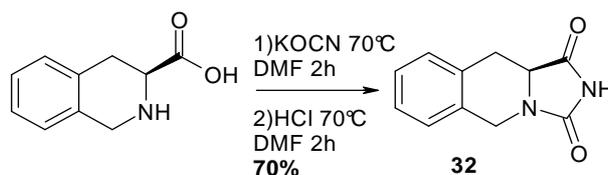
Cette deuxième méthode consiste à additionner à l'acide Tic-OH de l'isocyanate de potassium dans l'eau à reflux suivi d'une cyclisation en présence d'acide chlorhydrique à reflux, réaction précédemment décrite au laboratoire¹⁴⁹ (schéma 49).



Cette méthode s'avère peu satisfaisante avec des rendements de 25%. Le suivi en HPLC de l'avancement de la réaction montre qu'après une période de croissance du pic correspondant au produit attendu, la réaction s'inverse pour redonner le produit de départ. Cette réaction est donc particulièrement délicate à suivre et peu reproductible.

Méthode 3

Nous avons donc essayé d'optimiser les conditions de réaction afin d'augmenter le rendement, en remplaçant l'eau par du DMF et en réduisant le temps de réaction à 2h (schéma 50). Nous avons obtenu un rendement de 70%. Le mécanisme de cette réaction est décrit dans le schéma 51. L'acide Tic-OH subit une attaque de l'isocyanate, ensuite après une cyclisation intramoléculaire, la Tic-hydantoïne est formée.



¹⁴⁹ Charton, J.; Cazenave-Gassiot, A.; Melnyk, P.; Girault-Mizzi, S.; Sergheraert, C. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7081-7085. Optimized synthesis of tetrahydroisoquinoline-hydantoins.

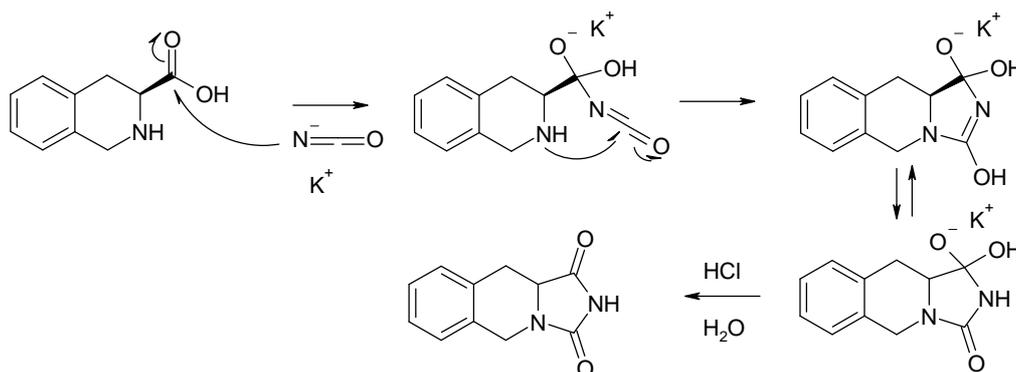


Schéma 51

c) Formation de l'aldéhyde

Dans un premier temps, nous avons voulu appliquer la méthode de Taber *et al*¹⁵⁰ permettant une réaction de Michael du succinimide sur l'acroléine (schéma 52). Le composé **29** est mis en contact avec l'acroléine, à 35°C, au sein de l'éthanol absolu. Malheureusement, malgré les différents essais effectués, en faisant varier le nombre d'équivalent de l'acroléine, la nature de la base, les solvants et la température, nous n'avons pas observé d'évolution dans la réaction. Les différents essais sont récapitulés dans le tableau 13.

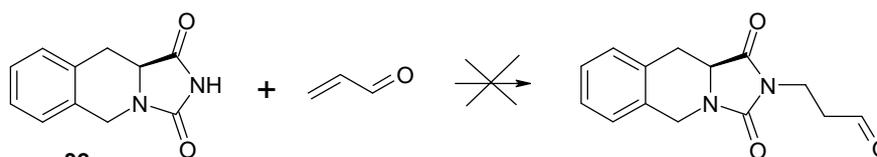


Schéma 52

Acroléine	Base	Solvant	Température	rendement
1eq	Na	éthanol absolu	T.A.	0%
1eq	Na	éthanol absolu	3°C	0%
1eq	K ₂ CO ₃	DMF	T.A.	0%
1,2eq	K ₂ CO ₃	DMF	T.A.	0%
1,2eq	K ₂ CO ₃	DMF	50°C	0%

Tableau 13

En s'appuyant sur les résultats précédents du laboratoire (§I.1. modification du noyau Tic-hydantoïne), nous savons que la Tic-hydantoïne est suffisamment nucléophile pour réagir sur un dérivé halogéné. Pour cela, nous avons donc envisagé d'obtenir l'aldéhyde par une substitution nucléophile du noyau Tic-hydantoïne sur le bromoéthylidioxolane suivie de la déprotection de l'acétal cyclique.

¹⁵⁰ Taber, D. F.; Hoerrner, R. S.; Hagen, M. D. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1287-1289. A practical preparation of the indolizidine nucleus: synthesis of (+)-elaeokanine A.

Le composé **32** est mis en présence de bromoéthylidioxolane et de K_2CO_3 au sein du DMF, conduisant au composé **40** avec 70% de rendement (schéma 53). Ce produit est aisément identifié en RMN par le triplet à 4,95ppm caractéristique du proton H_6 (figure 75).

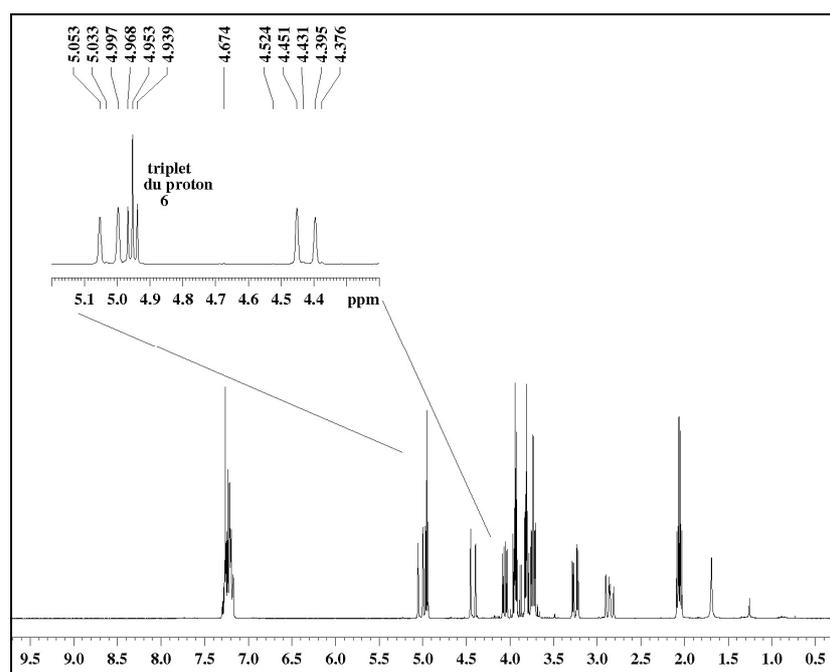
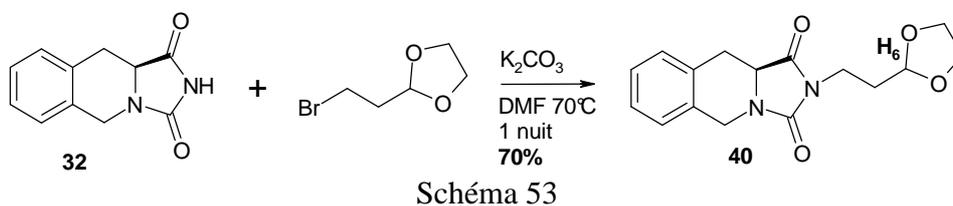
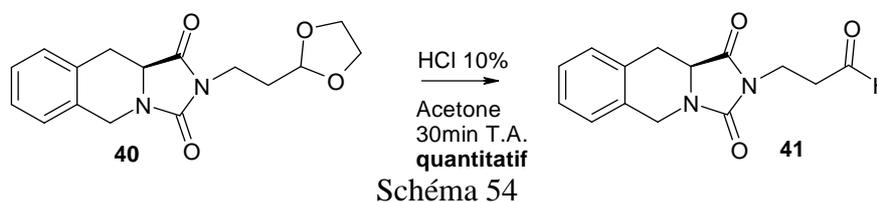


Figure 75: Spectre RMN¹H du composé **40** (300MHz CDCl₃)

Ce dernier est ensuite déprotégé en milieu acide. Nous obtenons, l'aldéhyde **41** avec un rendement quantitatif (schéma 54).



d) Synthèse des amines

Parallèlement à la formation de l'aldéhyde, les dérivés de la *N*-méthylbenzylamine sont préparés. L'amine est d'abord protégée par un groupement *tert*-butoxycarbone avant

d'être méthylée, en présence de NaH et d'iodure de méthyle dans du DMF.¹⁵¹ L'amine est ensuite déprotégée grâce à un mélange équimolaire DCM/TFA afin de réagir avec l'aldéhyde (schéma 55). Cette méthode, quoi qu'un peu longue, nous a toujours permis au laboratoire d'obtenir les meilleurs rendements d'amines secondaires monométhylées.

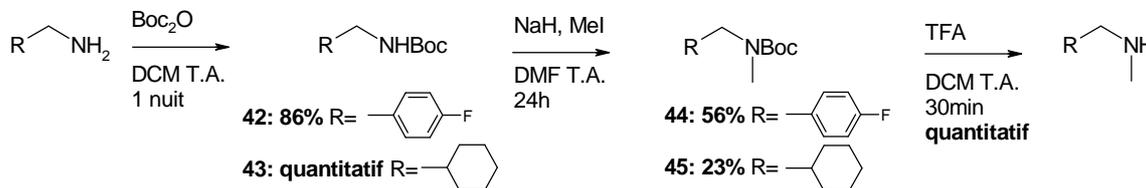


Schéma 55

e) Amination réductrice

Grâce à une amination réductrice¹⁵² (schéma 56), en présence de triacétoxyborohydrure de sodium et de l'acide acétique glacial dans du THF, les composés **37** et **38** sont obtenus avec respectivement 41% et 37% de rendement (mécanisme schéma 57).

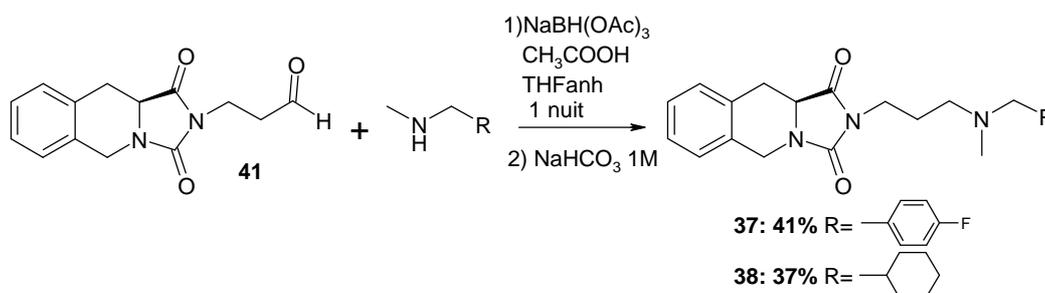


Schéma 56

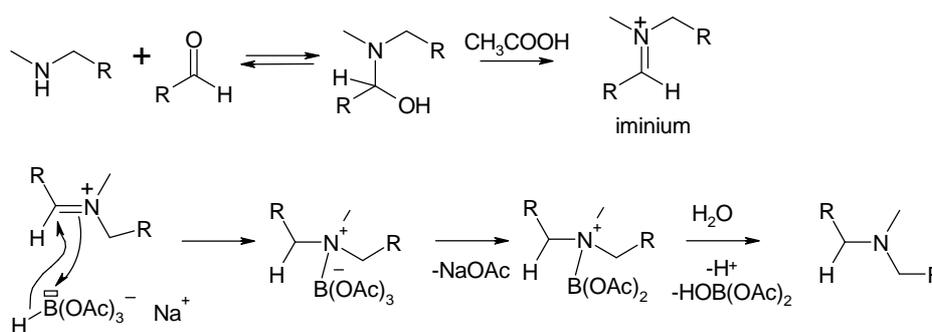


Schéma 57

¹⁵¹ Li, W.; Peng, S. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7373-7376. Rational design and synthesis of unsaturated 2,5-dioxopiperazine derivatives as potential protein tyrosine kinase inhibitors.

¹⁵² Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shad, R. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3849-3862. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures.

1.3. Etude de la stratégie B

a) Voie de synthèse

Pour la voie B, la diamine monoprotégée **34** réagit sur l'anhydride **33** en milieu basique pour former le composé **35**. Après une succession de réactions de cyclisation, déprotection, amination réductrice et méthylation (schéma 58), nous obtenons les composés désirés **46**, **47**, **48** et **49** (figure 76).

L'avantage de cette méthode est de pouvoir introduire à loisir le groupement hydrophobe et le petit substituant sur l'atome d'azote en fin de synthèse.

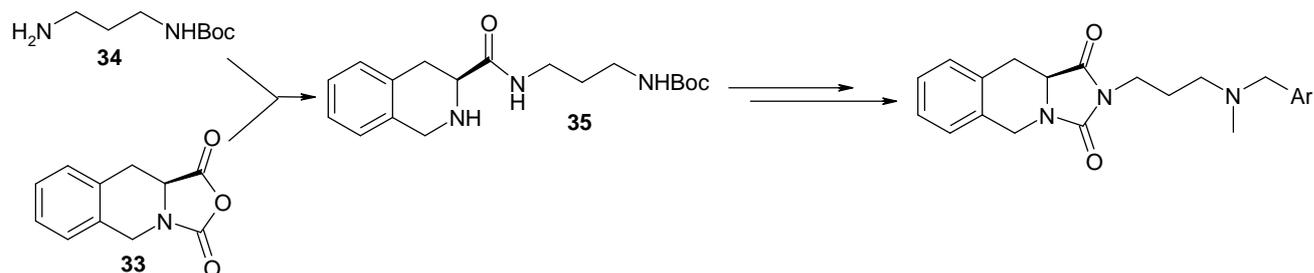


Schéma 58

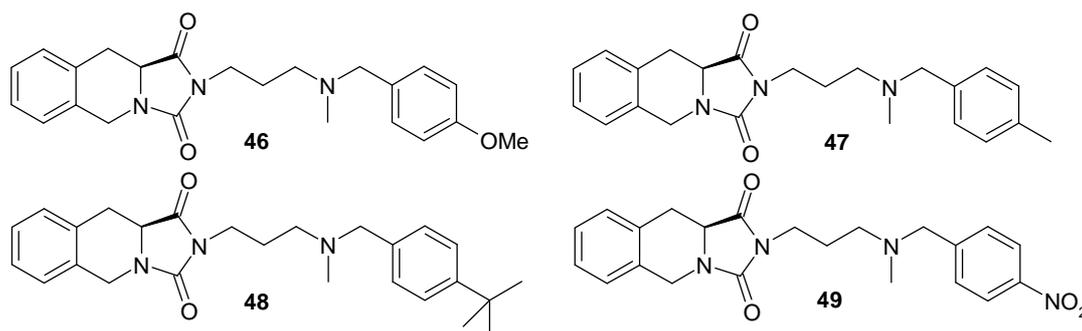


Figure 76

b) Synthèse de l'anhydride

La voie de synthèse **B** consiste dans un premier temps à former l'anhydride **33**. Pour ce faire, l'acide Tic-OH, préalablement protégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyl, est mis en contact avec le trichlorure de phosphore durant 2h,¹⁵³ le chlorure d'acide est formé puis par une cyclisation intramoléculaire, l'anhydride **33** est isolé avec un rendement quantitatif (schéma 59). Le mécanisme de cette réaction est décrit dans le schéma 60.

¹⁵³Hätzelt, A.; Laschat, S.; Jones, P. G.; Grunenberg, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 23, 3936-3943. Diastereoselective Alkylation of Tricyclic Lactim Ethers.

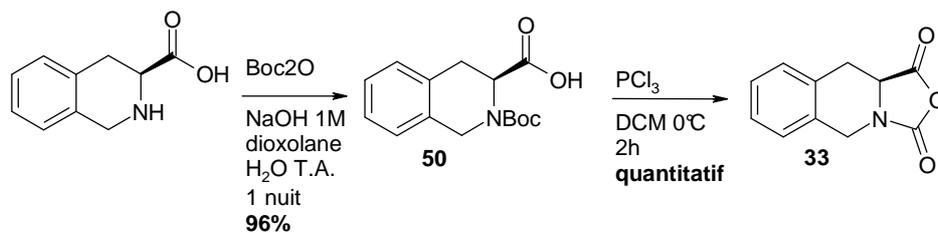


Schéma 59

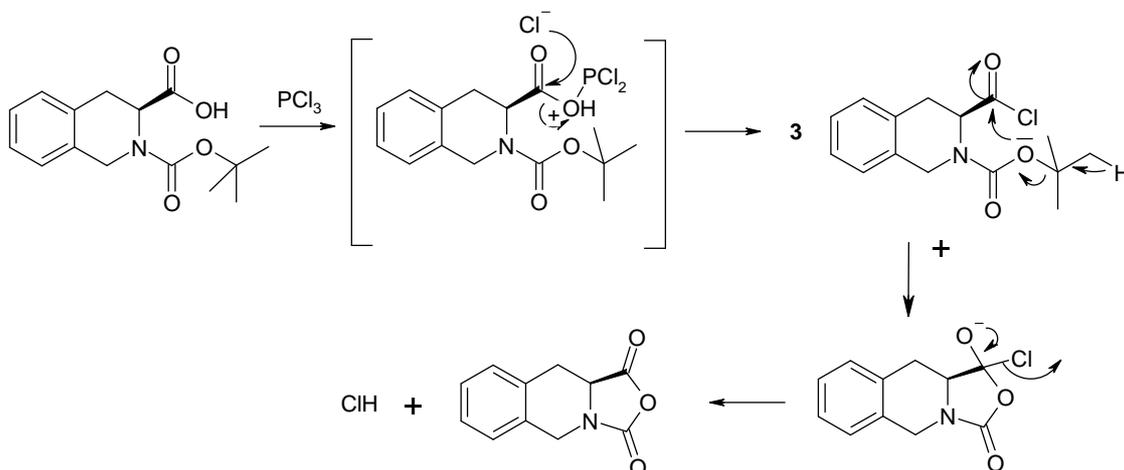


Schéma 60

c) Monoprotection de la diamine

Il est à noter que l'amine **34** commerciale a dû être préparée pour des problèmes d'approvisionnement.

Méthode 1

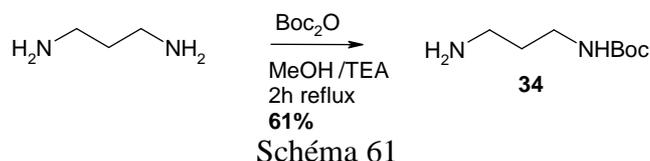
Dans un premier temps, nous avons utilisé un protocole du laboratoire, à savoir l'utilisation de 0,5 équivalent de Boc_2O au sein d'un mélange 1,4-dioxane/NaOH 1M/ H_2O , à température ambiante pendant 5h. Mais malheureusement, nous isolons le composé diprotégé, avec un rendement quantitatif, et le produit de départ.

Méthode 2

Au vu de ce résultat, une deuxième voie de synthèse a été envisagée en utilisant les conditions de Dijols *et al.*¹⁵⁴, à savoir l'utilisation de 0,3 équivalent de Boc_2O et de 10% de

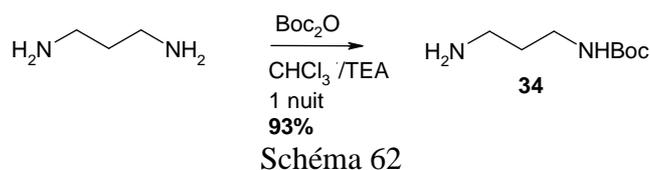
¹⁵⁴ Dijols, S.; Perollier, C.; Lefevre-Groboillot, D.; Pethe, S.; Attias, R.; Boucher, J.; Stuehr, D.; Mansuy, D. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3199-3202. Oxidation of *N*-Hydroxyarginine Analogues by NO-Synthase: The Simple, Non Amino Acid *N*-Butyl *N*'-Hydroxyguanidine Is Almost as Efficient an NO Precursor as *N*-Hydroxyarginine.

TEA au reflux du MeOH pendant 2 heures. Le 1,3-diaminopropane monoprotégé **34** est isolé, après purification sur gel de silice, avec un rendement de 61% (schéma 61).



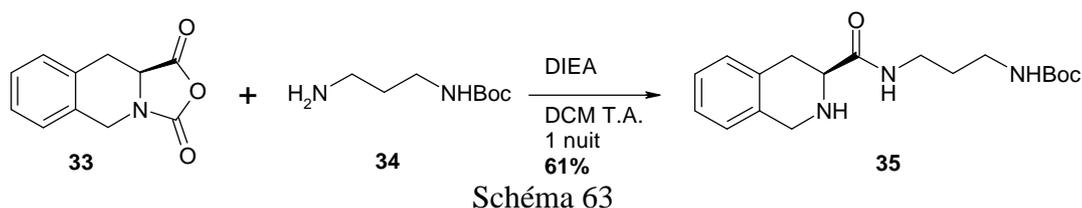
Méthode 3

Une autre méthode, celle d'Eisenführ *et al.*,¹⁵⁵ a aussi été évaluée. Cette fois-ci, le Boc₂O est solubilisé dans du chloroforme et ajouté goutte à goutte, à 0°C, à 7 équivalents de diamine au sein du chloroforme, pendant 5 heures. Le milieu est agité, une nuit, à température ambiante, pour conduire à un mélange de produit de départ et d'amine monoprotégée séparable aisément par des lavages à l'H₂O et à la saumure. Cette méthode présente donc un avantage certain, à savoir qu'elle ne nécessite aucune purification par chromatographie et conduit facilement à l'amine monoprotégée avec un rendement de 93% (schéma 62).



d) Ouverture de l'anhydride

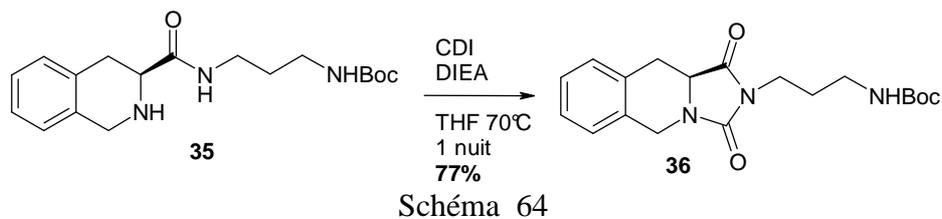
Après condensation de la diamine **34** sur l'anhydride **33** en présence de DIEA dans du DCM, le composé **35** est formé avec 61% de rendement (schéma 63).



e) Formation du noyau Tic-Hydantoïne

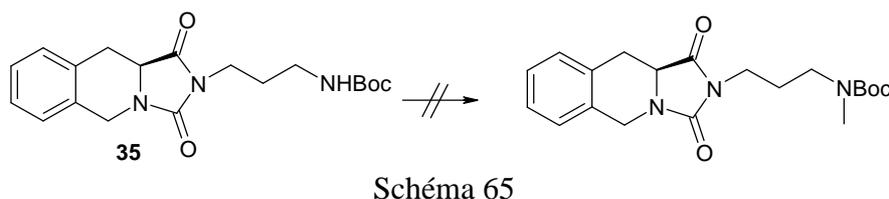
La molécule **35** est cyclisée en présence de CDI en milieu basique dans du THF pour former le noyau Tic-Hydantoïne **36** avec un rendement de 77% (schéma 64).

¹⁵⁵ Eisenführ, A.; Arora, P. S.; Sengle, G.; Takaoka, L. R.; Nowick, J. S.; Famulok, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 235-249. A ribozyme with michaelase activity: Synthesis of the substrate precursors.



f) Méthylation de l'amine suivie par une amination réductrice

Plusieurs conditions ont été étudiées pour méthyler l'azote de la fonction carbamate (schéma 65).



La première synthèse a été réalisée à l'aide de l'iodométhane à température ambiante en présence de KOH dans de l'ACN, protocole habituellement utilisé au laboratoire pour méthyler des azotes protégés par un groupement *tert*-butoxycarbonyle. Toutefois, dans notre cas, nous avons obtenu un produit différent de celui attendu. D'après le spectre RMN, celui-ci semble compatible avec la molécule représentée en figure 77. En effet le doublet de doublet caractéristique du proton 10a, vers 4ppm, a disparu pour faire place à un singulet correspondant à un groupement méthoxy à 3,26ppm (figure 78).

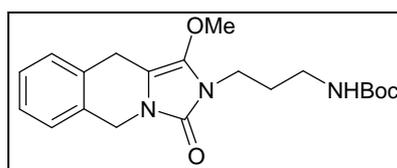


Figure 77

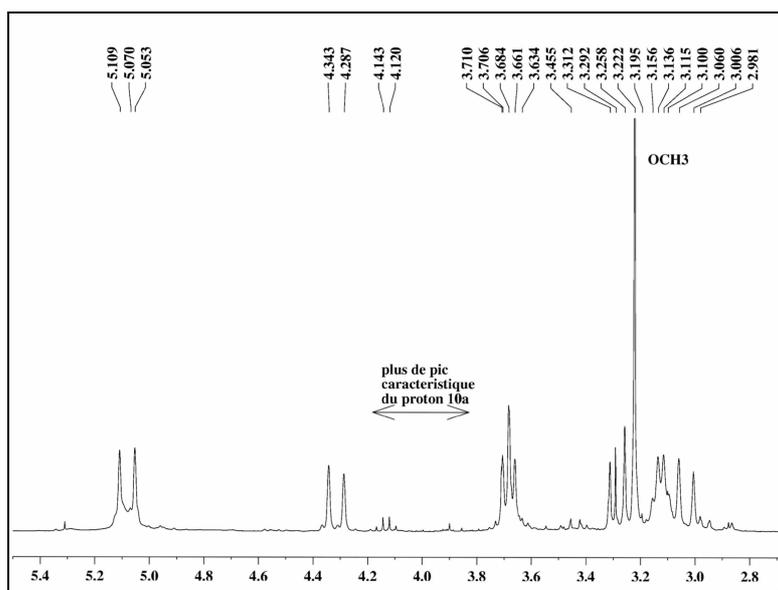


Figure 78 : Spectre RMN¹H (300MHz CDCl₃).

L'utilisation de NaH dans du THF ou du DMF, protocoles décrits pour méthyler des acides aminés protégés,^{156,157} n'a également pas abouti au composé souhaité.

Nous avons donc changé de stratégie et envisagé, dans un premier temps, la déprotection de l'amine, suivie d'une réaction de monométhylation¹⁵⁸ (schéma 66). Le mécanisme d'action est décrit au schéma 67. L'amine réagit sur le formaldéhyde pour former l'iminium. Ce dernier est réduit pour donner l'amine substituée.

Pour ce faire, l'amine **36** est tout d'abord déprotégé en utilisant du TFA dans le DCM, à température ambiante durant une nuit. Le composé **51** est isolé avec un rendement de 75%. Afin d'accéder aux conditions optimales de monométhylation, nous avons choisi comme agent de méthylation soit le formaldéhyde soit le paraformaldéhyde. L'amine **51** est mise en contact avec l'aldéhyde et un réducteur au sein du DMF ou d'un alcool, à température ambiante. Malheureusement, malgré les différents essais les rendements n'excèdent pas les 30% (tableau 14). De plus, il est à noter que la différence de R_f étant trop faible, et que le temps de rétention sur HPLC trop voisin entre l'amine primaire, secondaire et tertiaire (figure 79), il est difficile de suivre l'avancement de la réaction. Nous obtenons très souvent un mélange difficile à séparer. Néanmoins, nous avons réussi à isoler de petites quantités

¹⁵⁶ Li, W.; Peng, S. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7373-7376. Rational design and synthesis of unsaturated 2,5-dioxopiperazine derivatives as potential protein tyrosine kinase inhibitors.

¹⁵⁷ Li, P.; Xu, J. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8119-8131. 1-Ethyl 2-Halopyridinium Salts, Highly Efficient Coupling Reagents for Hindered Peptide Synthesis both in Solution and the Solid-Phase.

¹⁵⁸ Harding, J. R.; Jones, J. R.; Lu, S.; Wood, R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9487-9488. Development of a microwave-enhanced isotopic labelling procedure based on the Eschweiler-Clarke methylation reaction.

d'amine secondaire **52**, nous permettant d'étudier la suite du schéma réactionnel. et l'amine tertiaire **53**, pour les tests d'affinité.

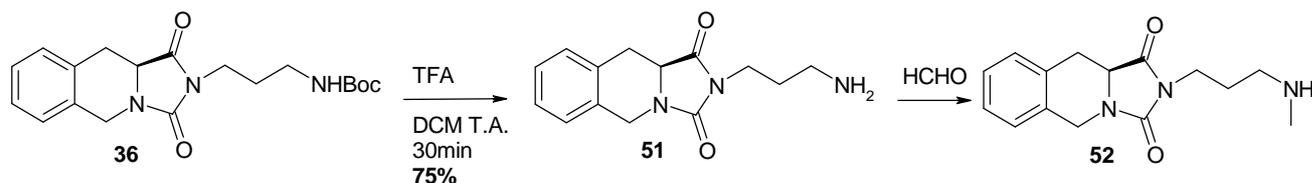


Schéma 66

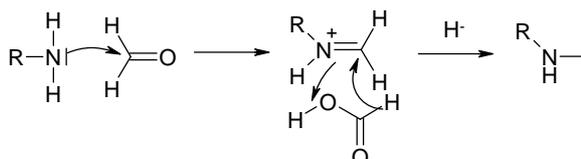


Schéma 67

Essai	Aldéhyde	Réducteur	Conditions réactionnelles	Temps	Rendement
1	HCHO _{37%} 1eq	HCOOH 1eq	DMF T.A.	1 nuit	10%
2	HCHO _{37%} 1eq	HCOOH 1eq	DMF T.A.	2h	26%
3	Paraformaldéhyde 1eq	HCOOH 1eq	DMF T.A.	3 jours	7%
4	HCHO _{37%} 1,1eq	NaBH ₄ 5eq	Ethanol abs T.A.	1 nuit	0%
5	Paraformaldéhyde 1eq	NaBH ₄ 2,5eq	Ethanol abs T.A.	1 nuit	1%
6	HCHO _{37%} 1eq	HCOOH 2eq	MeOH anh T.A.	1 nuit	17%
7	HCHO _{37%} 1eq	HCOOH 1eq	MeOHanh T.A. Pd/C	1 nuit	0%

Tableau 14 : différentes conditions de méthylation de l'azote.

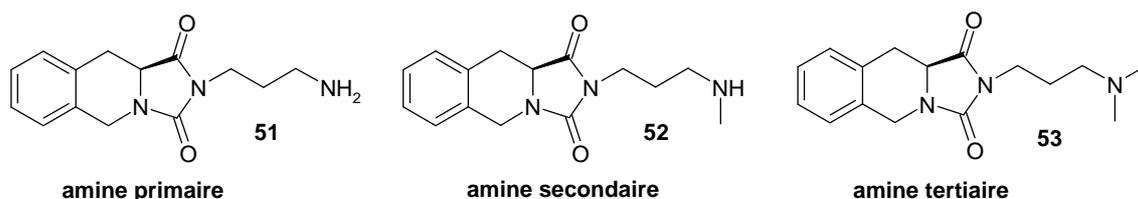


Figure 79

L'amine secondaire **52** est ensuite engagée dans une amination réductrice en présence de l'aldéhyde commercial et le triacétoxyborohydrure de sodium en milieu acide. Le composé **46** avec un O-méthoxy en para a été préparé par cette méthode (schéma 68).

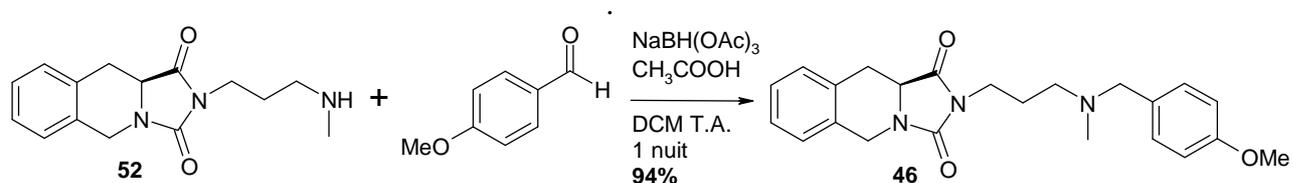


Schéma 68

Suite à ces résultats très décevants, nous n'avons préparé qu'un seul composé par cette voie.

g) Amination réductrice suivie par une méthylation

Nous avons étudié une autre voie de synthèse en effectuant l'amination réductrice suivie de la méthylation.

L'amine **36** est d'abord déprotégée par HCl dans du MeOH pour accéder à l'amine **51** désirée, avec un rendement quantitatif. Cette dernière est engagée dans une réaction d'amination réductrice en présence de borohydrure de sodium et d'un excès de TEA pour conduire aux amines **54**, **55** et **56** avec des rendements respectifs de 66, 30 et 50% (schéma 69).

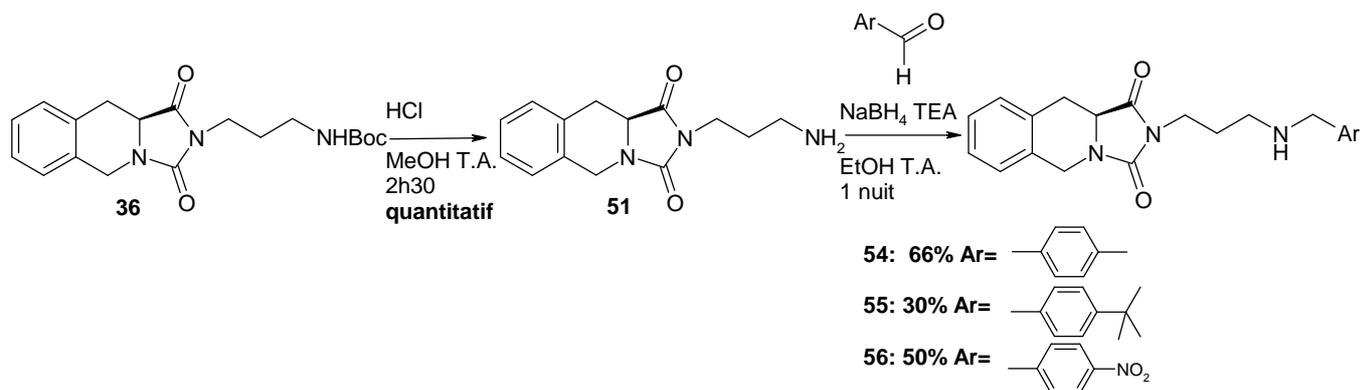


Schéma 69

Afin d'accéder aux composés désirés, la méthylation a été réalisée en présence de formaldéhyde et d'acide formique dans du MeOH, protocole utilisé précédemment pour méthyler l'amine primaire **51**. Malheureusement, la réaction n'étant pas totale, nous isolons un mélange des composés méthylé et non méthylé, impossible à séparer par chromatographie sur gel de silice.

Nous avons par ailleurs soumis les amines à une amination réductrice. En effet, nous espérons, ainsi, obtenir les composés méthylés désirés.

Effectivement, et de manière extrêmement rapide, les produits **54**, **55** et **56** soumis au cyanoborohydrure de sodium et au formaldéhyde en milieu acide, conduisent aux composés **47**, **48** et **49** avec respectivement des rendements de 23, 41 et 23%¹⁵⁹ (schéma 70).

¹⁵⁹ Richard, F. B.; Aviv I. H. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 1673-1674. New method for the methylation of amines.

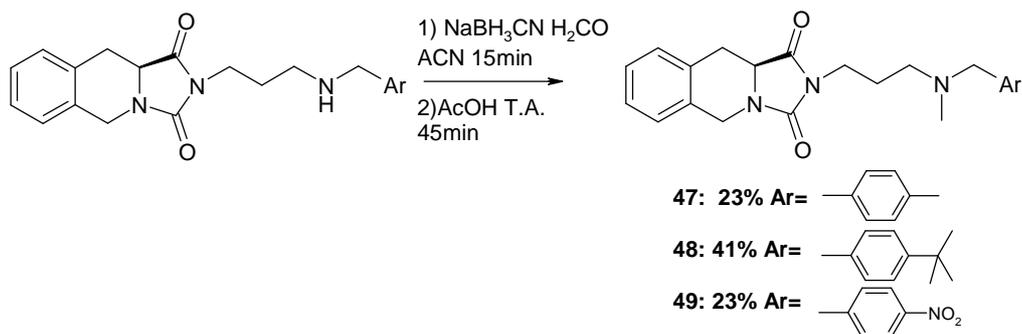


Schéma 70

Nous accédons aisément aux composés voulus. Malheureusement, nous obtenons de faibles rendements accompagnés de sous produits cyanés. Une dégradation du réactif qui avait changé d'aspect, a été mise en cause. Cette dernière méthode reste néanmoins la plus efficace, malgré les faibles rendements obtenus lors de la méthylation qui seront aisément améliorés en utilisant du cyanoborohydrure de sodium de meilleure qualité.

2. Disubstitution de l'atome d'azote protonable par 2 groupements identiques

Pour compléter notre étude nous avons voulu évaluer l'importance du méthyle dans les relations structure-activité de notre composé et vérifier que seule la présence de deux groupements hydrophobes est nécessaire, nous avons substitué l'azote protonable par deux substituants identiques (figure 80).

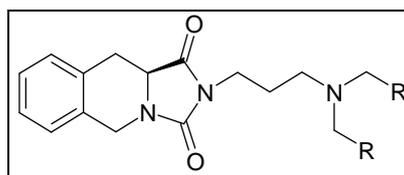


Figure 80

2.1. Substitution par deux groupements aromatiques

Afin de réaliser ces composés, nous avons procédé à une amination réductrice. Pour ce faire, l'amine **51** est condensée sur divers dérivés carbonylés pour conduire aux ions iminiums. Ces derniers sont ensuite réduits en présence d'une quantité stoechiométrique de triacétoxyborohydrure de sodium et d'acide acétique au sein du THF, à température ambiante, pour donner accès aux composés **57** à **61**, avec de bons rendements (schéma 71).

Il est à noter que les produits **59** et **60** ne sont obtenus qu'avec des rendements n'excédant pas 30% ; ces faibles résultats peuvent s'expliquer par la faible stabilité de l'amine **51**.

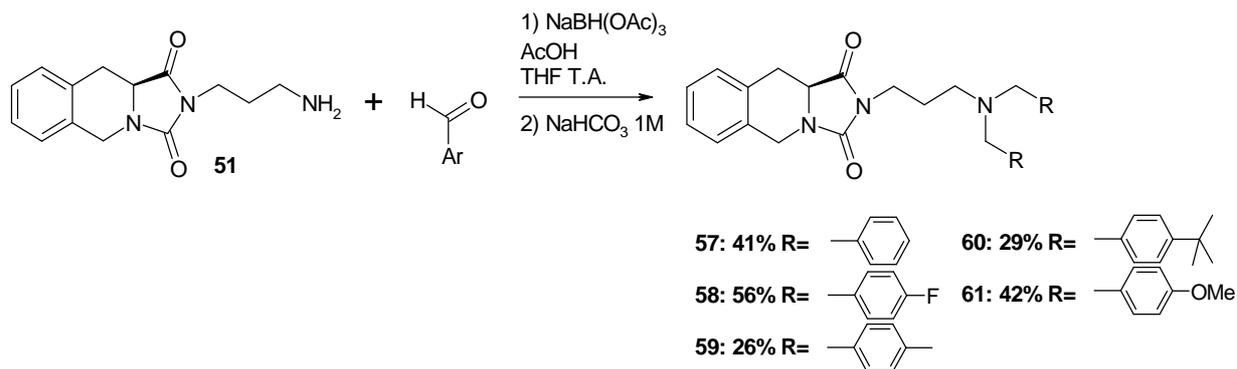


Schéma 71

2.2. Substitution par deux groupements aliphatiques

Au vu de ces résultats, suivant le même schéma de synthèse, d'autres composés disubstitués par des cyclohexyles, isobutyles ou éthyles, ont été tentés.

Dans le but d'introduire ces groupements aliphatiques, nous avons soumis l'amine **50** à une amination réductrice, en présence de triacétoxyborohydrure de sodium et de l'aldéhyde correspondant (cyclohexanecarbaldéhyde, isobutyraldéhyde ou acétaldéhyde). Les composés **62**, **63** et **64** sont obtenus avec respectivement 56%, 48% et 26% de rendement (schéma 72).

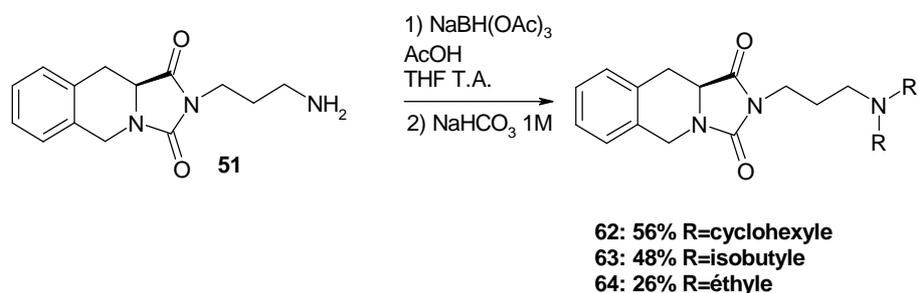


Schéma 72

Il est à noter que le composé diméthyle **53** (figure 81) avait d'ores et déjà été isolé lors de la monométhylation (§ II 2.2.f.), dans des quantités suffisantes pour l'analyse et les tests.

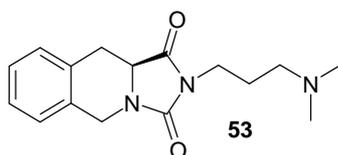
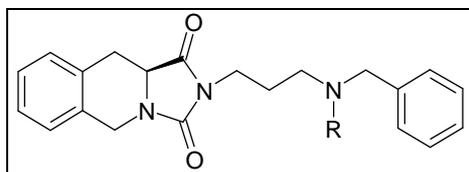


Figure 81

3. Evaluation du rôle du substituant méthyle sur l'azote protonable



Selon le modèle de Glennon⁴¹ l'atome d'azote doit être entouré par deux groupements hydrophobes tolérant des encombrements stériques et un petit substituant. Dans ce but, nous avons voulu valider cette information en ajoutant un troisième groupement encombrant (paragraphe précédent) et en remplaçant le méthyle par de petits substituants plus ou moins encombrés comme un éthyle ou un isobutyle (figure 82)

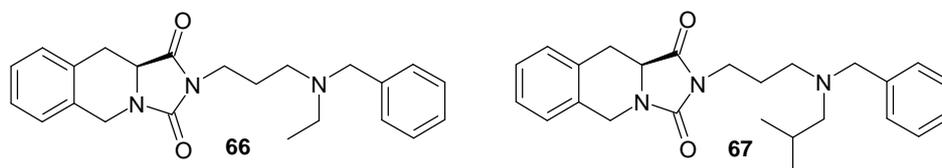


Figure 82

Afin de réaliser la synthèse de ces deux composés, nous avons appliqué les mêmes conditions que précédemment (voie B). Cette stratégie a l'avantage de pouvoir intégrer les modifications lors de la dernière étape de synthèse.

Pour ce faire, l'amine **51** est soumise à une première amination réductrice en utilisant le benzaldéhyde, le borohydrure de sodium et la TEA au sein de l'EtOH, à température ambiante. Le composé **65** est obtenu avec un rendement de 21%. Celui-ci est ensuite engagé dans une seconde réaction d'amination réductrice en présence de l'acétaldéhyde ou de l'isobutyraldéhyde, pour former les composés **66** et **67**, avec respectivement 18% et 24% de rendement (schéma 73). Ces faibles rendements peuvent s'expliquer par les difficultés de purification.

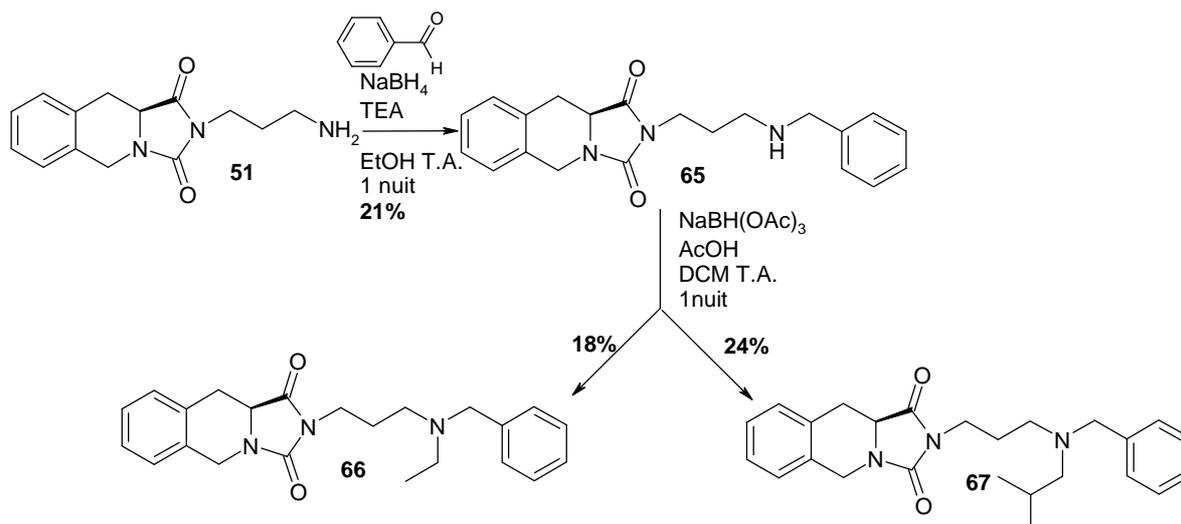


Schéma 73

4. Rigidification de la chaîne

Dans le but d'étudier l'importance d'une rigidification de la chaîne latérale, les composés **68** et **69** ont été préparés selon la stratégie de synthèse A. L'aldéhyde **41**, est soumis à une amination réductrice en présence de la tétrahydroisoquinoline ou l'indoline commerciales, de triacétoxyborohydrure de sodium et d'acide acétique dans du THF, à température ambiante (schéma 74 et 75). Les composés **68** et **69** sont isolés avec respectivement 39% et 20% de rendement. De même, ces faibles rendements peuvent s'expliquer par les difficultés de purification.

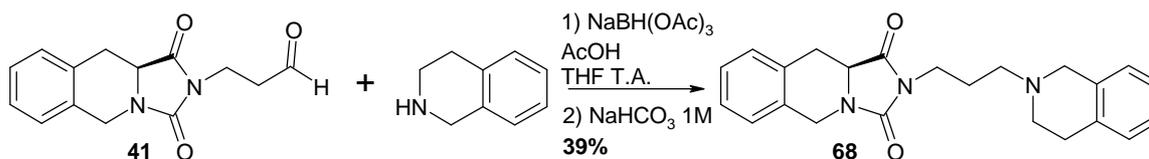


Schéma 74

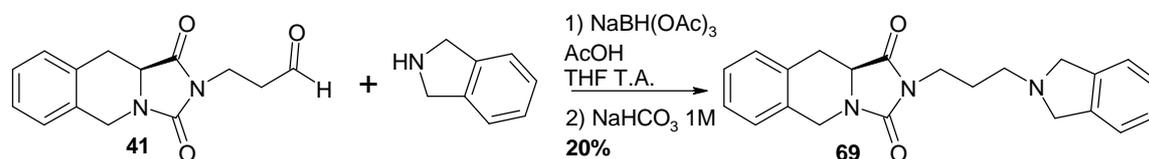


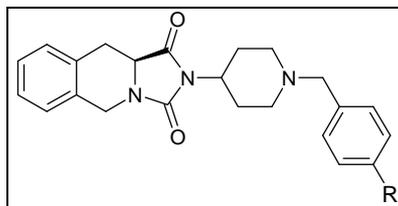
Schéma 75

5. Introduction d'un motif pipéridine et pipérazine

Nous avons observé que beaucoup de molécules se liant sur les récepteurs σ_1 possédaient un motif pipérazine ou pipéridine (introduction §5.pharmacophore). Ce pharmacophore est d'ailleurs présent dans de nombreuses classes thérapeutiques. En

conséquence, pour compléter notre étude sur les relations structure-activité, nous avons envisagé d'introduire de tels motifs dans nos structures. De plus, ces structures permettront de compléter l'étude de la rigidification de la chaîne latérale. Pour cela, deux familles de molécules, pipérazine et pipéridine ont été préparées.

5.1. La famille des pipéridines

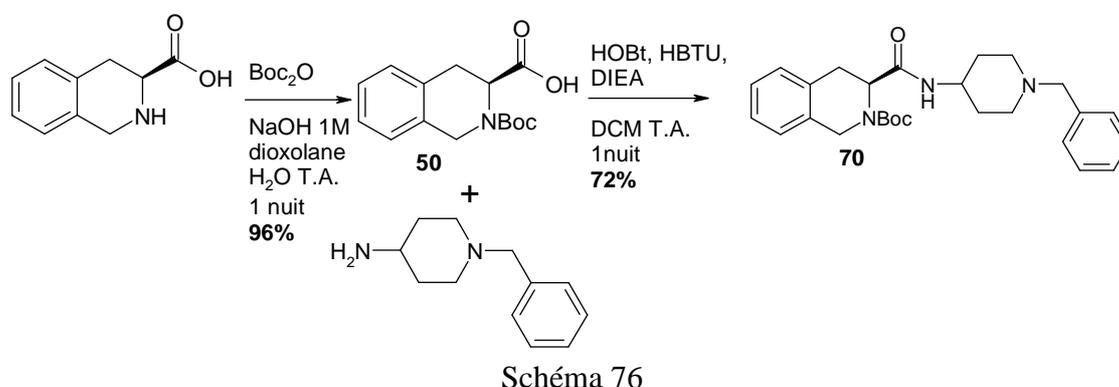


Un composé pipéridine avait d'ores et déjà été synthétisé lors d'études précédentes (projet de recherche § 2.3. molécule C₁₈). L'affinité sur la protéine σ_1 de cochon d'inde s'est avérée être très bonne ($IC_{50} \sigma_1 = 2,4nM$). En revanche, l'introduction du motif pipéridine semblait diminuer la spécificité ($IC_{50} \sigma_2 = 24nM$). Par la synthèse de cette série, nous avons ainsi voulu évaluer l'impact de différents substituants sur la structure pipéridine, sur l'affinité et surtout la spécificité envers σ_1 .

La stratégie de synthèse pour réaliser cette famille suit le même schéma réactionnel que pour former le hit (composé **12**).

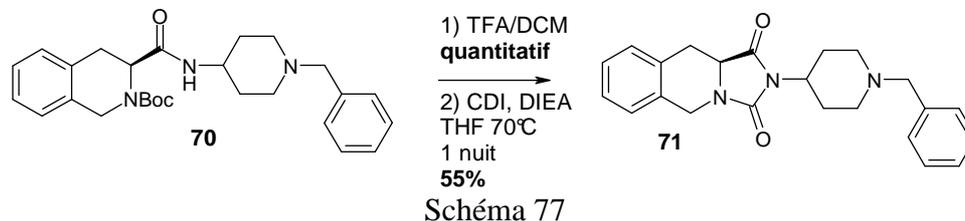
a) Condensation du dérivé pipéridine et de l'acide Tic-OH

L'acide Tic-OH est d'abord protégé sous forme de carbamate de *tert*-butoxycarbonyl en utilisant du Boc₂O en présence de NaOH dans un mélange dioxane/H₂O, à température ambiante durant une nuit. Le composé **50** est isolé avec un rendement de 96%. Le dérivé pipéridinique commercial est ensuite condensé sur l'acide **50**, pour conduire au produit **70** avec 72% de rendement (schéma 76).

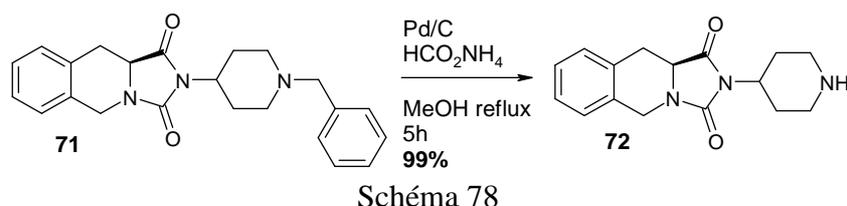


b) Cyclisation

Après déprotection du composé **70** dans un mélange DCM/TFA, la molécule est cyclisée par action du CDI, en milieu basique, au sein du THF à 70°C. Le composé **71** est isolé avec un rendement de 55% (schéma 77).

**c) Déprotection**

Dans le but d'accéder aux différents dérivés pipéridiniques, l'amine est déprotégée en présence de palladium sur charbon et de formiate d'ammonium au reflux du MeOH pendant 5h¹⁶⁰ (schéma 78). L'intermédiaire clé **72** est obtenu avec un excellent rendement de 99%.

**d) Amination réductrice**

Une fois l'amine **72** déprotégée, nous avons souhaité fonctionnaliser la pipéridine par différents groupements.

Pour ce faire, une amination réductrice est réalisée sur la fonction amine du composé **72**. L'intermédiaire clé **72** est mis en présence du triacétoxyborohydrure de sodium et de divers aldéhydes commerciaux pour donner les composés **73** à **78** avec des rendements compris entre 28 et 94% (schéma 79).

¹⁶⁰ Windhorst, A. D.; Timmerman, H.; Worthington, E. A.; Bijloo, G. J.; Nederkoorn, P. H. J.; Menge, W. M. P. B.; Leurs, R.; Herscheid, J. D. M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1754-1761. Characterization of the Binding Site of the Histamine H₃ Receptor. 2. Synthesis, in Vitro Pharmacology, and QSAR of a Series of Monosubstituted Benzyl Analogues of Thioperamide.

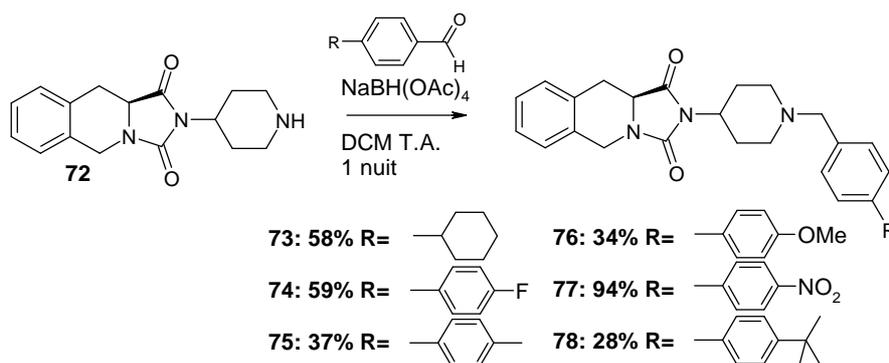
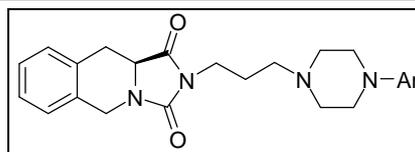


Schéma 79

5.2. La famille des pipérazines



Nous avons substitué un des deux atomes d'azote de la pipérazine par des groupements aryles. Ainsi l'atome d'azote supplémentaire n'est pas protonable, ce qui semble défavorable à l'affinité envers σ_1 d'après le modèle de Glennon.⁴¹

Pour former la famille de molécules contenant le motif pipérazine, nous avons repris le schéma de synthèse B. En procédant à une amination réductrice des pipérazines commerciales sur l'aldéhyde **41**, nous isolons les composés **79** à **83** avec des rendements compris entre 5 et 84% (schéma 80).

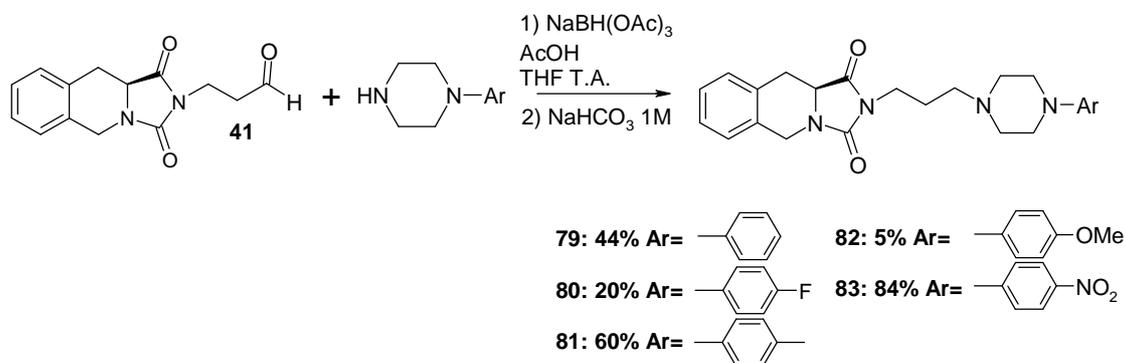


Schéma 80

L'énantiomère R du composé **71** a également été synthétisé avec un faible rendement de 14%, en raison des difficultés de purification (schéma 81).

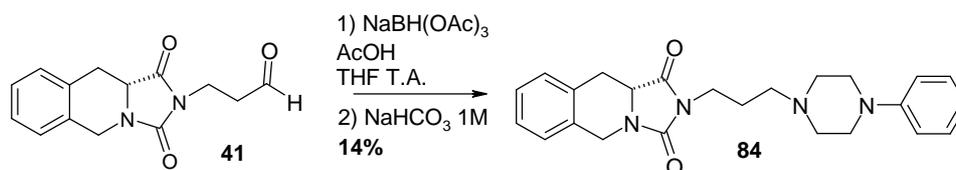


Schéma 81

6. Etudes des paramètres de Lipinski des composés

Les paramètres de Lipinski ont été évalués sur la deuxième série de molécules. Les valeurs sont représentées dans le tableau 15

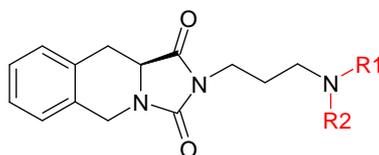
Composé	MWt	LogP	Donneurs lh	Accepteurs lh	pKa
37	381	2,8	0	5	8,41
38	369	3,4	0	5	9,44
46	396	2,6	0	6	8,57
47	377	3,2	0	5	8,65
48	420	4,4	0	5	8,67
49	408	2,5	0	8	7,62
53	287	0,8	0	5	9,44
57	439	4,6	0	5	7,54
58	475	4,7	0	5	7,38
59	467	5,5	0	5	7,86
60	551	7,8	0	5	7,90
61	499	4,4	0	7	7,70
62	452	5,9	0	5	9,44
63	372	3,6	0	5	9,28
64	315	1,9	0	5	10,28
66	377	3,2	0	5	8,57
67	405	4,1	0	5	8,41
68	375	2,8	0	5	8,58
69	361	2,2	0	5	7,63
71	375	2,4	0	5	8,10
73	381	3,6	0	5	8,91
74	393	2,5	0	5	8,02
75	389	2,9	0	5	8,26
76	405	2,4	0	5	8,18
77	420	2,2	0	8	7,23
78	432	4,1	0	5	8,28
79	404	2,5	0	6	7,17
80	422	2,8	0	6	7,11
81	418	3,0	0	6	7,28
82	434	2,3	0	7	7,22
83	449	3,0	0	9	6,55
84	404	2,5	0	6	7,17

Tableau 15 : Paramètres de Lipinski (logiciel ACDLabs)

Les composés synthétisés entrent tous dans les critères. Seul le dérivé **60** présente deux paramètres hors des critères. Notons aussi l'hydrophobie élevée des composés **59** et **62** pour un passage souhaité de la barrière hématoencéphalique.

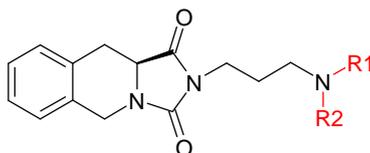
7. Etude de l'affinité

Les tests comme précédemment ont été réalisés par la société Cerep. Ils ont été effectués sur des cellules humaines en utilisant la $[H^3](+)$ pentazocine (concentration de 8nM) comme radioligand de référence et l'halopéridol (concentration de 10 μ M) comme ligand non spécifique. Les pourcentages d'inhibition de la liaison spécifique sont évalués par scintillation après une incubation de 120min à 22°C. Les résultats des molécules testées sont montrés dans les tableaux ci-dessous (Tableau 16-17-18). Les composés présentant les meilleurs IC₅₀ sur la protéine σ_1 humaine ont été évalués sur la protéine σ_2 de rat. Les tests sont évalués en duplicate. De même, en raison du faible nombre de manipulations, les résultats représentés dans les tableaux sont des indications d'IC₅₀.



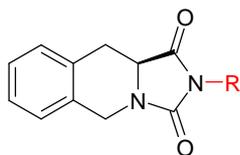
produits	R1	R2	IC ₅₀ (nM) σ_1 humain	IC ₅₀ (nM) σ_2 rat	Ratio σ_2/σ_1
12	Me		8,7	650	75
37	Me		54,6	-	-
38	Me		15,8	41	3
46	Me		126	-	-
47	Me		109	-	-
48	Me		145	-	-
49	Me		19,5	-	-

Tableau 16



produits	R1	R2	IC ₅₀ (nM) σ ₁ humain	IC ₅₀ (nM) σ ₂ rat	Ratio σ ₂ /σ ₁
12	Me		8,7	650	75
53	Me	Me	>200	-	-
57			>500	-	-
58			>200	-	-
59			>500	-	-
60			>500	-	-
61			>200	-	-
62			>200	-	-
63			>500	-	-
64	Et	Et	>500	-	-
66	Et		15,1	565	37
67			>200	-	-
68			17,2	571	33
69			10,3	545	53

Tableau 17



produits	R	IC ₅₀ (nM) σ ₁ humain	IC ₅₀ (nM) σ ₂ rat	Ratio σ ₂ /σ ₁
12		8,7	650	75
71		22,2	-	-
73		60,9	-	-
74		64,9	-	-
75		41,5	-	-
76		46,6	-	-
77		65,1	-	-
78		>200	-	-
79 (S)		197	-	-
80		86,5	-	-
81		64,0	-	-
82		78,3	-	-
83		En cours		
84(R)		>200	-	-

Tableau 18

Le remplacement du noyau phényle par des aromatiques substitués (fluor, méthoxy) semble conduire à une diminution d'affinité (composés **37** et **46**). De plus, les substitutions par des aliphatiques (méthyle, *tert*-butyle) rendant le groupement plus hydrophobe, sont très

défavorables. En revanche le composé **49** substitué par un nitro possède une bonne affinité. Un groupement attracteur serait donc plus favorable à la liaison envers σ_1 .

Le remplacement de l'aromatique par un cyclohexane (composé **38**) ne modifie pas l'affinité mais diminue fortement la sélectivité σ_1/σ_2 .

La substitution de l'azote protonable par deux substituants aromatiques induit une perte totale d'affinité (composés **57** à **61**). De même, pour la substitution par deux groupements cyclohexanes **62**, isopropyles **63**, éthyles **64** ou méthyles **53**, l'affinité est complètement perdue, ce qui renforce l'importance de la présence d'un seul groupement hydrophobe en plus de la structure Tic-hydantoïne.

La substitution du méthyle par une chaîne aliphatique plus longue est peu favorable (composé **66**), voire totalement néfaste pour une chaîne plus hydrophobe tel un groupement isobutyle (composé **67**). Un petit groupement peu encombrant reste nécessaire dans l'affinité envers σ_1 .

La rigidification de la chaîne permet le maintien de l'affinité (composé **68** et **69**) mais semble néfaste à la sélectivité σ_1/σ_2 .

Enfin, malgré la présence de motifs pirérazine et pipéridine dans les ligands des récepteurs σ_1 , l'ajout de ces motifs sur notre structure Tic-hydantoïne apparaît défavorable (composés **71** à **84**). Il est à noter que lors d'études précédentes le composé **71** avait été testé sur la protéine σ_1 de cochon d'inde ($IC_{50} = 2,4nM$), or l'affinité sur la protéine humaine est diminué d'un facteur dix. Cette différence importante devra être confirmée par d'autres tests. De plus, toute substitution sur la pipéridine est défavorable, le groupement nitro et cyclohexyle, habituellement les meilleurs substituants, sont dans cette famille défavorables. En revanche, dans le cas des pipérazines, l'ajout de substituant augmente l'affinité. Néanmoins, celles-ci sont toutes moins affines que le composé **12** (figure 83).

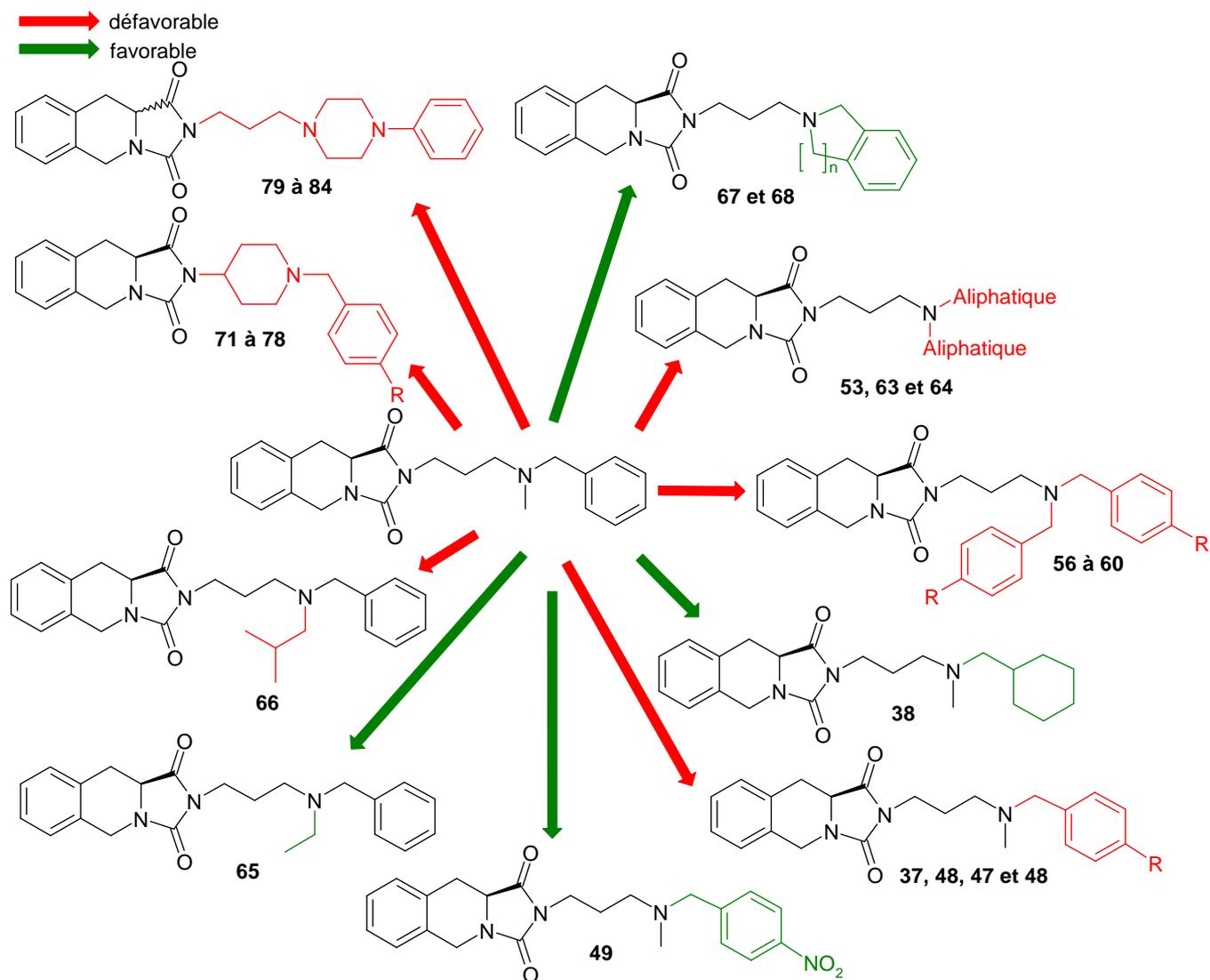


Figure 83 : Relation Structure-Activité.

Etudes Comportementales

Etudes comportementales

Grâce à une collaboration avec le Dr. Tangui Maurice du laboratoire U.710 de Montpellier, nous avons réalisé des études comportementales sur nos composés les plus affins dans le but d'évaluer leurs propriétés vis-à-vis de la cocaïne. L'évaluation des composés **10**, **12**, **13**, **66**, **68** et **69** (figure 84) a donc été envisagée.

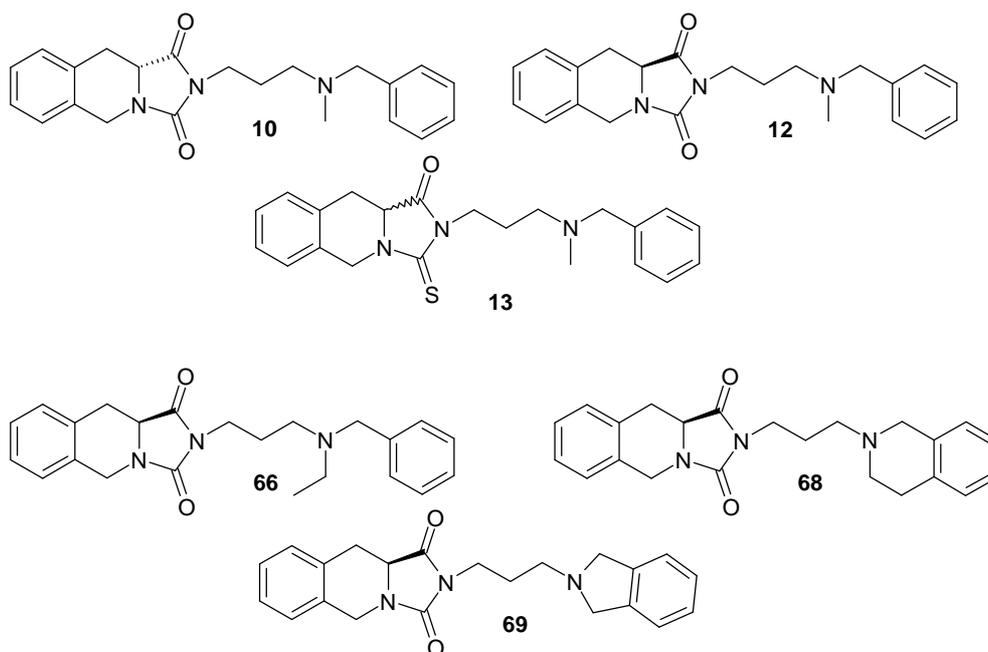


Figure 84

Les tests du composé **13** ont vite été arrêtés étant donné la mise en évidence d'une racémisation du composé.

Une étude complète a été réalisée sur les hydantoïnes **10** et **12**. Elles ont été testées sur différents effets induits par la cocaïne : l'hyperactivité, l'appétence et la dépendance d'état chimique. Ces effets sont étudiés par des tests caractéristiques dans l'étude des drogues.⁸⁶

Nous avons poursuivi les études comportementales des composés de cette série en choisissant à la fin de la thèse les molécules les plus affines que nous avons obtenues. Les composés **66**, **68** et **69** ont donc fait l'objet d'études préliminaires. Seule une expérience sur les effets hyperlocomoteurs aigus induits par la cocaïne, à une seule dose, a été évaluée.

1. Etude de l'hyperactivité

L'effet euphorisant produit par la cocaïne chez l'homme se mesure par l'effet hyperlocomoteur chez l'animal.¹⁶¹ Cette hyperactivité s'observe à de faibles doses de cocaïne.

¹⁶¹Wise, R. A.; Bozarth, M. A. *Psychol. Rev.* **1987**, *94*, 469-492. A psychomotor stimulant theory of addiction.

A plus forte dose, des comportements stéréotypés apparaissent chez l'animal: toilette, reniflement¹⁶²... Ces comportements traduisent la schizophrénie et la psychose chez l'homme.

L'effet hyperlocomoteur peut être étudié grâce à un test de locomotion. Les composés ont été évalués sur deux réponses induites par des injections répétées de cocaïne: l'apparition de l'hyperactivité locomotrice et la sensibilisation à cette réponse.

1.1. Méthode

Les composés **10** et **12** ont été étudiés aux doses de 0,3, 1, 3, 10mg/kg i.p, injectées 10min avant la cocaïne administrée à 10mg/kg i.p. La souris est ensuite placée dans une cage d'actimétrie traversée par des faisceaux infra rouge (figure 85).



Figure 85 : Cage d'actimétrie.

L'activité locomotrice est mesurée par le nombre de fois que la souris coupe un faisceau infra rouge. Elle est ensuite suivie pendant 40min toutes les 10min. Les résultats présentent la somme sur les 30 dernières minutes du test. L'activité a été mesurée durant quatre jours (de J1 à J4), après injection des composés.

Puis les animaux n'ont rien reçu pendant 4 jours. Au jour 9, ils reçoivent tous une injection de cocaïne à 10mg/kg i.p, et l'activité locomotrice est mesurée (figure 86).

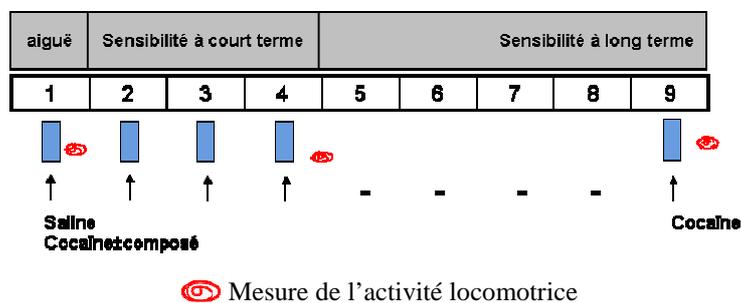


Figure 86 : Procédure du test de locomotion.

¹⁶² Sams-Dodd, F. *Rev. Neurosci.* **1999**, *10*, 59-90. Phencyclidine in the social interaction test: an animal model of schizophrenia with face and predictive validity.

Ce test permet de calculer:

- l'hyperactivité après une injection de cocaïne, mesurée à J1.
- la sensibilité à court terme induite par une administration répétée de cocaïne, mesurée à J4.
- la sensibilité à long terme, développée après une cessation de prise de drogue, mesurée à J9.

1.2. Résultats

La cocaïne a d'abord été testée seule à deux doses: 10mg/kg i.p. (figure 87a) et 20mg/kg i.p. (figure 87b). L'activité locomotrice est représentée en ordonnée. Les différents traitements sur les souris sont représentés en abscisse. Le nombre de souris pour chaque groupe est indiqué sur chaque colonne. Le groupe témoin est traité avec une solution saline (V) et le groupe d'étude avec 10 ou 20mg/kg i.p de cocaïne.

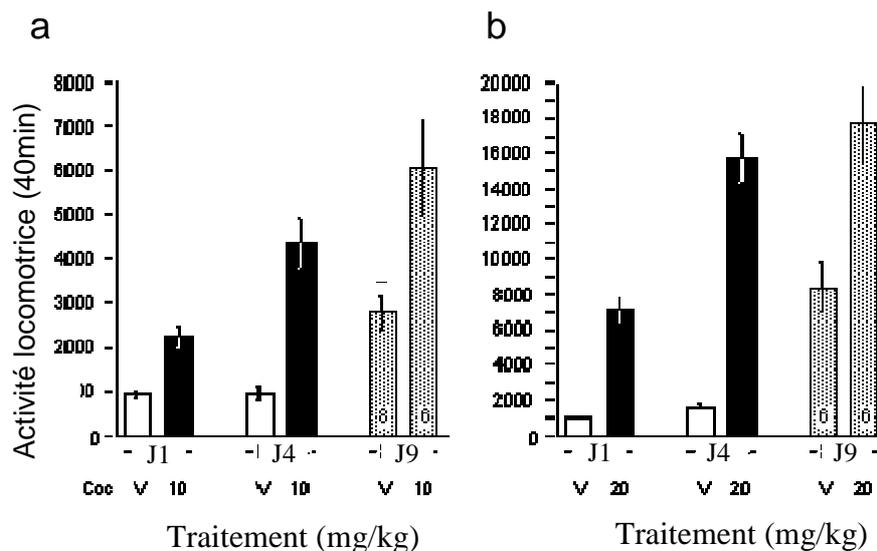


Figure 87 : Etude de l'activité locomotrice de la cocaïne.

La cocaïne induit une hyperlocomotion après une injection aiguë de 10 et 20mg/kg, avec une activité locomotrice respectivement supérieure à 2000 et 7000 faisceaux coupés en 40min. Cette hyperlocomotion est retrouvée, avec une intensité plus élevée, à J4 et à J9. Une sensibilisation est observée pour les différentes doses de cocaïne puisque l'injection à J9 provoque une réponse locomotrice très importante. Ces effets sont doses dépendants.

Pour le groupe témoin, l'activité locomotrice tourne autour de 1000 faisceaux coupés. A J9, il reçoit une injection de cocaïne. L'activité locomotrice est donc aussi élevée que pour le groupe d'étude à J1.

Les composés **10** et **12** ont ensuite été testés seuls. Les souris reçoivent une injection de produit à différentes doses (0,3, 1 et 3mg/kg) de J1 à J4. Puis à J9, elles reçoivent une injection de cocaïne (10mg/kg) (figures 88 et 89).

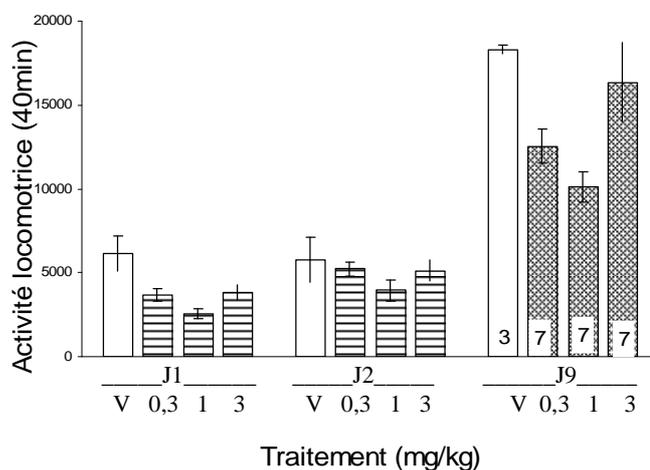


Figure 88: **Etude de l'activité locomotrice du composé 10 seul.**

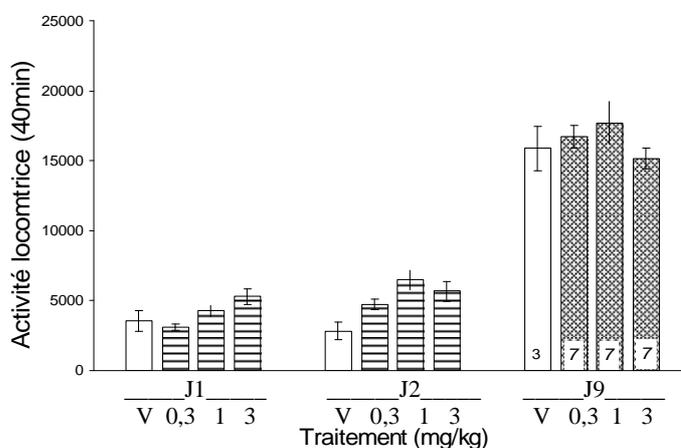


Figure 89: **Etude de l'activité locomotrice du composé 12 seul.**

En administration seul, les composés **10** et **12** n'induisent pas de locomotion. A J9, les souris se comportent comme lors d'une première prise aiguë de cocaïne.

Enfin, les deux énantiomères ont été évalués en co-injection avec la cocaïne. Les souris reçoivent une double injection :

- Solution saline-solution saline (V-V) pour le groupe témoin.

- Solution saline-cocaïne (10mg/kg) pour le groupe témoin-cocaïne.
- Cocaïne (10mg/kg) + composés **10** ou **12** à différentes doses (0,3, 1, 3, 10mg/kg) pour le groupe d'étude.

Une dose intermédiaire de cocaïne (10mg/kg) a été injectée dans ce test pour mieux voir l'effet positif ou négatif de la substance étudiée par rapport à celle de la cocaïne.

Les résultats des composés **10** et **12** sont représentés dans les figures 90, 91 et 92.

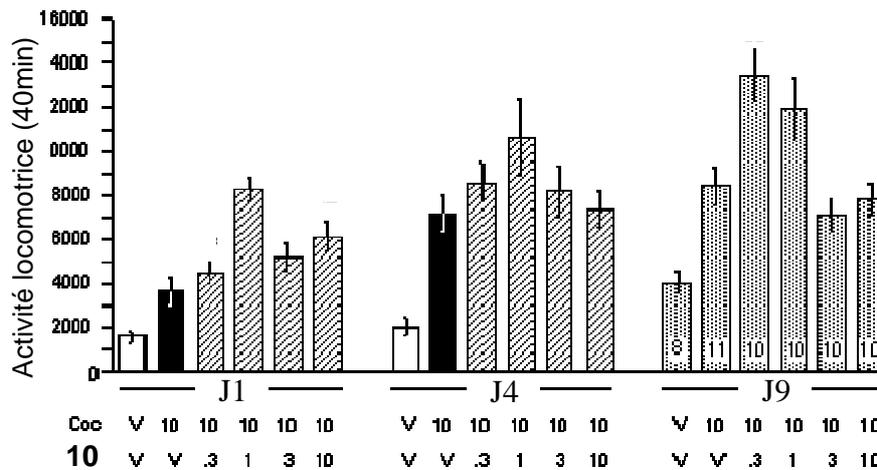


Figure 90 : **Etude de l'activité locomotrice du composé 10.**

Dès J1, une augmentation de l'effet hyperlocomoteur aigu induit par une injection de cocaïne apparait avec un pic à 1mg/kg de composé **10**. Cette amplification des effets se retrouve aussi à J4 et J9 avec un pic à 1 et 0,3mg/kg. Le composé **10** augmente donc la sensibilité à la cocaïne à court terme et à long terme.

La figure 91 compare les différentes activités locomotrices pour les différents traitements (solution saline V, cocaïne (10mg/kg), cocaïne + composé **10** (0,3mg/kg) et cocaïne + composé **10** (1mg/kg)).

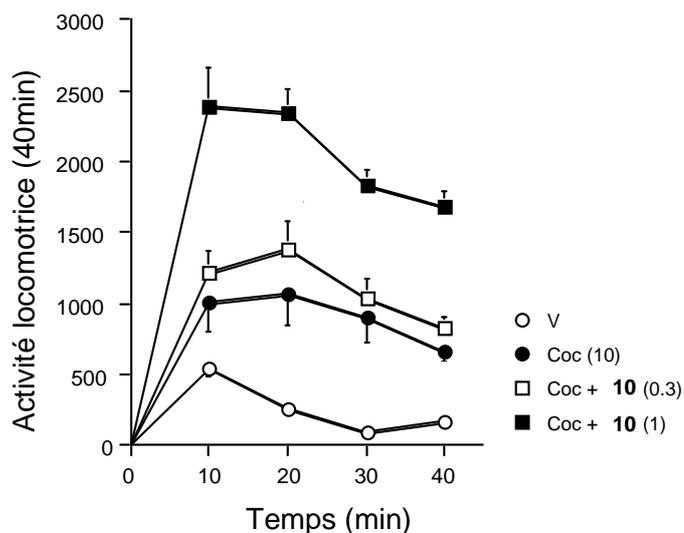


Figure 91 : **Etude de l'activité locomotrice du composé 10.**

Dans cette étude de l'activité locomotrice pendant 40min, nous observons que la cocaïne induit une activité locomotrice. En effet, la courbe du groupe recevant de la cocaïne atteint des valeurs beaucoup plus importantes que celles atteintes par le groupe témoin. Cette hyperlocomotion diminue avec le temps. De plus, la pré-administration du composé **10** augmente, de façon dose dépendant, cette réponse hyperlocomotrice induite par la drogue.

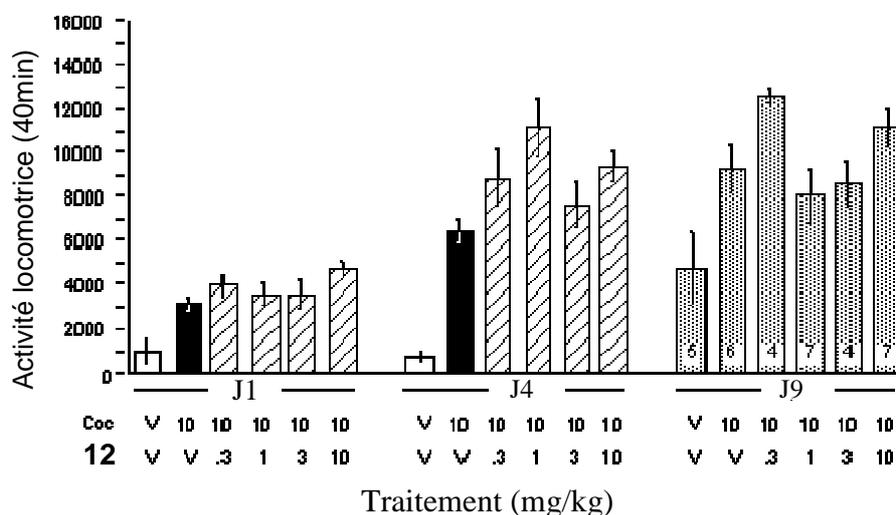


Figure 92 : **Etude de l'activité locomotrice du composé 12.**

De même, pour le composé **12**, une potentialisation de la sensibilité est observée à court (0,3 et 1mg/kg) et à long terme avec un pic à 0,3mg/kg. Néanmoins, il n'induit pas d'effet à J1.

1.3. Discussion

Les composés **10** et **12**, n'induisent pas d'effets hyperlocomoteurs seuls. Par contre en co-injection avec la cocaïne, ils potentialisent les effets stimulants de la drogue. En effet, le composé **10** amplifie la réponse hyperlocomotrice aiguë. Ces deux composés augmentent la sensibilité à court terme, après une co-injection répétée de drogue et des composés, et de la sensibilité à long terme, après une cessation de prise de toutes substances suivie d'une seule injection de cocaïne.

Le composé **10** apparaît comme le plus efficace des deux composés. En effet, il augmente les effets dès la première prise aiguë de cocaïne. Néanmoins les valeurs à J4 et J9 sont sensiblement équivalentes entre les deux composés.

1.4. Etude de l'activité locomotrice des composés **66**, **68** et **69**

Les composés **66**, **68** et **69** ont fait l'objet de tests préliminaires sur les effets hyperlocomoteurs aigus induits par une seule injection de cocaïne (10mg/kg). Les souris reçoivent une double injection:

- Solution saline-solution saline (V-V) pour le groupe témoin.
- Solution saline-cocaïne (10mg/kg) pour le groupe témoin-cocaïne.
- Composés **66**, **68** ou **69** (1mg/kg) pour le premier groupe d'étude.
- Cocaïne (10mg/kg) + composés **66**, **68** ou **69** (1mg/kg) pour le deuxième groupe d'étude.

Les résultats sont représentés dans les figures 93, 94 et 95. Il est à noter que le nombre de souris pour chaque groupe est représenté par les valeurs sur les colonnes.

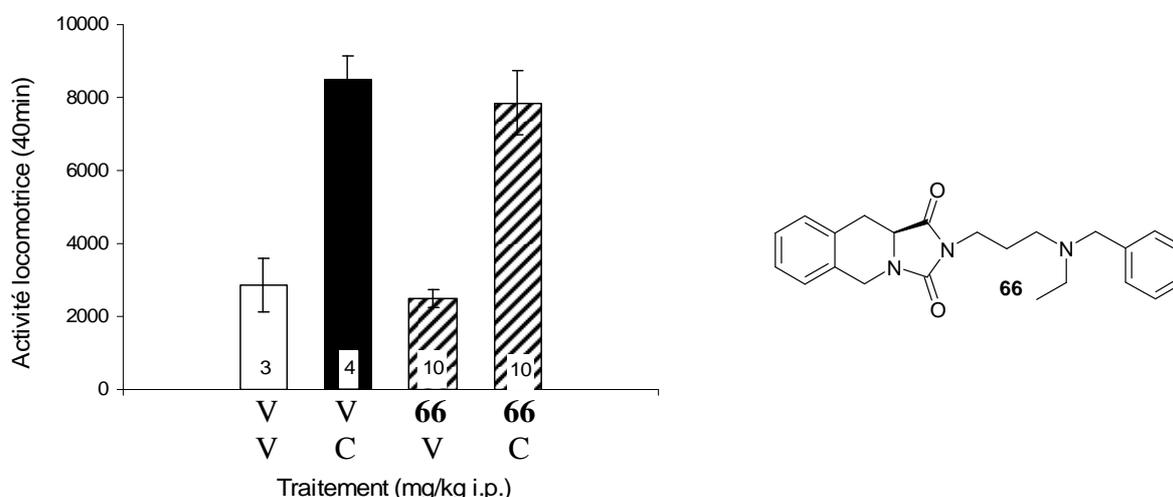
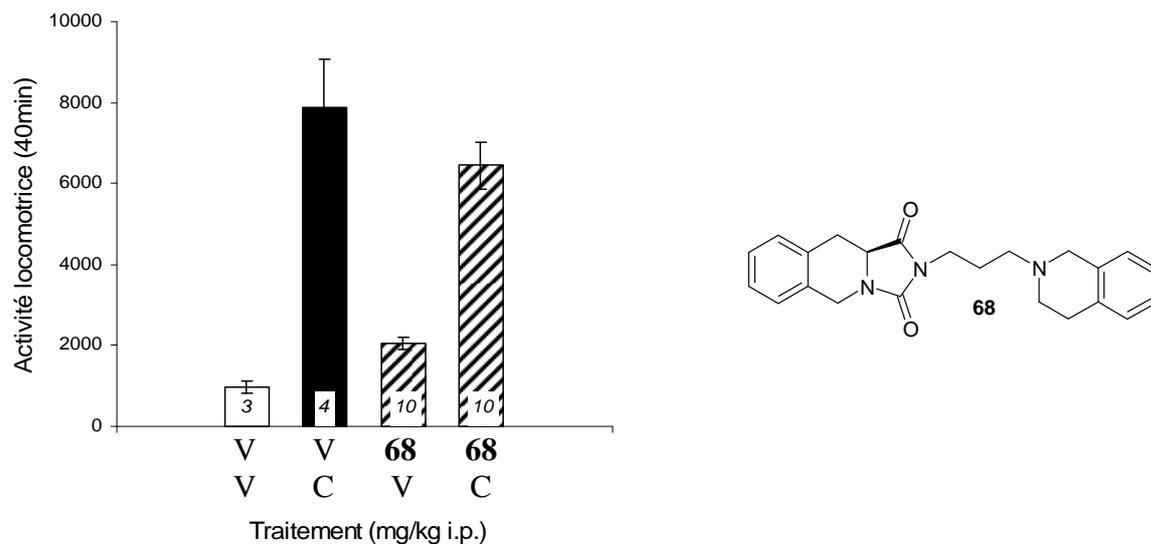
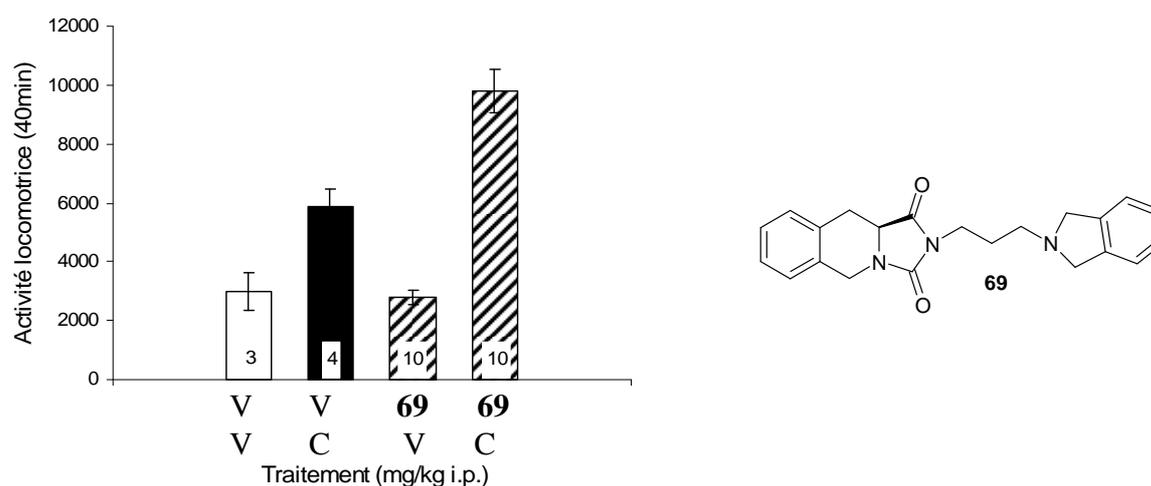


Figure 94 : Etude de l'activité locomotrice du composé **66**.

Figure 95 : Etude de l'activité locomotrice du composé **68**.Figure 96 : Etude de l'activité locomotrice du composé **69**.

Le composé **66** ne semble pas induire d'effets sur la locomotion lors d'une injection aiguë de cocaïne. En revanche, le composé **69** aurait un profil agoniste. En effet, il potentialise les effets hyperlocomoteurs induits par la cocaïne. Le composé **68** montre une légère diminution de l'hyperactivité. Il est néanmoins peu probable qu'il ait un profil de type antagoniste en raison de la faible différence de structure avec le composé **69**, possédant clairement un profil agoniste. Ces premières études devront être approfondies afin d'étudier leur efficacité sur la sensibilité et les effets appétants induits par la cocaïne.

2. Etude des effets appétants

Le test du conditionnement de préférence de place dit « CPP » permet de mettre en évidence les propriétés appétantes ou aversives d'une substance. Il montre le pouvoir hédonique d'un produit.

2.1. Méthode du test de CPP

La souris est placée dans une boîte à deux compartiments, l'un, blanc, lumineux, à sol grillagé, l'autre, noir, obscure, à sol lisse, séparés par une porte guillotine (Figure 97). Ce test consiste à conditionner l'animal à associer la prise de drogue à un des deux compartiments.

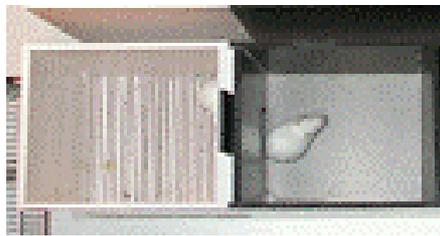


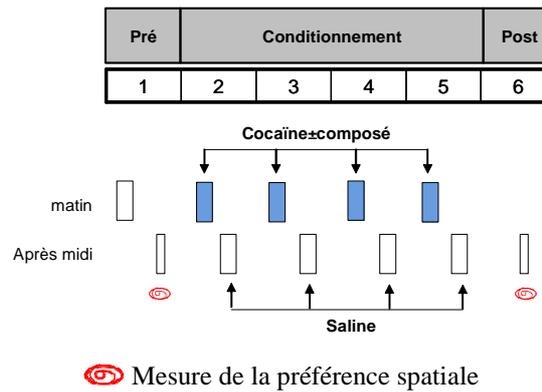
Figure 97 : **Boîte en PVC du test CPP.**

Le schéma de la procédure de ce test est décrit en figure 98.

Le pré-conditionnement : Le premier jour (J1), la souris est placée dans la boîte. Elle est libre d'explorer les deux compartiments lors de deux séances (une le matin et l'autre l'après midi). La préférence spatiale spontanée ou préférence naturelle de l'animal est calculée en mesurant le temps passé dans chaque compartiment.

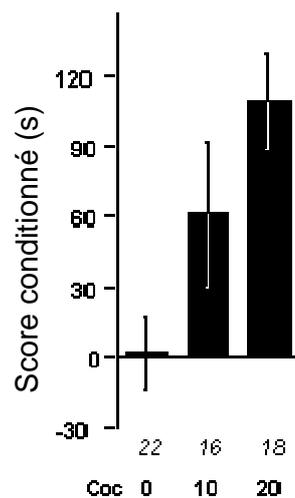
Le conditionnement : le matin, durant plusieurs jours, la souris est conditionnée à recevoir des injections quotidiennes de cocaïne, du composé étudié ou une co-injection composé-cocaïne. Puis celle-ci est confinée dans un compartiment pendant 30min. L'après-midi, l'animal reçoit une solution saline avant confinement dans l'autre compartiment.

Le post-conditionnement : 24h après la dernière session de conditionnement, la préférence spatiale conditionnée de la souris est mesurée lors d'une session de libre exploration de 10min, en mesurant le temps passé dans chaque compartiment. Le score conditionné se calcule par la différence de temps passé dans le compartiment associé à la drogue entre les séances de post et de pré-conditionnement.^{107,108,109}

Figure 98 : **Procédure du test CPP.**

2.2. Résultats du test de CPP

Sur les différents graphiques de résultats, le score conditionné est représenté en ordonnée et le traitement administré aux souris et le nombre en italique de souris est indiqué en abscisse. La cocaïne a d'abord été étudiée seule à différentes doses 10 et 20mg/kg (figure 99).

Figure 99 : **CPP du produit de la cocaïne seule.**

Pour le groupe témoin, ne recevant pas de drogue, il n'y a pas de score conditionné, les souris n'ont pas de préférence de compartiment entre les deux séances de pré et post conditionnement.

Par contre, la cocaïne induit un CPP dépendant de la dose à 10 et 20mg/kg, avec un score conditionné respectivement de 60s et 110s.

Le composé **10** a ensuite été testé seul (figure 100).

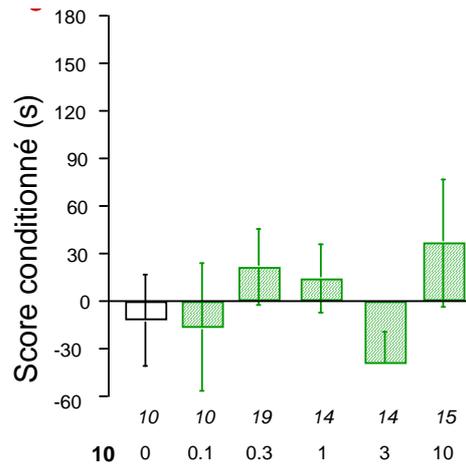


Figure 100 : CPP du produit 10 seul.

Injecté seul, il n'engendre pas de score conditionné, il n'induit pas de CPP. En d'autres termes, il ne présente pas d'effets appétants.

Les deux produits sont évalués sur le test de CPP pour différentes doses croissantes (0,1-0,3-1-3-10mg/kg), en co-administration avec une dose intermédiaire de cocaïne (10mg/kg). L'injection des produits se fait 10min avant celle de la cocaïne lors du conditionnement. Les résultats sont représentés dans les figures 101 et 102.

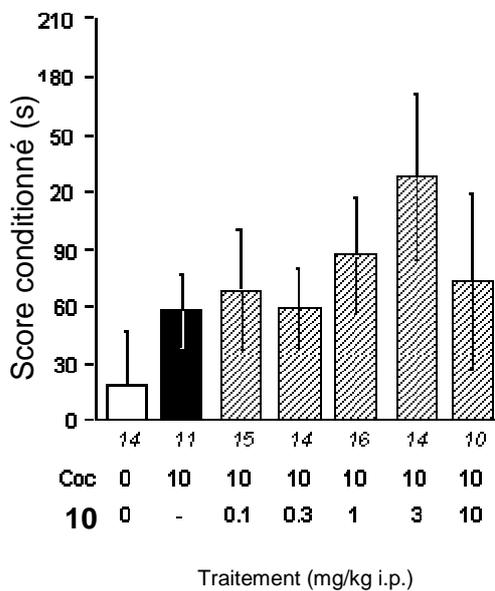


Figure 101 : CPP du produit 10.

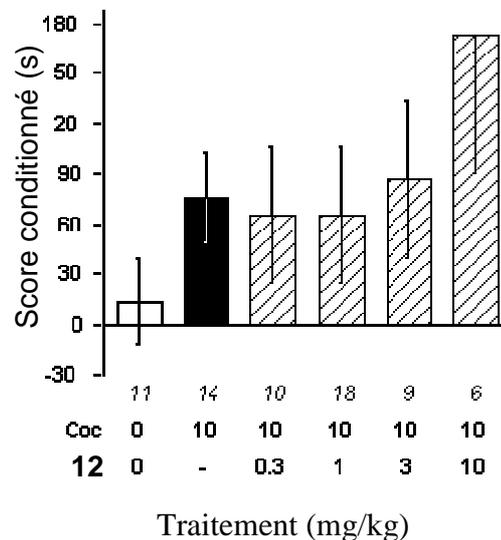


Figure 102 : CPP du produit 12.

Dans les deux cas, une augmentation significative du CPP est observée à 3mg/kg pour le produit 10 et à 10mg/kg pour le 12. Ce phénomène est aussi retrouvé lors de l'étude de

plusieurs agonistes des récepteurs σ_1 : l'igmesine, la DHEA et la pregnenolone.¹⁰⁹ De plus, pour un même score conditionné atteint de 120s, la quantité injectée de produit **10** (3mg/kg) est plus faible que celle des agonistes précédents (igmésine : 10mg/kg, DHEA : 20mg/kg, pour les différentes doses testées de pregnenolone, 10 et 20mg/kg, le score conditionné n'atteint pas 120s).

Afin de vérifier que ces effets se faisaient bien par l'intermédiaire des récepteurs σ_1 , le composé **10** a été testé en présence de BD-1047, un antagoniste sélectif des récepteurs σ_1 (figure 103).

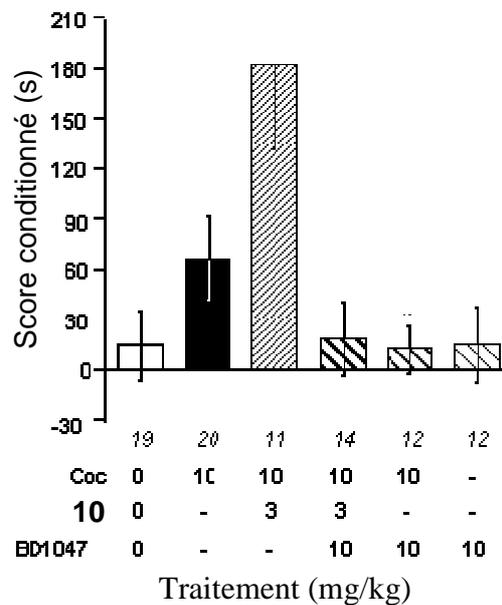


Figure 103 : **CPP du produit 10 + BD-1047.**

La potentialisation induite par le produit **10** est complètement bloquée par l'administration du BD-1047, prouvant ainsi l'implication des récepteurs σ_1 dans les effets appétants de la drogue. Le score est dans ce cas similaire à celui obtenu en absence de composé **10** ou même de cocaïne.

Les résultats du composé **12** étant moins significatifs par rapport au composé **10** nous n'avons pas poursuivi les études sur ce produit.

2.3. Méthode de la réactivation du CPP

Le CPP peut être éteint après acquisition.

Les souris sont conditionnées pendant une semaine, d'après la méthode précédente, avec 30mg/kg de cocaïne. Cette dose importante permet de bien conditionner les animaux et ainsi d'obtenir un score conditionné important de 105s.

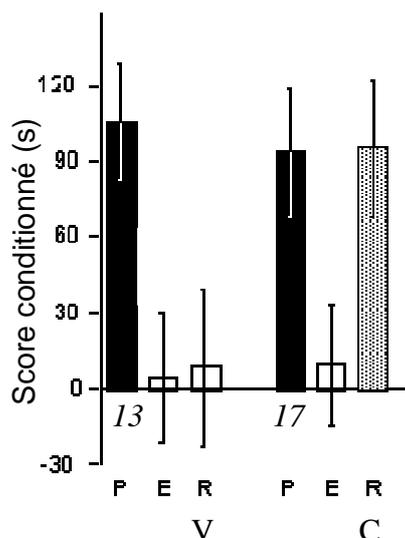


Figure 105 : Réactivation du CPP de la cocaïne.

Lors du post conditionnement P, avec la cocaïne 30mg/kg, nous observons comme prévu un important score conditionné (>90). Puis à J12, l'extinction est vérifiée, pour cela le score conditionné est calculé. Dans les deux cas le score conditionné est presque nul. Enfin lors de la phase de réactivation, le premier groupe est traité avec une solution saline, il n'y a donc pas de réactivation du CPP comme attendu. En revanche la réactivation se fait pour le deuxième groupe traité avec une dose de 15mg/kg, provoquant un score conditionné similaire à celui mesuré lors du post-conditionnement.

La réactivation induite par le composé **10** a été étudiée (figure 106).

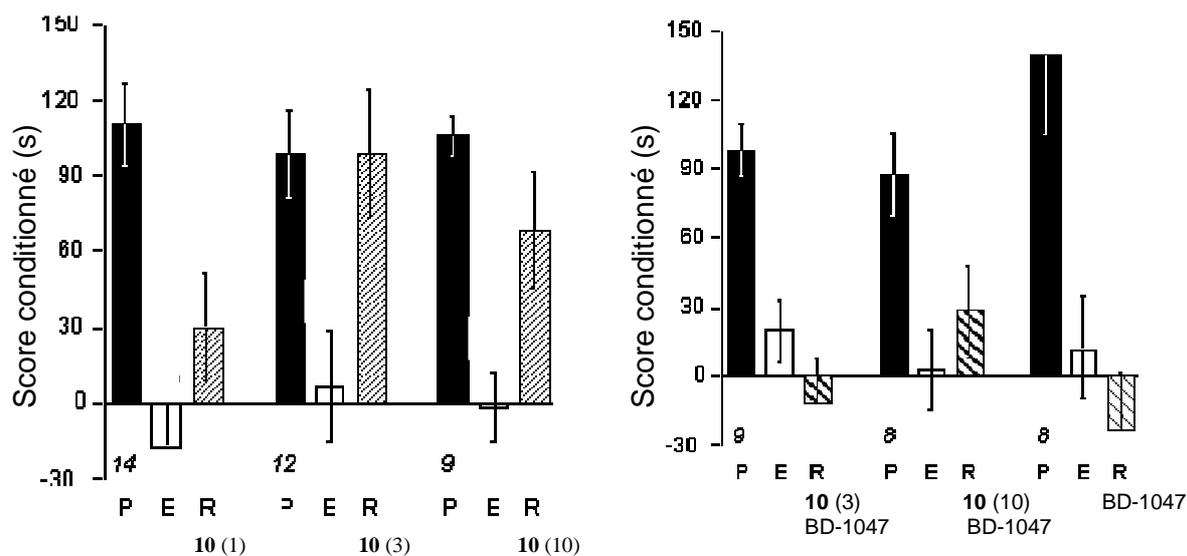


Figure 106 : Réactivation du CPP du produit 10 et BD-1047.

Pour différentes doses de composé, 1, 3, 10mg/kg, une réactivation du CPP est observée, plus prononcée pour 3mg/kg. Le résultat est équivalent à celui obtenu pour la cocaïne administré à 15mg/kg lors de la réactivation.

L'implication du récepteur σ_1 a aussi été mise en évidence dans la réactivation du CPP en pré-administrant du BD-1047 avant l'injection du composé **10**.

La réactivation induite précédemment par une injection de composé **10** est totalement bloquée par l'ajout du BD-1047.

2.5. Discussion

Les composés **10** et **12** agissent comme des agonistes des récepteurs σ_1 . Ils n'ont pas d'effets seuls mais potentialisent les effets hyperlocomoteurs et le CPP induits par la cocaïne. De plus, le composé **10** réactive le CPP avec une dose de 3mg/kg. Cette même valeur est retrouvée lors de la réactivation avec l'igmesine. En revanche la DHEA réactive le CPP avec des doses plus fortes, de 20 et 40mg/kg.¹⁶³

Nous ne pouvons pas parler de dépendance et de rechute dans l'interprétation des résultats obtenus avec le test du CPP. Mais il présente l'avantage de mettre en évidence les propriétés appétantes d'une substance. Il permet d'évaluer l'implication potentielle d'une substance dans le système de récompense d'une drogue. L'étude du CPP est un test préliminaire avant le test de l'auto-administration. Ce test permet de mesurer les propriétés appétantes de la drogue, condition nécessaire mais non suffisante à l'addiction. Il ne permet pas d'intégrer la composante renforçante de la drogue, seule accessible dans des procédures d'auto-administration.

Pour étendre notre étude sur le composé **10**, il faudrait maintenant déterminer son effet sur l'auto-administration de cocaïne chez le rat.¹⁶⁴ Par ce test nous pourrions déterminer, dans un premier temps, si une injection du composé **10** modifie la courbe dose-réponse d'auto-administration de la cocaïne et dans un deuxième temps, si les rats peuvent spontanément s'auto-administrer le composé. Ces expériences permettraient de conclure sur l'intérêt d'une thérapie agoniste du composé **10** dans l'addiction à la cocaïne.

¹⁶⁴ Martin-Fardon, R.; Lorentz, C. U.; Stuempfig, N. D.; Weiss, F. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2005**, *82*, 46-54. Priming with BTCP, a dopamine reuptake blocker, reinstates cocaine-seeking and enhances cocaine cue-induced reinstatement.

3. Etude des propriétés de dépendance d'état chimique

3.1. Méthode

Le test de l'évitement passif a également été réalisé sur le composé **10**. C'est une expérience d'apprentissage dépendant de l'état chimique.

Une information ou un comportement acquis lors d'un état affectif ou chimique particulier, sera automatiquement rappelée quand l'organisme sera dans le même état. En d'autres termes, le rappel dans un état chimique ou affectif différent entrainera une baisse d'efficacité ou un blocage complet à retrouver la réponse. Ce phénomène est appelé la dépendance d'état chimique. Pour déterminer cet état de dépendance, le test de l'évitement passif a été mis au point.¹⁶⁵

L'appareil se compose d'une cage transparente avec un sol grillageux et une plateforme en bois placée au centre. Un choc électrique de 35V peut être délivré au niveau du sol (figure ci-contre).

La dépendance d'état est mesurée chez l'animal par des sessions d'entraînement répétitifs. Lors de la session d'acquisition, l'animal est soumis à plusieurs traitements possibles avant le premier entraînement:

- Cocaïne 0,1mg/kg
- Cocaïne 0,3mg/kg
- Composé **10** 0,3mg/kg
- Solution saline
- Cocaïne 0,1 + composé **10** 0,3mg/kg
- Cocaïne 0,3mg/kg + composé **10** 0,3mg/kg

Puis l'animal est placé sur la plateforme. Quand il descend un faible choc électrique (35V) est délivré pendant 15s. Le temps de latence, c'est-à-dire, le temps passé sur la plateforme avant de descendre, est mesuré. Les

entraînements se succèdent jusqu'à ce que la souris atteigne le critère : rester sur la plateforme plus de 60s. Les souris reçoivent de 0,1 à 0,3mg/kg de produit car la dépendance d'état chimique s'observe à de faibles doses.



¹⁶⁵Zarrindast, M. R.; Jafari, M. R.; Ahmadi, S.; Djahanguiri, B. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *487*, 143-148. Influence of central administration ATP-dependent K⁺ channel on morphine state-dependent memory of passive avoidance.

La session de rétention est réalisée 24h après, de la même manière que l'entraînement sauf qu'aucun choc électrique n'est délivré. Chaque souris reçoit une injection d'un des six traitements. Elle est ensuite placée sur la plateforme et le temps de latence est mesuré avec un temps maximal de 300s.

Deux mesures paramétriques sont alors mesurées lors de la rétention.

- Le temps de latence exprimé par la médiane et l'écart interquartile (25% et 75%).
- Le ratio de latence calculé par le temps de latence pendant la session de rétention sur le temps de latence lors de la dernière session avant d'atteindre le critère. Le ratio est transformé en log.

L'état de dépendance chimique induit par un produit est observé quand l'animal reçoit le même produit avant l'acquisition et la session de rétention lors de la tâche d'évitement passif. En effet, un animal recevant un traitement répété (solution saline/solution saline ou produit/produit) avant l'acquisition et la rétention montrera des capacités optimales de rétention. En revanche, un animal recevant un traitement croisé (solution saline/produit ou produit/solution saline) montrera un déficit significatif dans les paramètres de rétention.

Les drogues addictives, à cause de leur potentiel renforçant, induisent un état chimique important dans le cerveau conduisant à une dépendance d'état chimique. Cet effet est observable à de faibles doses, inférieures à celles nécessaires à l'observation des effets psychostimulants.¹⁶⁶

3.2. Résultats

Etude de la dépendance d'état chimique induite par la cocaïne seule.

La dépendance d'état chimique, provoquée par la cocaïne à différentes doses 0,1 (Figure 107) ou à 0.3mg/kg i.p. (Figure 108), a d'abord été étudiée. Les souris reçoivent :

- Soit un traitement répété solution saline/saline (V/V) ou cocaïne/cocaïne lors des sessions d'acquisition ou de rappel.
- Soit un traitement croisé V/cocaïne ou cocaïne/V.

Les graphiques « a » et « b » indiquent respectivement le temps de latence et le rapport de latences exprimé en log. Le nombre de souris pour chaque groupe est représenté sur les colonnes.

¹⁶⁶ Romieu, P.; Lucas, M.; Maurice, T. *Neuropsychopharmacology* **2006**, *31*, 1431-1443. $\sigma 1$ receptor and related neuroactive steroids interfere with the cocaine-induced state of memory.

Le temps de latence est représenté en ordonnée et les différents traitements que reçoit la souris lors des sessions d'acquisition et de rétention en abscisse. Le temps de latence est représenté par la barre indiquant la médiane et les deux extrémités les écarts interquartiles (25% et 75%).

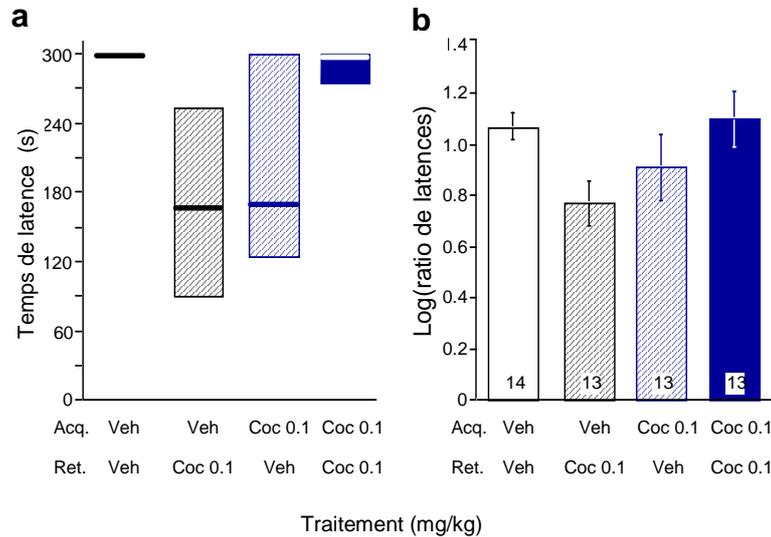


Figure 107 : Dépendance d'état chimique de la cocaïne à 0,1mg/kg.

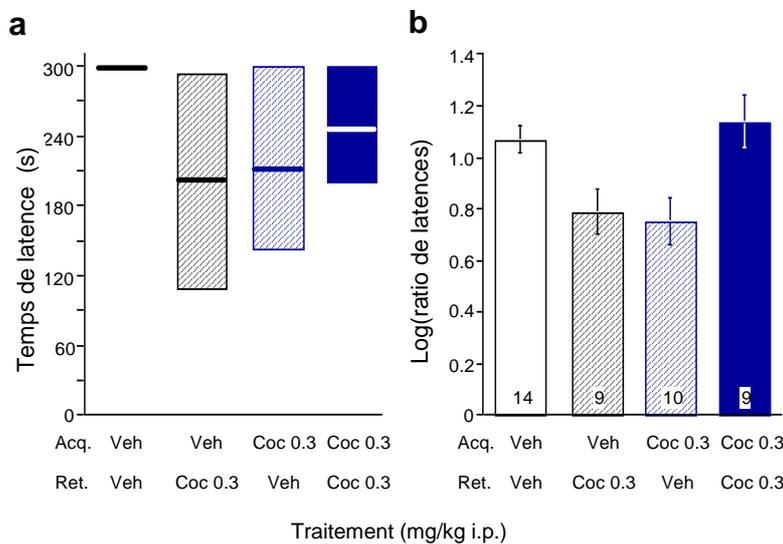


Figure 108 : Dépendance d'état chimique de la cocaïne à 0,3mg/kg.

Quand les animaux reçoivent des traitements répétés, ils présentent un temps de latence élevé et un ratio des temps de latence de 1,1, montrant ainsi des performances mnésiques optimales lors de la session de rétention. En revanche, quand ils reçoivent des traitements croisés, des diminutions de temps de latences ou des rapports de latences sont

observées. Les médianes de temps de latences sont inférieures à 210s. La cocaïne induit donc une dépendance d'état chimique pour les doses 0,1 et 0,3mg/kg chez les souris soumises à un apprentissage d'évitement passif.

Etude de la dépendance d'état chimique induite par le composé 6 seul.

Le composé **10** a ensuite été évalué seul (figure 109) et en co-administration avec la cocaïne 0,1 (figure 110) et 0,3mg/kg i.p. (figure 111).

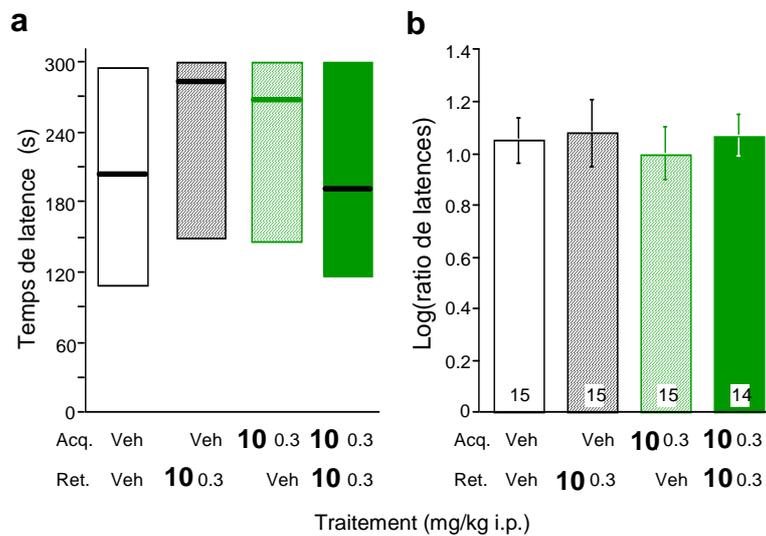


Figure 109 : **Dépendance d'état chimique du composé 6 à 0,3mg/kg.**

Le temps de latence lors des traitements répétés (solution saline/solution saline ou cocaïne/cocaïne) atteint une médiane de 200s en moyenne. Ces valeurs devront être réévalué lors d'autres tests. Quand les souris reçoivent une solution saline ou le composé **10** (0,3mg/kg i.p.) en traitement répété (VV ou **10/10**) ou croisé (V/**10** ou **10/V**), aucune modification du temps de latence ou du rapport des latences n'est observé. Cette observation est plus représentative dans le graphique des rapports des temps de latence. Le composé seul ne semble pas induire de dépendance d'état chimique.

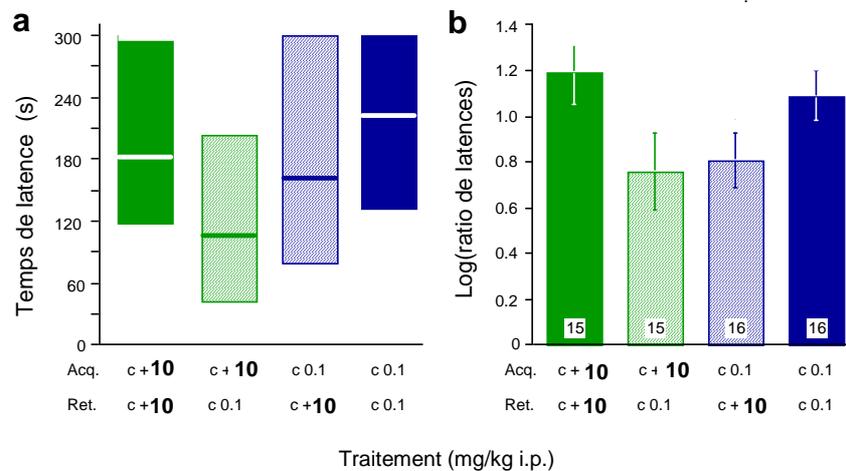
Etude de la dépendance d'état chimique induite par le composé 10 et la cocaïne.

Figure 110 : Dépendance d'état chimique du composé 10 + cocaïne à 0,1mg/kg.

Au niveau des rapports de latence, plus représentatifs, en co-administration avec la cocaïne à 0,1mg/kg, les résultats du traitement croisé montreraient une baisse significative des performances mnésiques. Le composé 10 semble perturber l'état chimique induit par la drogue.

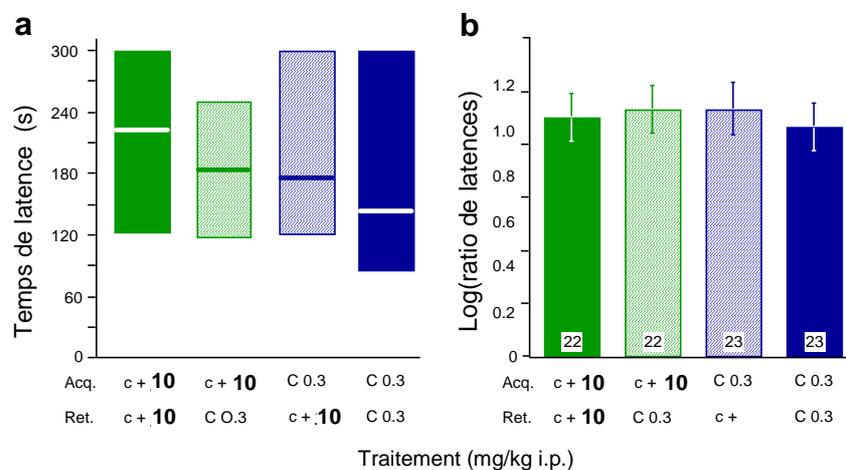


Figure 111 : Dépendance d'état chimique du composé 10 + cocaïne à 0,3mg/kg.

Par contre, en co-administration composé 10/cocaïne à 0,3mg/kg, il n'apparaît pas avoir de différence significative des rapports de temps de latence entre les traitements croisés et les traitements répétés. Une généralisation est observée avec une dose supérieure de drogue. La co-administration du composé 10 avec la cocaïne (0,3mg/kg) semble amplifier la dépendance d'état chimique induite par la drogue seule.

3.3. Discussion

La cocaïne induit une dépendance d'état chimique, à de faible dose (0,1 et 0,3mg/kg). En effet, un traitement croisé cocaïne/solution saline ou solution saline/cocaïne entre l'acquisition et la rétention montre une diminution de la qualité de la mémoire. En revanche quand l'animal est entraîné et testé dans le même état de cocaïne, il montre des paramètres de rétention optimale, similaires à ceux traités avec une solution saline. Cette dépendance d'état chimique induite par la cocaïne résulte de la modification de l'état chimique du cerveau qui s'opère à de faible dose (0,1-0,3mg/kg). Tandis que l'hyperlocomotion et les propriétés appétantes sont observées au dose plus forte de 10 à 40mg/kg.¹⁶⁶

En revanche, le composé **10**, administré seul, ne provoquerait pas d'état chimique particulier, il n'interfererait pas avec les conditions d'apprentissages. Néanmoins, en co-injection avec la cocaïne, à 0,3mg/kg, il affecterait la dépendance d'état chimique de la drogue (0,1mg/kg), et généraliserait avec celle-ci à plus haute dose (0,3mg/kg i.p). Cette généralisation avec la cocaïne 0,3mg/kg, se retrouve pour d'autres agonistes σ_1 testés à 0,1mg/kg, comme l'igmesine et la DHEA.¹⁶⁶

4. Conclusion

L'ensemble des résultats des différents tests montre que les composés **66** et **68** ne semblent pas induire d'effets sur la réponse locomotrice aiguë induite par la cocaïne. En revanche, le composé **69** présenterait un profil de type agoniste. D'autres expériences, notamment le CPP et l'étude de la sensibilité, nous permettrons d'approfondir ces résultats.

Les deux énantiomères testés, **10** et **12**, présentent un profil de type agoniste. Le composé **10** apparaît comme le plus efficace des deux composés. Il facilite les effets psychostimulants et appétants de la cocaïne, sans avoir d'effet injecté seul. De plus, après une présensibilisation par une acquisition et une extinction du CPP, une seule injection du composé provoque une réactivation du CPP. Enfin, à dose faible, le composé injecté seul n'affecterait pas les conditions d'apprentissage. Mais il amplifierait l'état de dépendance chimique induit par la cocaïne. Ces derniers résultats vont dans le même sens que ceux des tests de locomotion et de CPP. En d'autres termes, chacun des trois tests montrent que le composé **10** possède un profil de type agoniste.

Le composé présente, chez la souris, un profil pharmacologique idéal pour être testé dans une nouvelle thérapie agoniste.

ADME

Détermination des caractéristiques physico chimiques des composés synthétisés

Parallèlement aux études comportementales, nous avons souhaité évaluer les potentialités du composé **10** sous forme de sel d'oxalate comme médicament et avons réalisé avec la société Cerep un profil *in vitro* représentatif des propriétés d'Adsorption, Distribution, Métabolisation, Excrétion de ce composé particulièrement prometteur. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 19, 20 et 21.

1. Etude des propriétés en solution aqueuse

Une étude sur les propriétés en solution aqueuse du composé **10** a d'abord été réalisée. Sa solubilité aqueuse, son coefficient de partition et son taux de liaison aux protéines plasmatiques ont ainsi été calculé. Ces paramètres permettent de connaître la bonne biodisponibilité d'un composé (tableau 19).

Solubilité aqueuse	
PBS, pH 7.4	198 μ M
Coefficient de partition	
LogD, n-octanol/PBS, pH 7.4	2,12
Liaison aux protéines plasmatiques (humain), c = 10⁻⁵M	
Moyenne de composé 10 lié %	71,8
Moyenne récupérée %	78,2

Tableau 19 : Etude des propriétés du composé **10** en solution aqueuse.

Le composé **10** possède une bonne biodisponibilité :

- Il présente une excellente solubilité aqueuse de 198 μ M.
- Son coefficient de partition est de 2,12. Ce coefficient permet d'estimer la distribution d'un médicament dans l'organisme en renseignant sur le degré de lipophilie, facteur clé pour déterminer le comportement *in vivo* de la substance. Il représente le ratio de la concentration du produit entre deux solvants non miscibles : le premier hydrophobe, généralement l'octanol et l'autre hydrophile, ici le PBS. La concentration est déterminée par HPLC-UV/VIS. L'octanol est utilisé car ses propriétés ressemblent à celles des couches lipidiques des membranes. Ce processus simulerait donc l'habilité de diffusion à travers les membranes. La valeur du logD expérimental voisin de 2 du composé peut être considérée comme optimale pour le passage de la barrière hématoencéphalique.

- L'étude de la liaison aux protéines plasmatiques permet de déterminer la distribution et l'activité du produit. Seules les molécules libres, non liées aux protéines, seront actives sur la cible. Ce taux de liaison est mesuré par une technique de dialyse équilibrée. Une solution de plasma et une solution de tampon sont placées de part et d'autre d'une membrane de dialyse. Après une période d'incubation, les deux compartiments sont analysés par LC-MS pour déterminer la quantité de produit libre dans chaque compartiment. Pour notre molécule, le taux de liaison aux protéines plasmatiques est de 71,8%. Ce taux assez élevé indique le faible volume de distribution qu'aura notre substance dans l'organisme. De plus, la moyenne de produit récupéré, permet de connaître la validité du test. En effet, ce chiffre estime l'erreur systématique causée par des composés de la membrane de dialyse qui pourraient interférer dans l'analyse. Plus le pourcentage de récupération est élevé, moins le taux d'erreur est important rendant le test plus représentatif. La moyenne de produits récupérée de 78,2% nous informe de la validité du test.

2. Etude des propriétés d'absorption intestinale

La perméabilité de la membrane intestinale envers notre composé a été ensuite étudiée (tableau 17). Ce critère nous informe du taux d'absorption de la substance, critère affectant ainsi la biodisponibilité d'un candidat médicament.

Pour calculer la perméabilité, des cellules TC7 (clones des Caco-2) sont utilisées comme modèle d'absorption *in vitro*. La perméabilité des cellules TC7 est en corrélation avec l'absorption chez l'humain. Le composé, placé dans un tampon pH = 6,5, est ajouté du côté apical de TC7. Un tampon pH = 7,4 est placé du côté basolatéral. Le côté apical représente le lumen intestinal et le côté basolatéral, le sang. La perméabilité A-B (de l'apical vers le basolatéral) est ensuite mesurée. Les concentrations du composé des deux côtés sont déterminées par LC-MS à $t = 0$ et à $t = 60$ min. Ces valeurs, nous permettent de calculer la perméabilité apparente en 10^{-6} cm/s.

Perméabilité A-B (TC7, pH 6.5/7.4), $c = 10^{-5}$M	
Perméabilité moyenne (10^{-6} cm/s)	45,7
moyenne récupérée (%)	80

Tableau 20 : **Etude des propriétés d'absorption intestinale du composé 10.**

La société Cerep a établi une classification de la perméabilité pour ce test par l'étude de plusieurs produits de référence (labetalol, propranolol, ranitidine et vinblastine) :

- $P_{app} < 2 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ la perméabilité est très faible.
- $2 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s} < P_{app} < 20 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ la perméabilité est très moyenne.
- $20 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s} < P_{app}$, la perméabilité est très bonne.

Notre composé a une perméabilité de $45,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$. Ce qui semble indiquer un bon passage de la barrière intestinale.

3. Etude du métabolisme

Pour finir, la stabilité métabolique et l'inhibition des cytochromes P450 ont été évalués (tableau 18).

Afin de déterminer la stabilité métabolique, le composé est placé en présence de microsomes hépatiques pendant 1h, son pourcentage apparent est calculé grâce à la comparaison des aires du pic à la fin de la période d'incubation (60min) et celui à $t = 0$, mesuré par HPLC.

Un autre critère très important pour l'ADME est l'interaction du composé avec les cytochromes P450. Ces cytochromes (CYP) sont les principales enzymes qui métabolisent les médicaments. Par exemple les CYP2D6 métabolisent les antidépresseurs tricycliques, les β -bloquants et les molécules anti-arythmiques de classe 1 et les CYP2C9 métabolisent les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Si notre composé inhibe ou active un cytochrome qui catalyse une métabolisation d'un autre médicament, il peut respectivement augmenter ou diminuer la concentration plasmatique du médicament et donc conduire à une toxicité ou une inactivation du médicament. Pour effectuer ce test, les hépatocytes sont exposés au composé à trois concentrations différentes (1, 10 100 μM) pendant deux jours. Après les deux jours, l'activité des cytochromes est déterminée en utilisant la 3-cyano 7-ethoxycoumarine (CEC) pour le CYP1A2 et le CYP2C19, le 7-methoxy 4-trifluoromethyl-coumarine (MFC) pour le CYP2C9 et le CYP2D6, et enfin la 7-benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarine (BFC) pour le CYP3A4.

Stabilité métabolique (microsomes du foie, humain), $c = 10^{-6}M$	
Moyenne apparente (%)	15
inhibition CYP1A2 (recombinant, CEC substrate), $C = 10^{-5}M$	
% inhibition	-15
inhibition CYP2C9 (recombinant, MFC substrate), $C = 10^{-5}M$	
% inhibition	-1
inhibition CYP2C19 (recombinant, CEC substrate), $C = 10^{-5}M$	
% inhibition	25
inhibition CYP2D6 (recombinant, MFC substrate), $C = 10^{-5}M$	
% inhibition	-10
inhibition CYP3A4 (recombinant, BFC substrate), $C = 10^{-5}M$	
% inhibition	44

Tableau 21 : Etude du métabolisme du composé 10.

Notre composé a une faible stabilité métabolique. En effet, quand le composé est placé en présence de microsomes hépatiques pendant 1h, son pourcentage apparent est de 15%.

D'autre part, il possède de faibles valeurs d'inhibition pour la plupart des cytochromes sauf pour le CYP3A4 dont le pourcentage d'inhibition est de 44%.

Ces cytochromes sont les enzymes hépatiques et intestinales de métabolisation de phase I les plus abondantes. Ils sont responsables de la métabolisation d'environ 50% des médicaments sur le marché. Les principaux inhibiteurs de ces cytochromes sont les antibiotiques macrolides (clarithromycine et erythromycine), des agents anti-VIH (ritonavir et delavirdine), des antidépresseurs (fluoxetine et fluvoxamine) des inhibiteurs calciques (verapamil et diltiazem)...¹⁶⁷ En association avec ces médicaments, notre composé provoquerait une interaction médicamenteuse. A cause de leur inhibition des CYP3A4, ils ralentiraient l'élimination d'un des médicaments et provoqueraient une élévation des concentrations plasmatiques avec un risque d'effets indésirables.

Cette étude montre néanmoins que le composé 10 présente les propriétés d'un candidat médicament potentiel.

¹⁶⁷ Zhou S. F. *Curr. Drug metab.* **2008**, 9, 310-322. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La protéine σ_1 est impliquée dans la modulation de neurotransmetteurs du SNC. L'étude de cette protéine aurait un intérêt pour le traitement de la dépendance à la cocaïne et de certaines pathologies comme le désordre psychiatrique ou neurologique et pour le traitement du cancer.

Des études précédentes ont identifié la famille des Tic-hydantoïnes comme très affine et sélective envers σ_1 , notamment le composé **12**. Le but de ce projet est donc d'étudier les relations structure-activité autour de cette famille afin d'optimiser l'activité et la spécificité vis à vis du site de liaison σ_1 .

Pour réaliser cette étude de relation structure-activité nous avons ciblé deux objectifs : d'abord, l'évaluation de l'impact de la modification du noyau Tic-hydantoïne, ensuite, l'évaluation de l'importance de la modification de la chaîne latérale. Pour cela six stratégies de synthèses multiétapes ont été mises au point pour conduire à la préparation de 39 composés.

Les analyses de pureté énantiomérique des composés **10**, **12** et **13** ont révélé une pureté de plus de 98% pour les hydantoïnes **10** et **12** et une forme racémique pour la thiohydantoïne **13**.

L'affinité envers σ_1 de la plupart des composés a été évaluée sur des cellules humaines. Malgré un important travail de synthèse et de pharmacomodulation, aucun composé ne s'est révélé plus affin que les composés **10** et **12**. Cette structure Tic-hydantoïne apparaît optimale dans cette série de molécules.

Néanmoins, les composés **10**, **13**, **66**, **68** et **69** ont révélé de très bonnes affinités et sélectivités envers σ_1 . Ils ont donc fait l'objet d'études *in vivo*. Ces dernières n'ont pas été poursuivies pour le composé **13** en raison de sa forme racémique. Les composés **66**, **68** et **69** ont été évalués sur la réponse hyperlocomotrice aiguë induite par une injection de cocaïne. Seul le composé **69** induit un effet, il potentialise l'hyperactivité provoquée lors d'une prise unique de drogue. D'autres études doivent donc être poursuivies pour déterminer l'efficacité de ces produits vis-à-vis des propriétés de la cocaïne.

De façon très intéressante, les composés **10** et **12** présentent, chez la souris, un profil de type agoniste. Le produit **10** s'avère être plus efficace à plus faible dose que le composé **12**. De plus, les études des propriétés ADME de ce composé **10** ont montré qu'il possédait les propriétés d'un candidat médicament potentiel. Il montre un profil pharmacologique idéal pour être testé dans une nouvelle thérapie agoniste.

L'énantiomère **10** devra faire l'objet d'études plus poussées, notamment en auto-administration pour ainsi évaluer ses propriétés addictives et son effet sur les propriétés renforçantes induites par la cocaïne.

L'étude des relations structure-activité sera poursuivie notamment en continuant la modification de la Tic-hydantoïne afin de valider cette structure. Les collaborations entreprises permettront l'évaluation *in vivo* des meilleurs composés.

La structure de la protéine σ_1 étant transmembranaire et donc difficilement cristallisable, l'étude des relations structure-activité des ligands s'avère difficile. Afin de poursuivre cette étude, les principaux ligands des récepteurs σ_1 et leur affinité ont été inventoriés pour effectuer une étude sur un modèle 3D idéal pour σ_1 et ainsi mettre en valeur une structure affine de ces récepteurs.

Partie expérimentale

I. Techniques d'analyse et de purification

1. Chromatographie sur couche mince CCM

Les réactions sont suivies par chromatographie sur couche mince. Ce sont des plaques d'aluminium recouvertes d'une couche de 0,25mm d'épaisseur, d'un gel de silice 60 PF₂₅₄ Merck, pouvant être révélées à l'UV ou à la ninhydrine (Solution de ninhydrine 12mL d'acide acétique glacial, 400mL de butan-1-ol, 1,2g de ninhydrine). Grâce à ce système d'analyse, on peut connaître le R_f d'une molécule. Il s'obtient en calculant le rapport de la distance entre la base et la tache de la molécule sur la distance entre la base et le front de solvant.

2. Chromatographie sur couche épaisse CCE

La purification des produits peut se faire par chromatographie sur couche épaisse. Ce sont des plaques de verre recouvertes d'une couche de 2 mm d'épaisseur de silice 60 PF₂₅₄ Merck pouvant être révélées à l'UV. Le produit pur s'obtient en l'extrayant de la silice par une solution de CH₂Cl₂/MeOH (8/2).

3. Chromatographie sur colonne

La deuxième technique de purification est la chromatographie sur colonne. On utilise pour cela une silice Macherey-Nagel, de granulométrie 0,04 à 0,063mm.

4. Chromatographie sur colonne prépaquée

La purification des produits a aussi été réalisée sur colonnes prépaquées, CHROMABOND® Flash chromatography.

5. Chromatographie liquide à haute pression HPLC

Chaque réaction, dont les produits sont visibles UV, peut être suivie par HPLC. Les analyses chromatographiques sont réalisées sur un appareil Shimadzu avec une colonne C₁₈ TSK-GEL Super ODS (2µm, 50x4,6mm) ou une C₄ INTERCHIM, UP5C4-25QS et une détection UV à 215 et 254nm.

Le système d'éluant est le suivant : éluant A (0,05% de TFA dans l'eau milliQ) et éluant B (acétonitrile 80%, eau milliQ 20%, TFA 0,05%) avec un débit de 1mL.min⁻¹. L'éluion des produits s'effectue soit en 10 min grâce à un gradient linéaire de 0 à 100% d'éluant B pendant les 7 premières minutes, suivi d'un plateau d'une minute à 100% puis un retour à 0% en 2 minutes, soit en 40 min grâce à un gradient linéaire de 0 à 100% d'éluant B

pendant les 35 premières minutes, suivi d'un plateau d'une minute à 100% puis un retour à 0% en 2 minutes.

6. Chromatographie HPLC chirale

6.1. HPLC analytique

Les composés **10**, **12** et **13** ont été analysés par chromatographie sur colonne chirale. Cette analyse est réalisée à 20°C ou 40°C sur une colonne Chiralpack AD (tris-2,5-diméthylphénylcarbamate, 250x4,6mm I.D.; 10µm) et Chiralcel OD-H (cellulose tris 3,5-diméthylphénylcarbamate, 250 x 4,6mm ; 10 µm) utilisant un spectromètre à barrette de diodes Waters 996 (Détection à 206 et 266 nm).

L'élution de la phase mobile s'effectue isocratiquement en utilisant mélanges hexane/éthanol ou hexane/propan-2-ol en proportions variables avec un débit de 1mL.min⁻¹. Les composés sont dissous dans de l'éthanol à une concentration de 0,50mM et passés sur un filtre de 0,45µm avant d'être injectés (20 µL) dans la colonne.

6.2. HPLC préparative

Le composé **13** a été analysé par chromatographie sur colonne chirale. Cette analyse est réalisée à 20°C sur une colonne Chiralpack AD (tris-2,5-diméthylphénylcarbamate, 250x4.6 mm I.D.; 5µm) utilisant un spectromètre à barrette de diodes Waters 996 (Détection à 206 et 266 nm).

L'élution de la phase mobile s'effectue isocratiquement en utilisant mélanges hexane/éthanol 95/5 avec un débit de 1mL.min⁻¹. Les composés sont dissous dans de l'éthanol à une concentration de 3 mM et passés sur un filtre de 0,45µm avant d'être injectés (100 µL) dans la colonne.

7. Electrophorèse capillaire EC

Les séparations des composés **10**, **12**, **13** ont été réalisées sur un appareil Beckman Coulter P/ACE MDQ piloté par un logiciel 32 Karat (Beckman Coulter), comportant :

- un capillaire de silice fondue
- un système d'injection hydrodynamique ou électrocinétique
- un détecteur UV-visible à barrette de diode

Différentes cyclodextrines ont été utilisées notamment :

- CDs neutres : α-CD (Sigma), β-CD (Roquette), γ-CD (Fluka), HP-α-CD (Aldrich), HP-β-CD (Roquette) et HP-γ-CD (Fluka)

- CDs hautement sulfatées : HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD (Beckman Coulter)

Les conditions opératoires sont les suivantes : L'électrolyte de séparation est un tampon phosphate 50mM, pH 2,6 (acide phosphorique à 80 % + triéthanolamine) à 5mM en CD. Les échantillons analysés comprennent un mélange des hydantoïnes **10** et **12** à 0,2mM et 0,3mM respectivement, dans une solution tampon phosphate 50mM, pH = 2,6 contenant 25 % d'éthanol ou la thiohydantoïne **13** à 0,5 mM dans une solution tampon phosphate 50mM, pH = 2,6 contenant 25 %.

Les échantillons sont injectés en raison de 0,5 psi, 5s à l'anode pour les CDs neutres et à la cathode pour les CDs sulfatées

- Voltage : 20 kV
- Température : 25°C
- Détection à 200 nm

8. Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse LC-MS

Les suivis de réaction sont réalisés aussi par LC-MS. Le système LC-MS comprend un module de séparation Alliance 2695 en interface avec un spectromètre de masse de type ZQ équipé d'une source d'ionisation électrospray ES+. Nous utilisons une colonne XTerra® MS C₁₈ 3,5 μ m (2,1x50mm) et une détection UV (waters 2487 à double longueurs d'onde) à 215 et 254nm.

Le système d'éluant est le suivant : éluant A (0,05% de TFA dans l'eau milliQ) et éluant B (acétonitrile 80%, eau milliQ 20%, TFA 0,05%) avec un débit de 0,3mL.min⁻¹. L'éluion des produits s'effectue en 15min grâce à un gradient linéaire de 0 à 100% d'éluant B pendant les 8 premières minutes, suivi d'un plateau d'une minute à 100% puis un retour à 0% en 1 minutes.

9. Spectrométrie de masse

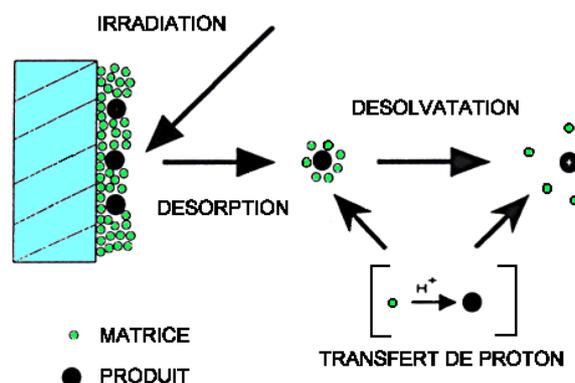
9.1. MALDI-TOF

Les spectres de masse des produits obtenus ont été réalisés sur un appareil MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) Voyager-DE STR (PerSeptive Biosystems).

Le MALDI est une méthode d'ionisation, permettant d'analyser des molécules de hautes masses moléculaires (peptides, protéines, oligonucléotides,...).

Principe de fonctionnement :

Les molécules à analyser sont mélangées à une quantité importante de matrice (DHB 2,5-dihydroxybenzoïque) qui absorbe à la longueur d'onde du laser utilisée, ce qui a pour effet d'évaporer la matrice, entraînant avec elle l'échantillon en phase gazeuse. Les molécules ionisées de la matrice transfèrent un proton aux molécules de l'échantillon dans la phase ainsi obtenue.



Une fois que les ions sont formés, ils sont accélérés et envoyés dans un tube de vol où ils volent jusqu'au détecteur. Ainsi les ions ayant une masse élevée voleront plus lentement que les ions ayant une masse plus faible. Leur arrivée au bout du tube de vol est détectée par un multiplicateur d'électrons et enregistrée.

9.2. Spectrométrie de masse ESI-MS

ESI-MS: electrospray ionisation mass spectrometry

Les spectres de masse des produits obtenus ont été aussi réalisés grâce à une source d'ionisation électrospray ES+. Pour cette méthode, le mode d'ionisation s'effectue à pression atmosphérique. L'échantillon en solution est introduit dans la source d'ionisation du spectromètre au travers d'un capillaire métallique. Sous l'effet d'un champ électrique, le liquide est vaporisé en un fin brouillard de gouttelettes chargées. Le solvant de ces dernières est progressivement évaporé par l'azote qui circule à contre courant. Une série de lentilles placées sous vide permet de focaliser le faisceau d'ions à l'entrée de l'analyseur, ce qui permet leur détection à l'état gazeux.

10. Polarimètre

Les pouvoirs rotatoires des composés **10** et **12** dissous dans du méthanol (concentration 1mg.mL^{-1}) ont été obtenus grâce à un polarimètre PerkinElmer 241. Le volume de la cellule et le chemin optique sont respectivement de 1mL et 10cm. Les mesures ont été réalisées à 28°C.

11. Résonance magnétique nucléaire RMN

Les produits sont analysés par RMN. Les spectres ont été effectués sur un appareil RUCKER DRX 300MHz. Les déplacements chimiques δ sont donnés en ppm en utilisant le TMS comme référence, les constantes de couplage J sont données en Hertz. Les abréviations suivantes ont été utilisées : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint = quintuplet, m = multiplet, l = pic élargi. Les pics sont décrits selon le modèle suivant : δ (nature du massif, nombre de protons, identité des protons, J).

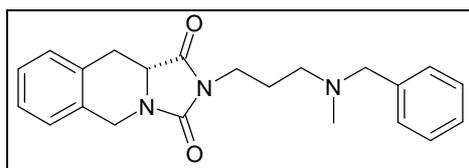
Le produit à analyser est dissout dans des solvants deutérés (CDCl₃ DMSO-d₆. MeOD...).

II. Modes opératoires

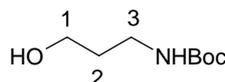
Il est à noter que les numéros sur les molécules ne correspondent pas à la nomenclature mais représente les indications pour la RMN.

1. Modification de la structure Tic-hydantoïne

1.1. Synthèse de l'énantiomère R



N-tert-butoxycarbonyl-3-aminopropanol (5)



A une solution de 3-aminopropanol (2,66mmol, 0,20mL) dans 7mL de CH_2Cl_2 est ajouté du Boc_2O (1,1eq, 638mg). Le milieu est agité une nuit puis lavé avec 2x5mL d'une solution aqueuse d'acide citrique à 5%, 5mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé pour donner le produit attendu suffisamment pur pour être utilisé sans purification (442mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 95%

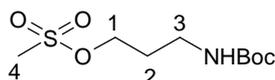
CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) Rf = 0,5

Formule brute: $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_3$, **Masse molaire**: $175,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,38 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1,60 (quint, 2H, H_2 , $J_{2-1} = J_{2-3} = 6\text{Hz}$); 3,00 (s large, 1H, OH); 3,22 (t, 2H, H_1 , $J_{1-2} = 6\text{Hz}$); 3,60 (t, 2H, H_3 , $J_{3-2} = 6\text{Hz}$); 4,76 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 28,5 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 33,0 (C_2); 36,9 (C_1); 59,3 (C_3)

méthanesulfonate de 3-tert-butoxycarbonylaminopropyle (6)



L'amine **5** (8,7mmol, 1,5g) est dissoute dans 20mL de CH_2Cl_2 , la TEA (2eq, 2,4mL) est ajoutée dans le milieu et celui-ci est refroidi à 0°C . Puis une solution de MsCl (1,5eq, 1,0mL) dans 10mL de CH_2Cl_2 est ajouté goutte à goutte à 0°C . Le milieu est agité pendant 4 heures à T.A.. Le CH_2Cl_2 est évaporé et le résidu est repris dans 30mL d'AcOEt. Le précipité est filtré. Le filtrat est lavé avec 2x15mL d'une solution aqueuse d'acide citrique à 5%, 2x15mL d'une solution aqueuse de NaHCO_3 à 5% et 15mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl. La

phase organique est séchée sur MgSO_4 et le solvant évaporé pour donner de produit attendu suffisamment pur pour être utilisé sans purification (2,09g).

Aspect : Huile jaune pâle, **Rendement :** 95%

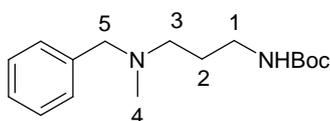
CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) $R_f = 0,9$

Formule brute: $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{S}$, **Masse molaire:** $253,10 \text{ g.mol}^{-1}$

RMN ^1H 300MHz (MeOD), $\delta(\text{ppm})$: 1,38 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1,87 (quint, 2H, H_2 , $J_{2-1} = J_{2-3} = 6\text{Hz}$); 2,97 (s, 3H, H_4); 3,20 (t, 2H, H_1 , $J_{1-2} = 6\text{Hz}$); 4,23 (t, 2H, H_3 , $J_{3-2} = 6\text{Hz}$); 4,70 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C 75MHz (MeOD), $\delta(\text{ppm})$: 28,4 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 29,7 (C_2); 37,0 (C_1); 37,4 (C_4); 67,5 (C_3)

N-[3-(benzylméthylamino)propyl]carbamate de tert-butyle (7)



Le dérivé **6** (7,18mmol, 1,82g) est dissout dans 100mL d'ACN. La DIEA (4eq, 5,0mL) et la N-méthylbenzylamine (3eq, 2,8mL) sont ajoutées et le milieu est agité à 40°C pendant 5 jours. Ensuite le solvant est évaporé et le résidu repris dans 50mL d'AcOEt. La phase organique est lavée avec 2x25mL d'une solution aqueuse de NaHCO_3 à 5% et 25mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl puis séchée sur MgSO_4 . Après évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1. Le composé est obtenu sous forme d'huile (1,09g).

Aspect : Huile jaune pâle, **Rendement:** 55%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) $R_f = 0,4$

HPLC (TSK gel, 10min) : $t_R = 4,3\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 93\%$

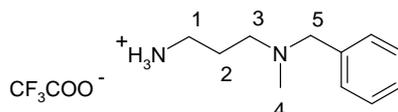
Formule brute: $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$, **Masse molaire:** $278,20 \text{ g.mol}^{-1}$, **MALDI-TOF :** 279,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1,71 (quint, 2H, H_2 , $J_{2-1} = J_{2-3} = 6\text{Hz}$); 2,20 (s, 3H, H_4); 2,49 (t, 2H, H_3 , $J_{3-2} = 6\text{Hz}$); 3,20 (t, 2H, H_1 , $J_{1-2} = 6\text{Hz}$); 3,52 (s, 2H, H_5); 5,40 (s, 1H, NH); 7,2-7,3 (m, 5H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 26,6 (C_2); 28,6 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 40,1 (C_3); 42,1 (C_4); 56,0 (C_1); 62,7 (C_5); 127,4-128,5-129,3 (C_{aro})

N-benzyl-N-méthylpropane-1,3-diamine (8)

Sous forme de sel de TFA



Une solution de diamine **7** (1,79mmol, 500mg) dans 10mL d'un mélange équimolaire de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ est agitée à T.A. pendant 30 min. La réaction est suivie en HPLC. Le solvant est évaporé sur pompe à palette pour donner le produit attendu suffisamment pur pour être utilisé sans purification (319mg).

Aspect : huile transparente

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) $R_f = 0,1$

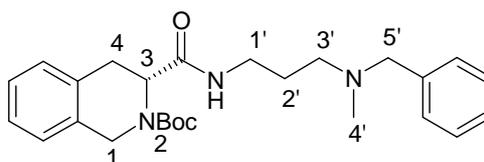
HPLC (TSK gel, 10min) : $t_R = 2,7\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 99\%$

Formule brute: $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2$, **Masse molaire**: $178,28\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF** : $179,2\text{ [M+H]}^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,95 (quint, 2H, H_2 , $J_{2-1} = J_{2-3} = 7\text{Hz}$); 2,14 (t, 2H, H_3 , $J_{3-2} = 7\text{Hz}$); 2,68 (s, 3H, H_4); 3,25 (t, 2H, H_1 , $J_{1-2} = 7\text{Hz}$); 4,32 (s, 2H, H_5); 7,2-7,4 (m, 5H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 25,0 (C_2); 37,1 (C_3); 39,1 (C_4); 53,4 (C_1); 60,5 (C_5); 129,6-130,6-130,8 (C_{aro})

ester tert-butyle de l'acide 2'(R)-[3-(benzylméthylamino)propylcarbamoyl]-3',4'-dihydro-1'H-isoquinoléine-2'-carboxylique (9)



Une solution composée de Boc-D-TicOH (1eq, 496mg), HOBt (1,2 eq, 290mg), HBTU (1,2eq, 814mg) dans 30mL de CH_2Cl_2 est agitée pendant 10 min. Une solution de la diamine préalablement déprotégée **8** (1,79mmol) et de DIEA (15eq, 4,7mL) dans 15 mL de CH_2Cl_2 est ajoutée et le milieu est agité à T.A. pendant une nuit. La réaction est arrêtée. La phase organique est lavée avec 3x20mL de solution aqueuse de NaHCO_3 à 5% et 20mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl et séchée sur MgSO_4 . Après évaporation du solvant le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1. Le composé est obtenu sous forme d'huile (485mg).

Aspect : Huile jaune pâle, **Rendement**: 62%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) $R_f = 0,6$

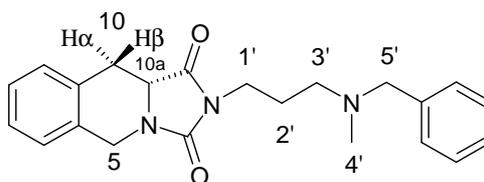
HPLC (TSK gel, 10min) : $t_R = 5,2\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 93\%$

Formule brute: $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_3$, **Masse molaire**: $437,59\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF** : $438,3\text{ [M+H]}^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,4-1,5 (m, 11H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et H_2'); 1,9-2,0 (m, 3H, H_4'); 2,2-2,3 (m, 2H, H_3'); 2,9-3,0 (m, 2H, H_1'); 3,3-3,4 (m, 4H, H_4 et H_5'); 4,3-4,6 (m, 3H, H_3 et H_1); 7,2-7,3 (m, 9H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 25,9 (C_2'); 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 31,8 (C_4); 37,3 (C_1'); 45,0 (C_1); 50,5 (C_4'); 54,9 (C_3'); 56,8 (C_{10a}); 62,1 (C_5'); 126,3-126,9-127,6-128,6-129,4 (C_{aro})

(10aR)-2-[3-(benzylméthylamino)propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine -1,3-dione (10)



Une solution du composé 9 (1,2mmol, 528mg) dans 8mL d'un mélange équivolumique CH₂Cl₂/TFA est agitée à T.A. pendant 30min. La réaction est suivie en HPLC. Elle est arrêtée et le solvant évaporé sur pompe à palette.

Le produit est dissout dans 20mL de THF. La DIEA (15eq, 3,15mL) est ajoutée et le milieu agité 10min. Le CDI (3eq, 588mg) est ajouté et le milieu est chauffé à reflux (60-70°C) une nuit. Le solvant est évaporé. Le produit est ensuite repris dans 30mL d'AcOEt et la phase organique est lavée avec 2x15mL de solution aqueuse de NaHCO₃ à 5%, 15mL de d'une solution aqueuse saturée de NaCl et séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH : 9/1/0,1. Le composé est obtenu sous forme d'huile (379,4mg).

Aspect : Huile jaune, **Rendement**: 87%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH: 9/1/0,1) R_f = 0,5

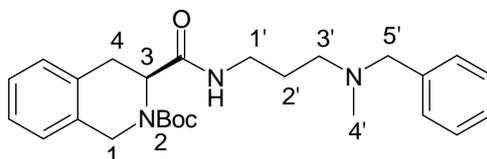
HPLC (TSK gel, 10min) : t_R = 4,5min ; P_{HPLC} = 99%, **HPLC** (C₄, 40min) : t_R = 10,2min ; P_{HPLC} > 99%

Formule brute: C₂₂H₂₅N₃O₂, **Masse molaire**: 363,46 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 364,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)**: 1,89 (quint, 2H, H₂, J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7Hz); 2,21 (s, 3H, H_{4'}); 2,45 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 2,78 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 16Hz, J_{10β-10a} = 12Hz); 3,25 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 16Hz, J_{10α-10a} = 4Hz); 3,49 (s, 2H, H_{5'}); 3,64 (t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz); 4,05 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10β} = 12Hz, J_{10a-10α} = 4Hz); 4,42 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 5,03 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 7,1-7,2 (m, 9H, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 25,7 (C_{2'}); 30,8 (C₁₀); 37,1 (C_{1'}); 41,6 (C₅); 41,9 (C_{4'}); 54,4 (C_{3'}); 54,5 (C_{10a}); 62,3 (C_{5'}); 126,6-126,8-127,1-127,3-128,0-128,9-129,4 (C_{aro})

ester tert-butylique de l'acide 2'(S)-[3-(benzylméthylamino)propylcarbamoyl]-3',4'-dihydro-1'H-isoquinoléine-2'-carboxylique (11)



Une solution composée de Boc-L-TicOH (1eq, 1,48mmol, 411mg), HOBt (1,2 eq, 241mg), HBTU (1,2eq, 675mg) dans 30mL de CH₂Cl₂ est agitée pendant 10 min. Une solution de diamine déprotégée 8 (1eq, 264mg), DIEA (15eq, 3,9mL) dans 15 mL de CH₂Cl₂ est ajoutée et le milieu est agité à T.A. pendant une nuit. La réaction est arrêtée, la phase organique lavée avec 3x20mL d'une solution aqueuse de NaHCO₃ à 5% et 1x20mL de solution aqueuse saturée de NaCl et séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant CH₂Cl₂/MeOH : 9/1. Le composé est obtenu sous forme d'huile (576mg).

Aspect : Huile jaune pâle, **Rendement**: 89%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH: 9/1) R_f = 0,6

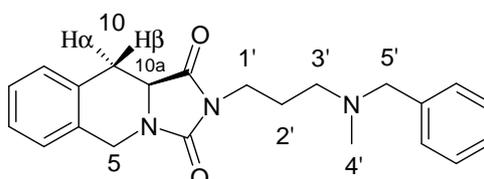
HPLC (TSK gel, 10min) : t_R = 5,2min ; P_{HPLC} = 90%

Formule brute: C₂₆H₃₆N₃O₃, **Masse molaire**: 437,59 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 438,3 [M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 1,4-1,5 (m, 11H, C(CH₃)₃ et H_{2'}); 1,9-2,0 (m, 3H, H_{4'}); 2,2-2,3 (m, 2H, H_{3'}); 2,9-3,0 (m, 2H, H_{1'}); 3,3-3,4 (m, 4H, H₄ et H_{5'}); 4,3-4,6 (m, 3H, H₃ et H₁); 7,2-7,3 (m, 9H, Haro)

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 25,9 ($\text{C}_{2'}$); 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 31,8 (C_4); 37,3 ($\text{C}_{1'}$); 45,0 (C_1); 50,5 ($\text{C}_{4'}$); 54,9 ($\text{C}_{3'}$); 56,8 (C_{10a}); 62,1 ($\text{C}_{5'}$); 126,3-126,9-127,6-128,6-129,4 (C_{aro})

(10aS)-2-[3-(benzylméthylamino)propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (12)



Une solution du composé 11 (0,85mmol, 370mg) dans 8mL d'un mélange équimoléculaire $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ est agitée à T.A. pendant 30min. La réaction est suivie en HPLC. Elle est arrêtée et le solvant évaporé sur pompe à palette.

Le produit est dissout dans 20mL de THF. La DIEA (15eq, 2,22mL) est ajoutée et le milieu agité 10min. Le CDI (3eq, 413mg) est ajouté et le milieu est chauffé à reflux (60-70°C) une nuit. Le solvant est évaporé. Le produit est ensuite repris dans 30mL d'AcOEt et la phase organique est lavée avec 2x15mL de solution aqueuse de NaHCO_3 à 5% et 1x15mL de solution aqueuse saturée de NaCl, séchée sur MgSO_4 . Après évaporation du solvant le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{MeOH}$: 7/2,5/0,5. Le composé est obtenu sous forme d'huile (179mg).

Aspect : Huile jaune, **Rendement:** 58%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5) $R_f = 0,5$

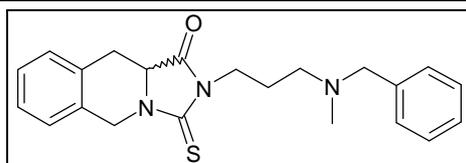
HPLC (TSK gel, 10min) : $t_R = 4,5\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 99\%$, **HPLC (C4, 40min) :** $t_R = 10,2\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 99\%$

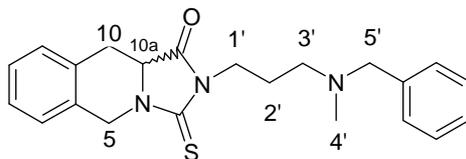
Formule brute: $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$, **Masse molaire:** $363,46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF :** $364,1[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,89 (quint, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7\text{Hz}$); 2,21 (s, 3H, $\text{H}_{4'}$); 2,45 (t, 2H, $\text{H}_{3'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 2,78 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 16\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 12\text{Hz}$); 3,25 (dd, 1H, $\text{H}_{10\alpha}$, $^2J = 16\text{Hz}$, $J_{10\alpha-10a} = 4\text{Hz}$); 3,49 (s, 2H, $\text{H}_{5'}$); 3,64 (t, 2H, $\text{H}_{1'}$, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$); 4,05 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\beta} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\alpha} = 4\text{Hz}$); 4,42 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$); 5,03 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$); 7,1-7,2 (m, 9H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 25,7 ($\text{C}_{2'}$); 30,8 (C_{10}); 37,1 ($\text{C}_{1'}$); 41,6 (C_5); 41,9 ($\text{C}_{4'}$); 54,4 ($\text{C}_{3'}$); 54,5 (C_{10a}); 62,3 ($\text{C}_{5'}$); 126,6-126,8-127,1-127,3-128,0-128,9-129,4 (C_{aro})

1.2. Synthèse du dérivé thiohydantoïne



2-[3-(benzylméthylamino)-propyl]-3-thioxo-2,3,10,10a-tétrahydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1-one (13)

Une solution du composé **11** (0,84mmol, 366mg) dans 8mL d'un mélange équimoléculaire CH₂Cl₂/TFA est agitée à T.A. pendant 30min. La réaction est suivie en HPLC. Elle est arrêtée et le solvant évaporé sur pompe à palette.

Le produit est ensuite dissout dans 20mL de THF. La DIEA (15eq, 2,18mL) est ajoutée et le milieu agité 10min. Le thioCDI (3eq, 447mg) est ajouté et le milieu est chauffé à reflux (60-70°C) une nuit. Le solvant est évaporé. Le résidu est ensuite repris dans 30mL d'AcOEt et la phase organique lavée avec 2x15mL de solution aqueuse de NaHCO₃ à 5% et 1x15mL de solution aqueuse saturée de NaCl et séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH : 9/1/0,1. Le composé est obtenu sous forme d'huile (83mg).

Aspect : huile jaune, **Rendement** : 26%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,4

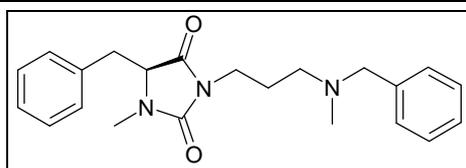
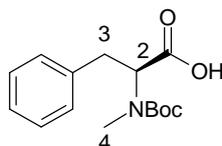
HPLC (TSK gel, 10min): tr = 5,3min; P_{HPLC} = 90%

HPLC (C4, 40min): tr = 19,4min; P_{HPLC} = 90%

Formule brute: C₂₂H₂₅N₃OS, **Masse molaire**: 379,53 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 380,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,94 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz); 2,19 (s, 3H, H_{4'}); 2,46 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 2,81 (dd, 1H, H₁₀, ²J = 15Hz, J_{10-10a} = 12Hz); 3,26 (dd, 1H, H₁₀, ²J = 15Hz, J_{10-10a} = 5Hz); 3,48 (s, 2H, H_{5'}); 3,96 (t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz); 4,12 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10} = 12Hz, J_{10a-10} = 5Hz); 4,60 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 5,48 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 7,1-7,3 (m, 9H, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 25,5 (C_{2'}); 30,9 (C₁₀); 40,2 (C_{1'}); 42,2 (C_{4'}); 46,1 (C₅); 54,8 (C_{3'}); 57,5 (C_{10a}); 62,4 (C_{5'}); 125,3-126,9-127,0-127,5-127,7-128,3-129,2-129,4 (C_{aro})

1.3. Synthèse de l'analogue ouvert**N-tert-butoxycarbonyl-N-méthylphénylalanine (14)**

La N-Boc-L-phénylalanine (3,77mmol, 1,0g) est dissoute dans 65mL de THF anhydre sous argon. Le NaH (4eq, 362mg) et l'iodométhane (4eq, 0,94mL) sont ajoutés à 0°C. Le milieu

est agité à 0°C pendant 1h puis à T.A. une nuit. 2mL d'H₂O sont ajoutés goutte à goutte. Puis le solvant est évaporé, le résidu est ensuite repris dans 200mL d'éther, la phase organique est lavée avec 1x100mL de solution aqueuse de NaHCO₃ à 5%. La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH = 3 et extraite avec 2x100mL d'AcOEt. La phase organique est séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant CH₂Cl₂/MeOH : 9/1. Le composé est obtenu sous de solide blanc (589mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 56%

CCM (Cyclhoexane/AcOEt:7/3) Rf = 0,6

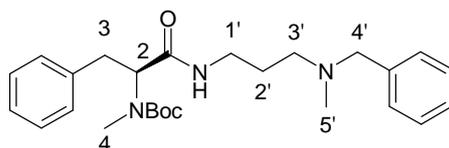
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 5,9min, P_{HPLC} = 95%

Formule brute: C₁₅H₂₁NO₄, **Masse molaire**: 279.15 g.mol⁻¹

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 2,75 (s, 3H, H₄) ; 3,2-3,3 (m, 2H, H₃) ; 4,6-4,7 (m, 1H, H₂) ; 7,1-7,2 (m, 5H, H_{aro}).

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 29,3 (C(CH₃)₃) ; 34,4 (C₄) ; 36,3 (C₃) ; 63,1 (C₅) ; 126,8-129,1-130,1 (C_{aro})

ester tert-butyle de l'acide {1-[3-(benzylméthylamino)propylcarbamoyl]-2-phényléthyl}méthylcarbamique (15)



Une solution du composé **14** (1eq, 114mg), HOBT (1,2 eq, 66mg), HBTU (1,2eq, 186mg) dans 8mL de CH₂Cl₂ est agitée pendant 10 min. Une solution de diamine déprotégée **8** (0,41mmol), DIEA (15eq, 1,1mL) dans 8 mL de CH₂Cl₂ est ajoutée et le milieu est agité à T.A. pendant une nuit. Le milieu réactionnel est lavé avec 2x10mL de solution aqueuse de NaHCO₃ à 5% et 1x10mL de solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant CH₂Cl₂/MeOH : 95/5. Le composé est obtenu sous forme de solide blanc (50mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 28%

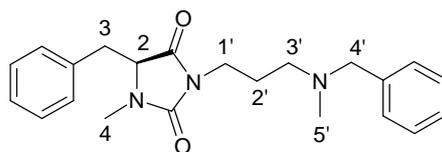
CCM (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5) Rf = 0,3

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 2,5min P_{HPLC} = 96%

Formule brute: C₂₆H₃₇N₃O₃, **Masse molaire**: 439,60 g.mol⁻¹; **MALDI-TOF** : 440,5[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,30 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 1,60 (m, 2H, H₂) ; 2,16 (s, 3H, H₅) ; 2,35 (t, 2H, H₃, J_{3'-2'} = 6Hz) ; 2,68 (s, 3H, H₄) ; 2,72 (m, 2H, H₃) ; 3,22 (m, 2H, H₁) ; 4,43 (m, 2H, H₄) ; 4,67 (m, 1H, H_{10a}) ; 7,2-7,3 (m, 10H, H_{aro}).

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 27,4 (C₂) ; 29,0 (C(CH₃)₃) ; 31,7 (C₃) ; 35,2 (C₁) ; 39,8 (C₅) ; 54,5 (C₃) ; 62,2 (C₄) ; 62,5 (C₂) ; 127,2-127,5-128,4-128,8-129,3-129,7 (C_{aro})

(S)-5-benzyl-3-[3-(benzylméthylamino)propyl]-1-méthylimidazolidine-2,4-dione (16)

Une solution du composé **15** (0,96mmol, 324mg) dans 8mL d'un mélange équimoléculaire de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ est agitée à T.A. pendant 30 min. La réaction est suivie en HPLC. Elle est arrêtée et le solvant évaporé sur pompe à palette.

Le résidu est repris dans 15mL de THF. La DIEA est ajoutée et le milieu est agité 10min à T.A.. Puis CDI (3eq, 156mg) est ajouté et le milieu est agité une nuit à reflux 60-70°C. Le solvant est ensuite évaporé. Le résidu est repris dans 40mL d'AcOEt. La phase organique est lavée avec 20mL de solution aqueuse de NaHCO_3 à 5% et 20mL de solution aqueuse saturée de NaCl et séchée sur MgSO_4 . Après évaporation du solvant le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant AcOEt/MeOH/ NH_4OH : 9/1/0,05. Le composé est obtenu sous forme d'huile (126mg).

Aspect : huile jaune, **Rendement** : 36%

CCM (AcOEt/MeOH : 96/4) $R_f = 0,3$

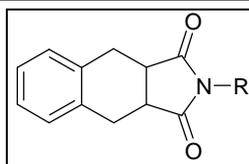
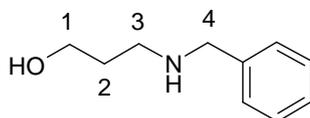
HPLC (TSK gel, 10min) : $t_r = 4,3\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 84\%$

HPLC (C4, 40min) : $t_r = 21,8\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 97\%$

Formule brute: $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$, **Masse molaire**: $365,48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF** : $366,3 [\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 1,50 (quint, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7\text{Hz}$) ; 2,11 (s, 3H, $\text{H}_{5'}$) ; 2,24 (t, 2H, $\text{H}_{3'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$) ; 2,94 (s, 3H, H_4) ; 3,15 (m, 2H, H_3 , $J_{3-2} = 4\text{Hz}$) ; 3,42 (m, 4H, $\text{H}_{1'}$ et $\text{H}_{4'}$) ; 4,07 (t, 1H, H_2 , $J_{2-3} = 4\text{Hz}$) ; 7,22 (m, 5H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 26,5 ($\text{C}_{2'}$) ; 29,8 (C_4) ; 35,1 (C_3) ; 37,1 ($\text{C}_{1'}$) ; 41,8 ($\text{C}_{5'}$) ; 54,5 ($\text{C}_{3'}$) ; 62,2 ($\text{C}_{4'}$) ; 62,5 (C_2) ; 127,2-127,5-128,4-128,8-129,3-129,7 (C_{aro})

1.4. Synthèse du dérivé tétraline**3-benzylaminopropan-1-ol (17)**

Le 3-amino-1-propanol (2,66mmol, 0,20mL) et le benzaldéhyde (1eq, 0,271mL) sont dissous dans 5mL de MeOH. Le milieu est agité 15min à T.A. puis il est refroidi à 0°C. NaBH_4 (1eq, 100,6mg) est ajouté par petites portions. Le milieu est agité à T.A. pendant 2h. 5mL d' H_2O sont ajoutées, le solvant est ensuite évaporé. Après extraction de la phase aqueuse avec 2x20mL de CH_2Cl_2 , les phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$: 95/5/0,2. Le produit est obtenu sous forme d'huile (324mg).

Aspect : huile jaune **rendement** : 90%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$: 94,8/5/0,2.) Rf = 0,3

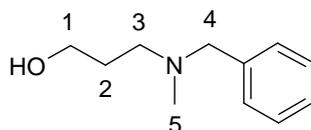
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 2,6min ; $P_{\text{HPLC}} = 97\%$

Formule brute: $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$, **Masse molaire**: 165,24 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF** : 166,1[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,73 (quint, 2H, H_2 , $J_{2-1} = J_{2-3} = 5,5$) ; 2,89 (t, 2H, H_3 , $J_{3-2} = 5,5\text{Hz}$) ; 2,97 (l, 2H, OH, NH) ; 3,79 (s, 2H, H_4) ; 3,81 (t, 2H, H_1 , $J_{1-2} = 5,5\text{Hz}$) ; 7,2-7,3 (m, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 30,5 (C_2) ; 49,2 (C_3) ; 53,8 (C_4) ; 64,2 (C_1) ; 127,1-128,0-128,4 (C_{aro})

3-(benzylméthylamino)propan-1-ol (18)



Le composé **17** (1,98mmol, 328mg) est dissous dans 5mL de DMF. K_2CO_3 (1,2eq, 328mg) est ajouté et le milieu est agité 1h à T.A. sous atmosphère. Puis l'iodométhane (1,1eq, 0,108mL) est ajouté et le milieu est agité une nuit. 20mL d' H_2O sont ajoutés, le solvant est ensuite évaporé. Après extraction de la phase aqueuse avec 2x40mL d'AcOEt, les phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 8,5/1,5. Le produit est obtenu sous forme d'huile (163mg).

Aspect : huile transparente **rendement** : 46%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5) Rf = 0,2

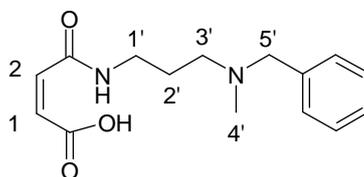
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 2,6min ; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

Formule brute: $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}$, **Masse molaire**: 179,26 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF** : 180,1[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,74 (quint, 2H, H_2 , $J_{2-1} = J_{2-3} = 5,7\text{Hz}$) ; 2,22 (s, 3H, H_5) ; 2,62 (t, 2H, H_3 , $J_{3-2} = 5,7\text{Hz}$) ; 3,51 (s, 2H, H_4) ; 3,75 (t, 2H, H_1 , $J_{1-2} = 5,7\text{Hz}$) ; 4,93 (s, 1H, OH) ; 7,2-7,3 (m, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 27,8 (C_2) ; 41,8 (C_5) ; 57,4 (C_3) ; 62,7 (C_4) ; 64,1 (C_1) ; 127,2-128,3-129,0 (C_{aro})

acide (Z)-3-[3-(benzylméthylamino)propylcarbamoyl]acrylique (19)



La diamine **8** (0,96mmol, 373mg) est dissoute dans 2mL de THF. La DIEA (2eq, 0,33mL) est ajoutée et le milieu est agité 10min à T.A.. L'anhydride maléique (1,2eq, 113mg) est ajouté et le milieu est agité 1 nuit à T.A.. Le solvant est évaporé, le résidu purifié par flash chromatographie, éluant : $(\text{CH}_3)_2\text{CO}/\text{NH}_4\text{OH}$: 9/1. Le composé est obtenu sous forme d'huile (228mg).

Aspect : huile jaune, **Rendement** : 86%

CCM ((CH₃)₂CO/NH₄OH : 9/1) R_f = 0,3

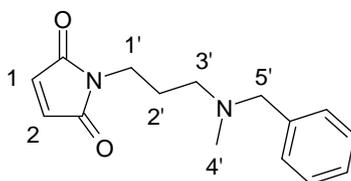
HPLC (TSK gel, 10min): tr = 2,9min; P_{HPLC} = 97%

Formule brute: C₁₅H₂₀N₂O₃, **Masse molaire**: 276,34 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 277,1[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,86 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz); 2,17 (s, 3H, H_{4'}); 2,74 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 3,35 (t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz); 3,75 (s, 2H, H_{5'}); 5,88 (d, 2H, H₂, J₂₋₁ = 12 Hz); 6,25 (d, 2H, H₂, J₁₋₂ = 12 Hz); 7,3-7,4 (m, 5H, H_{aro}); 10,11 (s, 1H, OH).

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 27,2 (C_{2'}); 32,2 (C_{4'}); 40,6 (C_{1'}); 56,9 (C_{3'}); 63,5 (C_{5'}); 130,9-131,3-132,4-138,2 (C_{aro}, C₁ et C₂).

1-[3-(benzylméthylamino)-propyl]pyrrole-2,5-dione (20)



Voie A, essai 1 : précurseur anhydride maléique

L'acide **19** (0,79mmol, 218mg) est dissout dans un mélange acide acétique glacial-anhydride d'acide (2-1mL). Le milieu est agité à 50°C sous atmosphère d'azote pendant 24h. Le solvant est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur plaque de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 95/5. Le produit est obtenu sous forme d'huile (82mg). **Rendement** : 40%.

Voie A, essai 2 : précurseur anhydride maléique

La diamine **8** (2,09mmol, 373mg) est dissoute dans 4mL d'acide acétique glacial. L'anhydride maléique (1,2eq, 245,9mg) est ajouté et le milieu est chauffé à 50°C sous atmosphère d'azote pendant 12h. Le solvant est évaporé. Le résidu est purifié par flash chromatographie, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 9/1. Le produit est obtenu sous forme d'huile (172mg). **Rendement** : 32%.

Voie A, essai 3 : précurseur anhydride maléique

L'anhydride maléique (2,83mmol, 277,8mg) est dissout dans 6mL de CH₂Cl₂ préalablement séché sur tamis moléculaire 3Å. Une solution de la diamine libre **8** (1eq, 505mg) dans 7mL de CH₂Cl₂ est ajoutée goutte à goutte. Le milieu est agité à T.A. pendant 1h. Le solvant est évaporé. Puis le résidu repris dans 10mL d'ACN. La triéthylamine (1eq, 0,394mL) est ajoutée. Puis une solution de TMS-Cl (2,83mmol, 0,359mL), dans 5mL d'ACN est ajoutée goutte à goutte. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par flash chromatographie, éluant : cyclohexane/AcOEt : 8/2. Le produit est obtenu sous forme d'huile (183mg). **Rendement** : 25%.

Voie B : précurseur maléimide

PPh₃ (1,11mmol, 293mg) est dissout dans 8mL de THF. Le milieu est refroidi à -78°C. DIAD (1eq, 218mg) est ajouté goutte à goutte, la solution devient jaune. Le milieu est agité 5min. L'aminoalcool **18** (1eq, 200mg) dissout dans 1mL de THF est ajouté goutte à goutte pendant une période de 3min. Le néopentylalcool (0,5eq, 44mg) est ajouté en une portion suivit par le maléimide (1eq, 108mg). Puis le milieu est autorisé à revenir à T.A.. Il est agité une nuit. Le solvant est évaporé. Le résidu est purifié par flash chromatographie, éluant toluène /AcOEt : 4/6. Le produit est obtenu sous forme d'huile (95mg). **Rendement** : 33%.

Aspect : huile jaune, **Rendement** : (1) 33% (2) 25% (3) 32% (4) 40%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5) $R_f = 0,3$

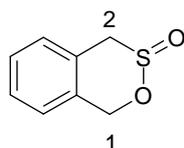
HPLC (TSK gel, 10min): $t_r = 3,4\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 94\%$

Formule brute: $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$, **Masse molaire**: $258,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF** : $259,1[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,79 (quint, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7\text{Hz}$); 2,16 (s, 3H, $\text{H}_{4'}$); 2,39 (t, 2H, $\text{H}_{3'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 3,46 (s, 2H, $\text{H}_{5'}$); 3,58 (t, 2H, $\text{H}_{1'}$, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$); 6,65 (s, 2H, H_1 et H_2); 7,2-7,3 (m, 5H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 26,4 ($\text{C}_{2'}$) ; 36,4 ($\text{C}_{1'}$) ; 42,1 ($\text{C}_{4'}$) ; 54,7 ($\text{C}_{3'}$) ; 62,5 ($\text{C}_{5'}$)
127,2-128,4-129,3 (C_{aro}); 134,3 (C_1 et C_2)

oxyde de benzo[d][1,2]oxathiane (21)



Une solution de rongalite (2eq, 343mg) dans 2mL de DMF est agitée avec le α,α' -dichloro-o-xylène (1,14mmol, 200mg) et le TBAB (0,2eq, 73,5mg) à T.A. pendant 48h. 20mL d' H_2O sont ajoutés. Le solide est enlevé par filtration puis le filtrat est extrait avec 3x10mL d'éther. Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO_4 . Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant AcOEt/cyclohexane : 6/4. Le produit est obtenu sous forme d'huile (149mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 78%

CCM (CH_2Cl_2) $R_f = 0,4$

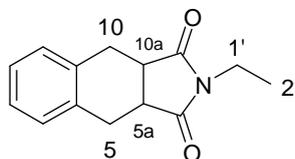
HPLC (TSK gel, 10min): $t_r = 3,7\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

Formule brute: $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2\text{S}$, **Masse molaire**: $168,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 3,66 (d, 1H, H_2 , $^2J = 15\text{Hz}$); 4,52 (d, 1H, H_2 , $^2J = 15\text{Hz}$); 5,03 (d, 1H, H_1 , $^2J = 14\text{Hz}$); 5,33 (d, 1H, H_1 , $^2J = 14\text{Hz}$); 7,2-7,5 (m, 4H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 58,0 (C_2) ; 65,6 (C_1) ; 127,5-129,7-130,4-131,6 (C_{aro})

2-éthyl-3a,4,9,9a-tétrahydrobenzo[f]isoindole-1,3-dione (22)



Le sultine **21** (0,81mmol, 136mg) est dissout dans 10mL de toluène. Le N-éthylmaleimide (1,2eq, 121mg) est ajouté et le milieu est agité sous atmosphère d'azote à reflux pendant 24h. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant CH_2Cl_2 100%. Le produit est obtenu sous forme d'huile (52mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 28%

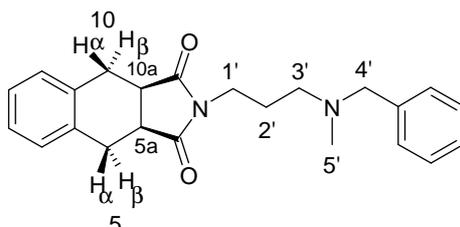
CCM (AcOEt/Cyclohexane : 5/5) $R_f = 0,7$

HPLC (TSK gel, 10min): $t_r = 5,1\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 97\%$

HPLC (C4, 40min): $t_r = 10,6\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

Formule brute: $C_{14}H_{15}NO_2$, **Masse molaire:** $229,28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **MALDI-TOF :** $230,1[M+H]^+$
RMN 1H 300MHz ($CDCl_3$), $\delta(\text{ppm})$: 0,71 (t, 3H, $H_{2'}$, $J_{2'-1'} = 7\text{Hz}$); 2,88 (m, 2H, H_5 et H_{10}); 3,13 (dd, 2H, H_5 et H_{10} , $J_{5-5a} = J_{10-10a} = 3\text{Hz}$, $^2J = 11\text{Hz}$); 3,2-3,3 (m, 2H, H_{5a} et H_{10a}); 3,26 (q, 2H, $H_{1'}$, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$); 7,1-7,3 (m, 4H, H_{aro})
RMN ^{13}C 75MHz ($CDCl_3$), $\delta(\text{ppm})$: 12,7 ($C_{2'}$); 29,9 (C_{10} et C_5); 40,1 (C_{10a} et C_{5a}); 54,8 ($C_{3'}$); 57,5 (C_{10a}); 127,4-127,9 (C_{aro})

2-[3-(benzylméthylamino)-propyl]-3a,4,9,9a-tétrahydrobenzo[f]isoindole-1,3-dione (23)



Le sultine **21** (0,59mmol, 100mg) est dissout dans 10mL de toluène. Le maléimide **20** (1,2eq, 183mg) est ajouté et le milieu est agité sous atmosphère d'azote à reflux pendant 24h. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant CH_2Cl_2 /AcOEt /MeOH : 6/4,5/0,5. Le produit est obtenu sous forme d'huile (132mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement :** 62%

CCM (CH_2Cl_2 /MeOH : 95/5) Rf = 0,5

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 5,0min ; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

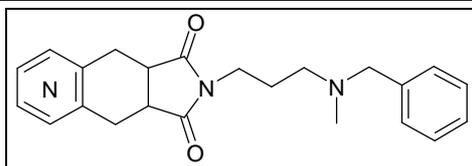
HPLC (C4, 40min) : tr = 11,2min ; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

Formule brute: $C_{23}H_{26}N_2O_2$, **Masse molaire:** $362,48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF :** $363,2[M+H]^+$

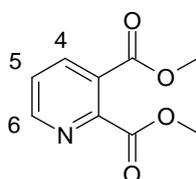
RMN 1H 300MHz ($CDCl_3$), $\delta(\text{ppm})$: 1,33 (q, 2H, $H_{2'}$, $J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7\text{Hz}$); 1,95 (s, 3H, $H_{5'}$); 1,96 (t, 2H, $H_{3'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 2,88 (m, 2H, $H_{5\beta}$ et $H_{10\beta}$, $^2J = 14\text{Hz}$); 3,13 (m, 2H, $H_{5\alpha}$ et $H_{10\alpha}$, $^2J = 14\text{Hz}$); 3,1-3,2 (m, 2H, H_{5a} et H_{10a}); 3,24 (s, 2H, $H_{4'}$); 3,34 (t, 2H, $H_{1'}$, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$); 7,1-7,3 (m, 9H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz ($CDCl_3$), $\delta(\text{ppm})$: 24,8 ($C_{2'}$); 29,6 (C_{10} et C_5); 36,8 ($C_{1'}$); 39,8 (C_{5a} et C_{10a}); 41,4 ($C_{5'}$); 54,0 ($C_{3'}$); 61,2 ($C_{4'}$); 126,8-127,2-127,7-128,0-128,9 (C_{aro})

1.5. Déplacement de l'atome d'azote sur le noyau tétrahydroisoquinoléine



pyridine-2,3-dicarboxylate de diméthyl (24)



La pyridine (5,98mmol, 1g) est partiellement dissoute dans 4mL de MeOH. L'acide sulfurique (0,4mL) est ajouté à 0°C. Puis le milieu est porté à reflux pendant 24h. La pyridine se dissout complètement. Le solvant est évaporé puis une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ est ajoutée jusqu'à pH basique. La phase aqueuse est extraite avec 2x40mL d'AcOEt. La phase organique est ensuite lavée avec 20mL d'H₂O puis séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est utilisé sans purification (786mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 67%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 9/1) R_f = 0,9

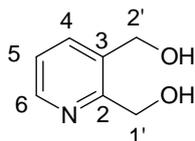
HPLC (TSK gel, 10min): tr = 3,5min; P_{HPLC} = 98%

Formule brute: C₉H₉NO₄, **Masse molaire**: 195,18 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 196,1[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 3,96 (s, 3H, H_{CH3}); 4,01 (s, 3H, H_{CH3}); 7,51 (dd, 1H, H₅, J₅₋₄ = 8Hz, J₅₋₆ = 5Hz); 8,18 (dd, 1H, H₄, J₄₋₅ = 8Hz, J₄₋₆ = 2Hz); 8,77 (dd, 1H, H₆, J₆₋₅ = 5Hz, J₆₋₄ = 2Hz)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 52,9-53,1 (C_{COOMe}) ; 124,8 (C₅) ; 137,2 (C₄) ; 151,5 (C₆)

2,3-bis(hydroxyméthyl)pyridine (25)



L'ester **24** (3,18mmol, 621mg) est dissout dans 10mL d'EtOH absolu. NaBH₄ (5eq, 601mg) est ajouté par petites portions à 0°C. Puis le milieu est porté à reflux et agité pendant 24h. 4mL d'EtOH sont ajoutés à la solution encore chaude. Le résidu insoluble est filtré. Le solvant du filtrat est évaporé. Le résidu est purifié par flash chromatographie, éluant CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH : 95/5/0,15. Le composé est obtenu sous forme d'huile (283mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 64%

CCM ((CH₃)₂CO/NH₄OH : 95/5) R_f = 0,7

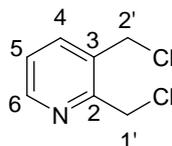
HPLC (TSK gel, 10min): tr = 0,8min; P_{HPLC} >99%

Formule brute: C₇H₉NO₂, **Masse molaire**: 139,16 g.mol⁻¹

RMN ¹H 300MHz (MeOD), **δ(ppm)** : 4,68 (s, 2H, H_{2'}); 4,77 (s, 2H, H_{1'}); 7,25 (dd, 1H, H₅, J₅₋₄ = 8Hz, J₅₋₆ = 5Hz); 7,75 (dd, 1H, H₄, J₄₋₅ = 8Hz, J₄₋₆ = 1Hz); 8,46 (dd, 1H, H₆, J₆₋₅ = 5Hz, J₆₋₄ = 1Hz)

RMN ¹³C 75MHz (MeOD), **δ(ppm)** : 61,1 (C_{2'}) ; 62,3 (C_{1'}) ; 122,7 (C₅) ; 133,5 (C₂) ; 135,8 (C₄) ; 147,1 (C₆) ; 156,5 (C₃)

2,3-bis(chlorométhyl)pyridine (26)



Le dialcool **25** (1,98mmol, 275mg) est dissout dans 2mL de CH_2Cl_2 . Le chlorure de thionyl (1,5mL) est ajouté à 0°C . Puis le milieu est chauffé à 75°C sous atmosphère d'azote pendant 3h. Le solvant est évaporé. Une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 est ajoutée goutte à goutte (15mL). La phase aqueuse est extraite avec 2x30mL d'AcOEt. La phase organique est lavée avec 30mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl et séchée sur MgSO_4 . Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne prépaquée, éluant Cyclohexane/AcOEt : 9/1. Le composé est obtenu sous forme d'huile (230mg).

Aspect : huile marron, **Rendement** : 66%

CCM (AcOEt) Rf = 0,8

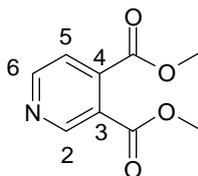
HPLC (TSK gel, 10min): tr = 4,2min; $P_{\text{HPLC}} = 96\%$

Formule brute: $\text{C}_7\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}$, **Masse molaire**: $176,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 4,75 (s, 2H, $\text{H}_{2'}$); 4,84 (s, 2H, $\text{H}_{1'}$); 7,31 (dd, 1H, H_5 , $J_{5,4} = 8\text{Hz}$, $J_{5,6} = 5\text{Hz}$); 7,77 (dd, 1H, H_4 , $J_{4,5} = 8\text{Hz}$, $J_{4,6} = 2\text{Hz}$); 8,56 (dd, 1H, H_6 , $J_{6,5} = 5\text{Hz}$, $J_{6,4} = 2\text{Hz}$),

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 41,9 ($\text{C}_{2'}$); 44,3 ($\text{C}_{1'}$); 124,1 (C_5); 132,3 (C_3); 138,6 (C_4); 149,4 (C_6); 154,9 (C_2)

pyridine-3,4-dicarboxylate de diméthyl (27)



La pyridine (5,98mmol, 1g) est partiellement dissoute dans 4mL de MeOH. L'acide sulfurique (0,4mL) est ajouté à 0°C . Puis le milieu est porté à reflux pendant 4 jours. La pyridine se dissout complètement. Le solvant est évaporé puis une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 est ajoutée jusqu'à pH basique. La phase aqueuse est extraite avec 2x40mL d'AcOEt. La phase organique est ensuite lavée avec 20mL d' H_2O puis séchée sur MgSO_4 . Après évaporation du solvant, le résidu est utilisé sans purification (604mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 52%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) Rf = 0,9

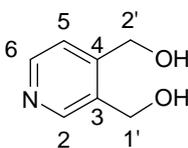
HPLC (TSK gel, 10min): tr = 3,7min; $P_{\text{HPLC}} = 96\%$

Formule brute: $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_4$, **Masse molaire**: $195,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF** : 196,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 3,95 et 3,96 (2s, 2x3H, H_{CH_3}); 7,51 (d, 1H, H_5 , $J_{5,6} = 5\text{Hz}$); 8,84 (d, 1H, H_6 , $J_{6,5} = 5\text{Hz}$); 9,07 (s, 1H, H_2)

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 53,2-53,2 (C_{COOMe}); 121,8 (C_6); 125,0 (C_3); 140,4 (C_4); 150,57 (C_2); 153,0 (C_5); 165,7 ($\text{C}=\text{O}$); 166,8 ($\text{C}=\text{O}$);

3,4-bis(hydroxyméthyl)pyridine (28)



L'ester **27** (3,04mmol, 593mg) est dissout dans 10mL d'EtOH absolu. NaBH₄ (5eq, 575,3mg) est ajouté par petites portions à 0°C. Puis le milieu est porté à reflux et il est agité pendant 24h. 4mL d'EtOH sont ajoutés à la solution encore chaude. Le résidu insoluble est filtré. Le filtrat est évaporé. Le résidu est purifié par flash chromatographie, éluant CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH : 9/1/0,15. Le composé est obtenu sous forme de solide blanc (208mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 49%

CCM ((CH₃)₂CO/NH₄OH : 9/1) Rf = 0,8

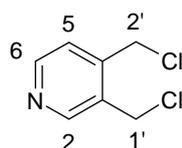
HPLC (TSK gel, 10min): tr = 0,8min; P_{HPLC} >99%

Formule brute: C₇H₉NO₂, **Masse molaire**: 139,16 g.mol⁻¹

RMN ¹H 300MHz (MeOD), δ(ppm) : 4,67 (s, 2H, H_{1'}); 4,77 (s, 2H, H_{2'}); 7,56 (d, 1H, H₅, J₅₋₆ = 5Hz); 8,44 (d, 1H, H₆, J₆₋₅ = 5Hz); 8,45 (s, 1H, H₂)

RMN ¹³C 75MHz (MeOD), δ(ppm) : 61,3 (C_{1'}); 61,9 (C_{2'}); 123,5 (C₅); 136,3 (C₁); 149,7 (C₂); 150,5 (C₆) 152,7 (C₄)

3,4-bis(chlorométhyl)pyridine (29)



Le dialcool **28** (1,40mmol, 195mg) est dissout dans 2mL de CH₂Cl₂. Le chlorure de thionyl (1,5mL) est ajouté à 0°C. Puis le milieu est chauffé à 75°C sous atmosphère d'azote pendant 3h. Le solvant est évaporé. Une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ est ajoutée goutte à goutte (15mL). La phase aqueuse est extraite avec 2x30mL d'AcOEt. La phase organique est lavée avec 30mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl et séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne prépaquée, éluant Cyclohexane/AcOEt : 9/1. Le composé est obtenu sous forme d'huile (73mg).

Aspect : huile marron, **Rendement** : 30%

CCM (AcOEt) Rf = 0,8

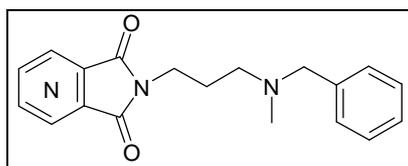
HPLC (TSK gel, 10min): tr = 3,6min; P_{HPLC} = 97%

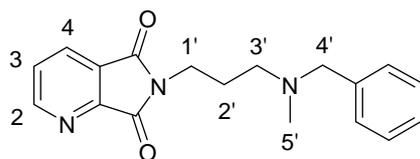
Formule brute: C₇H₇Cl₂N, **Masse molaire**: 176,05 g.mol⁻¹

RMN ¹H 300MHz (MeOD), δ(ppm) : 4,72 et 4,73 (2s, 2x2H, H_{1'} et H_{2'}); 7,39 (d, 1H, H₅, J₅₋₆ = 5Hz); 8,61 (s, 1H, H₂); 8,62 (d, 1H, H₆, J₆₋₅ = 5Hz)

RMN ¹³C 75MHz (MeOD), δ(ppm) : 40,0 et 40,1 (C_{1'} et C_{2'}); 124,3 (C₅); 150,9 (C₂ et C₆)

1.6. Remplacement du noyau quinoléine par une pyridine



6-[3-(benzylméthylamino)propyl]pyrrolo[3,4-*b*]pyridine-5,7-dione (30)

Dans un montage Dean Stark, l'amine libre **8** (0,76mmol, 135mg) est dissoute dans du toluène (5mL). L'APTS (0,05eq, 9,5mg) et la pyridine-2,3-dicarboxylique anhydride (1eq, 113mg) sont ajoutés et le milieu est chauffé à 110°C pendant une nuit. La phase organique est lavée avec 1x10mL de solution aqueuse de NaHCO₃ à 5% puis séchée sur MgSO₄. Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : AcOEt/cyclohexane : 9/1. Le produit est obtenu sous forme d'huile (68mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 29%

CCM (AcOEt/Cyclo : 9/1) R_f = 0,5

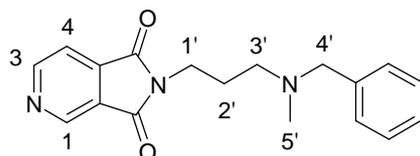
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 3,3min ; P_{HPLC} = 99%

HPLC (C4, 40min) : tr = 9,8min ; P_{HPLC} = 99%

Formule brute: C₁₈H₁₉N₃O₂, **Masse molaire**: 309,37 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 310,1[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,99 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz); 2,27 (s, 3H, H_{5'}); 2,60 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 3,59 (s, 2H, H_{4'}); 3,83 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 7,1-7,3 (m, 5H, H_{aro}); 7,61 (dd, 1H, H₃, J₃₋₄ = 7Hz, J₃₋₄ = 5Hz); 8,15 (dd, 1H, H₄, J₄₋₃ = 7Hz, J₄₋₂ = 1Hz); 8,97 (dd, 1H, H₂, J₂₋₃ = 5Hz, J₂₋₄ = 1Hz)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 25,8 (C_{2'}); 36,6 (C_{1'}); 41,5 (C_{5'}); 54,4 (C_{3'}); 61,9 (C_{4'}); 127,4 (C₃); 128,6-128,8-129,6 (C_{aro}); 131,3 (C₄); 155,3 (C₂)

2-[3-(benzylméthylamino)propyl]pyrrolo[3,4-*c*]pyridine-1,3-dione (31)

Dans un montage Dean Stark, l'amine libre **8** (0,73mmol, 129mg) est dissoute dans du toluène (5mL). L'APTS (0,05eq, 6,9mg) et la pyridine-3,4-dicarboxylique anhydride (1eq, 108mg) sont ajoutés et le milieu est chauffé à 110°C pendant une nuit. La phase organique est lavée avec 1x10mL de solution aqueuse de NaHCO₃ à 5% puis séchée sur MgSO₄. Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : AcOEt/cyclohexane : 9/1. Le produit est obtenu sous forme d'huile (7mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 3%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,7

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 3,3min ; P_{HPLC} = 95%

HPLC (C4, 40min) : tr = 9,4min ; P_{HPLC} = 96%

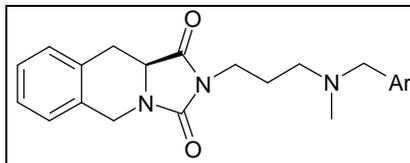
Formule brute: C₁₈H₁₉N₃O₂, **Masse molaire**: 309,37 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 310,09[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,89 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz); 2,16 (s, 3H, H_{5'}); 2,45 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 3,46 (s, 2H, H_{4'}); 3,79 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 7,1-7,2 (m, 5H, H_{aro}); 7,74 (dd, 1H, H₄, J₄₋₃ = 5Hz, J₄₋₁ = 1Hz); 9,06 (d, 1H, H₃, J₃₋₄ = 5Hz); 9,13 (d, 1H, H₁, J₁₋₄ = 1Hz)

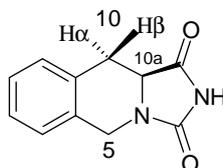
RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 26,4 ($\text{C}_{2'}$) ; 37,1 ($\text{C}_{1'}$) ; 42,2 ($\text{C}_{5'}$) ; 54,9 ($\text{C}_{3'}$) ; 62,6 ($\text{C}_{4'}$) ; 117,3 (C_4) ; 127,3-128,5-129,3 (C_{aro}) ; 144,9 (C_1) ; 155,9 (C_3)

2. Modification de la chaîne latérale

2.1. Fonctionnalisation du groupement phényle



(S)-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (32)



A une solution en suspension de L-TicOH (3,8mmol, 668mg) dans 60mL de DMF est ajouté l'isocyanate de potassium (2eq, 612mg). Le milieu est chauffé à 70°C pendant 2h. Une solution aqueuse d'HCl à 35% est ajoutée goutte à goutte jusqu'à pH = 1. Le milieu est chauffé à 70°C pendant 2h. Puis le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 50mL de CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec 1x30mL de solution aqueuse de NaHCO_3 à 5%. Puis la phase aqueuse est extraite par 3x50mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont rassemblées puis séchées sur MgSO_4 . Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5. Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc (537mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement :** 70%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) Rf = 0,7

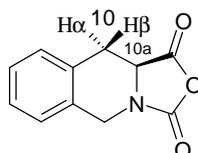
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,1min ; $P_{\text{HPLC}} = 95\%$

Formule brute: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$, **Masse molaire:** 202,07 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **MALDI-TOF :** 203,05[M+H]⁺

RMN ^1H 300MHz (DMSO), $\delta(\text{ppm})$: 2,85 (dd, 1H, $\text{H}_{10\alpha}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\alpha-10a} = 12\text{Hz}$); 3,11 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$); 4,19 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$) ; 4,31 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$) ; 4,78 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$) ; 7,2-7,3 (m, 4H, H_{aro}), 10,93 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 30,3 (C_{10}) ; 41,6 (C_5) ; 56,1 (C_{10a}) ; 127,9-129,9 (C_{aro})

(S)-10,10a-dihydro-5H-oxazolo[3,4-b]isoquinoléine-1,3-dione (33)



Le produit **50** (3,6mmol, 500mg) est dissout dans 7mL de CH_2Cl_2 . Le milieu est refroidi à 0°C et PCl_3 (1,3eq, 0,41mL) est ajouté et le milieu est agité 2h à T.A.. Le solvant est évaporé

et le solide blanc lavé à l'hexane sur fritté. Le produit attendu est suffisamment pur pour être utilisé sans purification (731mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : quantitatif

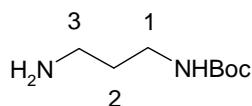
CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5) $R_f = 0,7$

Formule brute: $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_3$, **Masse molaire**: 203,20 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 3,1-3,2 (m, 2H, H_{10}) ; 4,46 (d, 1H, H_5 , $^2J = 16\text{Hz}$) ; 4,62 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 11\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$) ; 4,78 (d, 1H, H_5 , $^2J = 16\text{Hz}$) ; 7,2-7,3 (m, 4H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 31,8 (C_{10}) ; 45,3 (C_5) ; 57,1 (C_{10a}) ; 130,0-130,4-131,0-132,3 (C_{aro})

N-(3-aminopropyl)carbamate de tert-butyle (34)



Le 1,3-aminopropane (7eq, 12,0mL) est dissout dans une solution de 200mL de CHCl_3 . Une solution de Boc_2O (20,3mmol, 4,37g) dans 100mL de CHCl_3 est ajoutée goutte à goutte à 0°C pendant une après midi. Puis le milieu est agité à T.A. pendant une nuit. Le milieu réactionnel est ensuite lavé avec 4x100mL de solution aqueuse saturée de NaCl et 1x100mL d' H_2O . La phase organique est séchée sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé sur pompe à membrane puis sur pompe à palette pour évaporer le reste d'aminopropane pour donner le produit attendu suffisamment pur pour être utilisé sans purification (3,32g).

Aspect : huile blanchâtre, **Rendement** : 94%

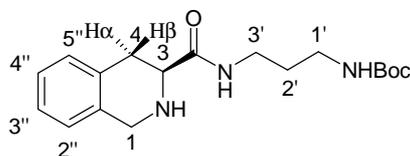
CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 8/2) $R_f = 0,4$

Formule brute: $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$, **Masse molaire**: 174,24 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,38 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 1,55 (quint, 2H, H_2 , $J_{2-1} = J_{2-3} = 6,6\text{Hz}$) ; 2,70 (t, 2H, H_3 , $J_{3-2} = 6,6\text{Hz}$) ; 3,14 (q, 2H, H_1 , $J_{1-2} = 6,5\text{Hz}$) ; 4,85 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 28,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 33,6 (C_2) ; 38,6 (C_1) ; 39,9 (C_3)

N-{3-[(S)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-3-carbomoyl]amino}propyl}carbamate de tert-butyle (35)



La diamine **34** (1,3eq, 268mg) est dissoute dans 12mL de CH_2Cl_2 anhydre. L'anhydride **33** (1,2mmol, 240mg) et la DIEA (2eq, 0,4mL) sont ajoutés. La réaction est mise sous N_2 et le milieu est agité à T.A. une nuit. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur plaque de silice, éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$: 9/1. Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc (243mg).

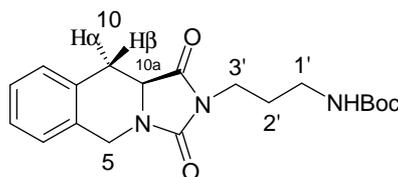
Aspect : solide blanc, **Rendement** : 61%

CCM (AcOEt/EtOH : 9/1) $R_f = 0,3$

HPLC (TSK gel, 10min) : $t_r = 4,1\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 90\%$

Formule brute: $C_{18}H_{27}N_3O_3$, **Masse molaire:** 333,20 $g \cdot mol^{-1}$, **MALDI-TOF :** 334,3 $[M+H]^+$
RMN 1H 300MHz ($CDCl_3$), $\delta(ppm)$: 1,36 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ; 1,57 (quint, 2H, $H_{2'}$, $J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz$) ; 2,67 (dd, 1H, $H_{4\alpha}$, $^2J = 16Hz$, $J_{4\alpha-3} = 5Hz$) ; 3,04 (q, 2H, $H_{3'}$, $J_{3'-2'} = 6Hz$) ; 3,11 (dd, 1H, $H_{4\beta}$, $^2J = 16Hz$, $J_{4\beta-3} = 10Hz$) ; 3,26 (q, 2H, $H_{1'}$, $J_{1'-2'} = 6Hz$) ; 3,49 (dd, 1H, H_3 , $J_{3-4\beta} = 10Hz$, $J_{3-4\alpha} = 5Hz$) ; 3,94 (m, 2H, H_1) ; 4,99 (t, 1H, NHBoc) ; 6,97 (m, 1H, $H_{5''}$) ; 7,0-7,1 (m, 3H, $H_{2''}$, $H_{3''}$ et $H_{4''}$) ; 7,38 (t, 1H, NHCO)
RMN ^{13}C 75MHz ($CDCl_3$), $\delta(ppm)$: 28,6 ($C(\underline{C}H_3)_3$) ; 30,3 ($C_{2'}$) ; 31,3 (C_4) ; 36,0 ($C_{1'}$) ; 37,4 ($C_{3'}$) ; 47,6 (C_1) ; 56,6 (C_3) ; 125,8 ($C_{5''}$) ; 126,0-126,4-126,8-129,3 ($C_{2''}$, $C_{3''}$ et $C_{4''}$)

N-[3-((S)-1,3-dioxo-1,5,10,10a-tétrahydroimidazo[1,5-b]isoquinolin-2-yl)propyl]carbamate de tert-butyle (36)



Le produit **35** (0,37mmol, 124mg) est dissout dans 10mL de THF. La DIEA (5eq, 0,3mL) est ajoutée et le milieu est agité 10min à T.A. Puis le CDI (3eq, 181mg) est ajouté et le milieu est chauffé à 70°C pendant 24h. Le solvant est évaporé. Le résidu est ensuite repris dans 20mL d'AcOEt, la phase organique lavée avec 10mL de solution aqueuse de $NaHCO_3$ à 5% et 10mL de solution aqueuse saturée de NaCl, puis séchée sur $MgSO_4$. Après évaporation du solvant le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant $CH_2Cl_2/MeOH$: 95/5. Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc (102mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement :** 77%

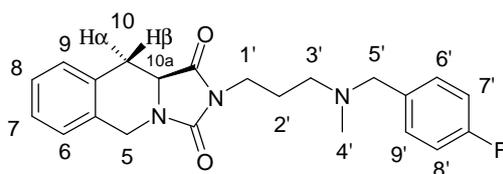
CCM ($CH_2Cl_2/MeOH$: 9/1) Rf = 0,8

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 5,9min ; $P_{HPLC} = 77\%$

Formule brute: $C_{19}H_{25}N_3O_4$, **Masse molaire:** 359,18 $g \cdot mol^{-1}$, **MALDI-TOF :** 360,2 $[M+H]^+$
RMN 1H 300MHz ($CDCl_3$), $\delta(ppm)$: 1,37 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ; 1,75 (quint, 2H, $H_{2'}$, $J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 6Hz$) ; 2,77 (dd, 1H, $H_{10\alpha}$, $^2J = 15Hz$, $J_{10\alpha-10a} = 11Hz$) ; 3,06 (q, 2H, $H_{1'}$, $J_{1'-2'} = 6Hz$) ; 3,21 (dd, 1H, $H_{10\beta}$, $^2J = 15Hz$, $J_{10\beta-10a} = 5Hz$) ; 3,58 (t, 2H, $H_{3'}$, $J_{3'-2'} = 6Hz$) ; 4,04 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 11Hz$, $J_{10a-10\beta} = 5Hz$) ; 4,36 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17Hz$) ; 4,96 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17Hz$) ; 5,09 (t, 1H, NH) ; 7,1-7,2 (m, 4H, H_{aro}).

RMN ^{13}C 75MHz ($CDCl_3$), $\delta(ppm)$: 28,6 ($C(\underline{C}H_3)_3$) ; 29,1 ($C_{2'}$) ; 31,1 (C_{10}) ; 36,0 ($C_{3'}$) ; 37,3 ($C_{1'}$) ; 41,8 (C_5) ; 54,9 (C_{10a}) ; 126,7-127,3-127,4-129,5 (C_{aro})

(S)-2-[3-[(4-fluorobenzyl)méthylamino]propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (37)



Le composé **40** (0,56mmol, 169mg) est dissout dans un mélange acétone/HCl à 37% : 18/2mL. La réaction est agitée 1h à T.A.. Le solvant est évaporé, le résidu repris dans 20mL de

CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec 2x10mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃ puis séchée sur MgSO₄. L'aldéhyde ainsi obtenu quantitativement est utilisé sans purification. Celui-ci (1,1eq, 0,56mmol) est dissout dans 15mL CH₂Cl₂. L'amine **44** (0,51mmol, 71mg) est ajoutée et le milieu agité 15min à T.A.. Puis le NaBH(OAc)₃ (5eq, 540mg) et l'acide acétique glacial (2eq, 0,01mL) sont ajoutés. Le milieu est agité 1 nuit à T.A.. 30mL de solution aqueuse de NaHCO₃ 1M sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite par 3x30mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant CH₂Cl₂/MeOH 95/5. Le produit est obtenu sous forme d'huile (87mg).

Aspect : huile jaune, **Rendement** : 41%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,6

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,5min; P_{HPLC} = 98%

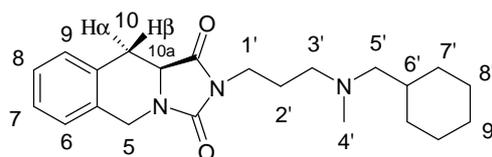
HPLC (C4, 40min) : tr = 21,9min ; P_{HPLC} = 98%

Formule brute: C₂₂H₂₄FN₃O₂, **Masse molaire**: 381,18 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF**: 382,3 [M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,86 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7Hz); 2,16 (s, 3H, H_{4'}); 2,42 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 2,76 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 15Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 3,24 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,43 (s, 2H, H_{5'}); 3,6-3,7 (m, 2H, H_{1'}); 4,05 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 4,41 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 5,02 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 6,9-7,0 (m, 2H, H_{7'}, H_{8'}, J_{7'-6'} = J_{7'-F} = J_{8'-9'} = J_{8'-F} = 8,7Hz, J_{7'-8'} = 2,7Hz) ; 7,1-7,3 (m, 6H, H_{6'}, H_{9'}, H₆, H₇, H₈ et H₉)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 25,8 (C_{2'}); 30,8 (C₁₀); 37,1 (C_{1'}); 41,6 (C₅); 41,8 (C_{4'}); 54,5 (C_{10a}); 54,6 (C_{3'}); 61,5 (C_{5'}); 114,7-115,0 (C_{7'} et C_{8'}, J_{C-F} = 21Hz); 126,6-130,5 (C_{6'}, C_{9'}, C₆, C₇, C₈ et C₉)

(S)-2-[3-(N-cyclohexyl-N-méthylaminopropyl)-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (38)



Le composé **40** (1,09mmol, 329mg) est dissout dans un mélange acétone/HCl à 37% : 36/4mL. La réaction est agitée 1h à T.A.. Le solvant est évaporé, le résidu repris dans 40mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec 2x20mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃ puis séchée sur MgSO₄. L'aldéhyde ainsi obtenu quantitativement est utilisé sans purification. Celui-ci (1,1eq, 1,09mmol) est dissout dans 20mL CH₂Cl₂. L'amine **45** (0,99mmol, 126mg) est ajoutée et le milieu agité 15min à T.A.. Puis le NaBH(OAc)₃ (5eq, 1,05g) et l'acide acétique glacial (1eq, 0,057mL) sont ajoutés. Le milieu est agité 1 nuit à T.A.. 20mL de solution aqueuse de NaHCO₃ 1M sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite par 3x30mL CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice éluant CH₂Cl₂/MeOH 95/5. Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc (149mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 37%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,4

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,9min ; P_{HPLC} = 97%

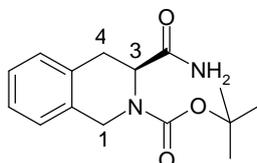
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 19,4min ; P_{HPLC} = 91%

Formule brute: C₂₂H₃₁N₃O₂, **Masse molaire**: 369,24g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 370,2 [M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 0,8-0,9 (m, 2H, H_{7'a}) ; 1,1-1,2 (m, 3H, H_{8'a} et H_{9'a}) ; 1,4-1,5 (m, 1H, H_{6'a}) ; 1,7-1,9 (m, 7H, H_{7'e}, H_{8'e}, H_{9'e} et H_{2'}) ; 2,10 (d, 2H, H_{5'}, J_{5'-6'} = 7Hz) ; 2,19 (s, 3H, H_{4'}) ; 2,38 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz) ; 2,84 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 16Hz, J_{10α-10a} = 12Hz) ; 3,27 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 16Hz, J_{10β-10a} = 5Hz) ; 3,61 (t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz) ; 4,08 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz) ; 4,42 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 5,02 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 7,2-7,3 (m, 4H, H_{aro}).

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 25,7 et 26,0 (C_{8'} et C_{9'}) ; 30,8 (C₁₀) ; 31,7 (C_{7'}) ; 35,6 (C_{6'}) ; 37,2 (C_{1'}) ; 41,5 (C₅) ; 42,5 (C_{4'}) ; 54,6 (C_{10a}) ; 55,5 (C_{3'}) ; 64,7 (C_{5'}) ; 125,3-129,4 (C_{aro})

ester tert-butylque de l'acide (S)-3-carbamoyl-3,4-dihydro-1H-isoquinoline-2-carboxylique (39)



Une solution de Boc-L-Tic-OH (5,28mmol, 1,46g), HOBt (1,2eq, 928mg), HBTU (1,2eq, 2,60g) dans 40mL de DMF est agitée 15min à T.A. Puis une solution de chlorure d'ammonium (5eq, 1,41g), DIEA (3eq, 276mL) dans 10mL de DMF est ajoutée et le milieu est agité à T.A. pendant 3h. La réaction est suivie en HPLC. Le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 40mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec 3x20mL d'une solution aqueuse de NaHCO₃ 5% et 1x20mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl et séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant CH₂Cl₂/MeOH : 8/2. Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc (992mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 68%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH: 8/2) Rf = 0,6

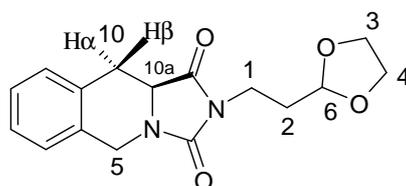
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,9min ; P_{HPLC} = 84%

Formule brute: C₁₅H₂₀N₂O₃, **Masse molaire**: 276,34 g.mol⁻¹,

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃) ; 3,06-3,07 (m, 2H, H₄) ; 4,5-4,6 (m, 3H, H₁) ; 4,8-4,90 (m, 1H, H₃) ; 7,1-7,2 (m, 4H, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 28,4 (C(CH₃)₃) ; 31,6 (C₄) ; 45,1 (C₁) ; 57,0 (C₃) ; 125,5-126,2-127,0-127,5 (C_{aro})

(S)-2-(2-[1,3]dioxolan-2-yl-éthyl)-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (40)



Le composé **32** (0,74mmol, 150mg) est dissout dans 15mL de DMF. Le carbonate de potassium (1eq, 102mg) est ajouté et la réaction est agitée 20min à T.A. Puis, le bromoéthylidioxolane (1,1eq, 0,095mL) est ajouté et le milieu est chauffé à 70°C une nuit. Le solvant évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant Cyclohexane/AcOEt : 3/7. Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc (156mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 70%

CCM (Cyclohexane/AcOEt : 3/7) Rf = 0,6

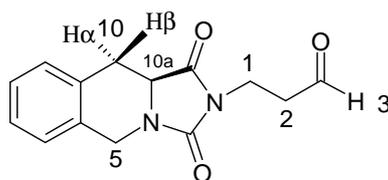
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,8min ; P_{HPLC} = 92%

Formule brute: C₁₆H₁₈N₂O₄, **Masse molaire**: 302,12 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 303,1[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 2,0-2,1 (m, 2H, H₂) ; 3,24 (dd, 1H, H_{10α}, J_{10α-10a} = 16Hz, ²J = 12Hz) ; 3,72 (dd, 1H, H_{10β}, J_{10β-10a} = 5Hz, ²J = 12Hz) ; 3,6-3,7 (m, 2H, H₁) ; 3,8-3,9 (m, 4H, H₃ et H₄) ; 4,06 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10α-10a} = 12Hz, J_{10β-10a} = 5Hz) ; 4,42 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz) ; 4,95 (t, 1H, H₆, J₆₋₂ = 4Hz) ; 5,02 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz) ; 7,2-7,3 (m, 4H, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 30,7 (C₁₀) ; 31,7 (C₂) ; 34,1 (C₁) ; 41,7 (C₅) ; 54,7 (C_{10a}) ; 64,9 (C₃ et C₄) ; 102,8 (C₆) ; 126,7-127,2-127,4-129,5 (C_{aro})

3-((S)-1,3-dioxo-1,5,10,10a-tétrahydroimidazo[1,5-b]isoquinoléin-2-yl)-propionaldéhyde (41)



Le composé **40** (1,09mmol, 329mg) est dissout dans un mélange acétone/HCl à 37% : 36/4mL. La réaction est agitée 1h à T.A.. Le solvant est évaporé, le résidu repris dans 40mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec 2x20mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃ puis séchée sur MgSO₄. L'aldéhyde ainsi obtenu quantitativement est utilisé sans purification.

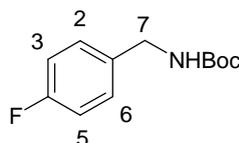
Aspect : huile transparente, **Rendement** : quantitatif

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 3,9min ; P_{HPLC} = 99%

Formule brute: C₁₄H₁₄N₂O₈, **Masse molaire**: 258,28 g.mol⁻¹

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 2,0-2,1 (m, 2H, H₂) ; 2,85 (dd, 1H, H_{10α}, J_{10α-10a} = 16Hz, ²J = 12Hz) ; 3,27 (dd, 1H, H_{10β}, J_{10β-10a} = 5Hz, ²J = 12Hz) ; 3,9-4,0 (m, 2H, H₁) ; 4,08 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10α-10a} = 12Hz, J_{10β-10a} = 5Hz) ; 4,42 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz) ; 5,02 (t, 1H, H₆, J₆₋₂ = 4Hz) ; 5,02 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz) ; 7,2-7,3 (m, 4H, H_{aro}) ; 9,80 (t, 1H, H₃, J₃₋₂ = 1,2Hz)

N-(4-fluorobenzyl)carbamate de tert-butyle (42)



La fluorobenzylamine (2,4mmol, 300mg) est dissoute dans 10mL de CH₂Cl₂. Une solution de Boc₂O (1,1eq, 575mg) dans 5mL de CH₂Cl₂ est ajoutée à 0°C. La réaction est agitée une nuit

à T.A.. La réaction est arrêtée. La phase organique est lavée avec 2x5mL de solution aqueuse d'acide citrique à 5%, 1x5mL de solution aqueuse saturée de NaCl et séchée sur MgSO₄. Le solvant est évaporé pour donner le produit attendu utilisé sans purification (465mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 86%

CCM (AcOEt/Cyclohexane : 3/7) Rf = 0,4

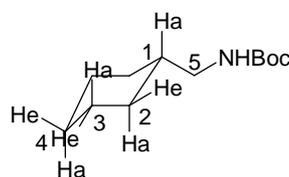
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 6,3min ; P_{HPLC} = 91%

Formule brute: C₁₂H₁₆FNO₂, **Masse molaire**: 225,12g.mol⁻¹

RMN¹H 300MHz (CDCl₃), δ (ppm) : 1,46 (s, 9H, C(CH₃)₃); 4,27 (d, 2H, H₇, J_{7-NH} = 6Hz) ; 4,8-4,9 (m, 1H, NH) ; 6,9-7,0 (m, 2H, H₃ et H₅, J₅₋₆ = J_{5-F} = J₃₋₂ = J_{3-F} = 8,7Hz, J₅₋₃ = 3Hz); 7,2-7,3 (m, 2H, H₆ et H₂)

RMN¹³C 75MHz (CDCl₃), δ (ppm) : 28,4 (C(CH₃)₃) ; 43,9 (C₇) ; 115,3 (C₃ et C₅, J_{C-F} = 21,4Hz) ; 129,1 (C₂ et C₆, J_{C-F} = 7,5Hz)

N-cyclohexylméthylcarbamate de tert-butyle (43)



La cyclohexaméthylamine (3mmol, 339mg) est dissoute dans 10mL de CH₂Cl₂. Une solution de Boc₂O (1,1eq, 720mg) dans 5mL de CH₂Cl₂ est ajoutée à 0°C. La réaction est agitée une nuit à T.A.. La réaction est arrêtée. La phase organique est lavée avec 2x10mL de solution aqueuse d'acide citrique à 5%, 1x10mL de solution aqueuse saturée de NaCl et séchée sur MgSO₄. Le solvant est évaporé pour donner le produit attendu utilisé sans purification (639mg).

Aspect : huile **Rendement** : quantitatif

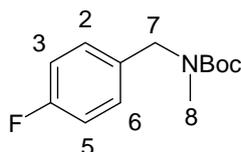
CCM (AcOEt/MeOH : 96/4) Rf = 0,9

Formule brute: C₁₂H₂₃NO₂, **Masse molaire**: 213,17g.mol⁻¹

RMN¹H 300MHz (CDCl₃), δ (ppm) : 0,9-1,0 (m, 2H, H_{2a}); 1,2-1,3 (m, 3H, H_{3a} et H_{4a}); 1,3-1,4 (m, 10H, C(CH₃)₃ et H_{1a}); 1,6-1,8 (m, 5H, H_{4e}, H_{2e} et H_{3e}); 2,95 (t, 2H, H₅, J_{5-1a} = 6,3Hz) ; 4,56 (s, 1H, NH).

RMN¹³C 75MHz (CDCl₃), δ (ppm) : 25,9 (C₃) ; 26,4 (C₄) ; 28,5 (C(CH₃)₃) ; 30,7 (C₂) ; 38,4 (C₁) 46,9 (C₅).

N-(4-fluorobenzyl)-N-méthyl-carbamate de tert-butyle (44)



Le produit **42** (1,99mmol, 450mg) est dissout dans 10mL de DMF anhydre. Du NaH (60% de dispersion, 4eq, 320mg) est ajouté à 0°C. La réaction est agitée pendant 1h à T.A.. Puis du MeI (4eq, 0.497mL) est ajouté et la réaction est agitée 24h à T.A.. 20mL d'eau sont rajoutées et le solvant est évaporé. Le milieu est extrait par 4x40mL d'AcOEt. Les phases organiques

sont rassemblées et séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaque de silice, éluant Cyclohexane/AcOEt : 8/2. Le produit est obtenu sous forme d'huile (266mg).

Aspect : huile, **Rendement** : 56%

Formule brute: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{FNO}_2$, **Masse molaire**: $239,13\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

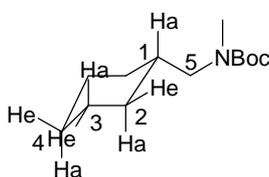
CCM (AcOEt/Cyclohexane : 2/8) $R_f = 0,6$

HPLC (TSK gel, 10min) : $t_r = 7,1\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 85\%$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 2,80 (s, 3H, H_8) ; 4,38 (s, 2H, H_7) ; 6,9-7,1 (m, 2H, H_5 et H_3 , $J_{5-6} = J_{5-F} = J_{3-2} = J_{3-F} = 8,7\text{Hz}$, $J_{5-3} = 3\text{Hz}$) ; 7,2-7,3 (m, 2H, H_2 et H_6 , $J_{6-5} = J_{2-3} = 8,7\text{Hz}$, $J_{6-F} = J_{2-F} = 5,7\text{Hz}$).

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 28,3 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$) ; 33,7 (C_8) ; 51,9 (C_7) ; 115,3 (C_3 et C_5 , $J_{\text{C-F}} = 21,3\text{Hz}$) ; 128,9 (C_2 et C_6).

N-cyclohexylméthyl-N-méthyl-carbamate de tert-butyle (45)



Le produit **43** (3mmol, 639mg) est dissout dans 20mL de DMF anhydre. Du NaH (60% de dispersion, 4eq, 320mg) est ajouté à 0°C . La réaction est agitée pendant 1h à T.A.. Puis du MeI (4eq, 0,6mL) est ajouté et la réaction est agitée 24h à T.A.. 40mL d'eau sont rajoutées et le solvant est évaporé. Le milieu est extrait par 4x40mL d'AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaque de silice, éluant Cyclohexane/AcOEt : 6/4. Le produit est obtenu sous forme d'huile (157mg).

Aspect : huile, **Rendement** : 23%

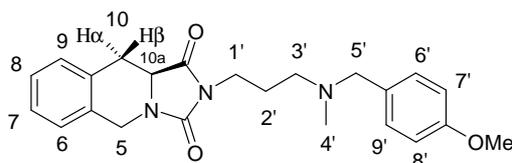
CCM (AcOEt/Cyclohexane : 15/85) $R_f = 0,6$

Formule brute: $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{NO}_2$, **Masse molaire**: $227,19\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 0,8-0,9 (m, 2H, H_{2a}) ; 1,1-1,2 (m, 3H, H_{3a} et H_{4a}) ; 1,45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 1,6-1,7 (m, 6H, H_{4e} , H_{2e} , H_{1a} , H_{3e}) ; 2,83 (s, 3H, H_6) ; 3,0-3,1 (m, 1H, H_5) ; 4,56 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 25,8 (C_3) ; 26,4 (C_4) ; 28,4 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$) ; 30,6 (C_2) ; 35,0 (C_6) ; 37,0 (C_1) ; 55,5 (C_5).

(S)-2-{3-[(4-méthoxybenzyl)méthylamino]propyl}-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (46)



L'amine **52** (0,49mmol, 134,4mg) est dissoute dans 15mL de CH_2Cl_2 anhydre. Le 4-méthoxybenzaldéhyde (1,1eq, 0,07mL) est ajouté et le milieu est agité à T.A. pendant 15min.

Puis $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (5eq, 521mg) et l'acide acétique glacial (1eq, 0,03mL) sont ajoutés et le milieu est agité 1 nuit à T.A.. 30mL de solution aqueuse de NaHCO_3 1M sont ajoutés et le solvant évaporé. La phase aqueuse est extraite par 3x30mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5. Le produit est obtenu sous forme d'huile (181mg).

Aspect : huile jaune, **Rendement** : 94%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5) $R_f = 0,4$,

HPLC (TSK gel, 10min) : $t_r = 4,5\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 99\%$,

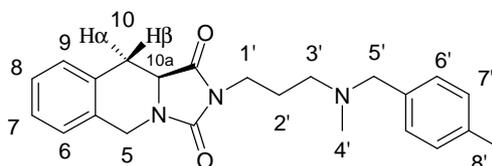
HPLC (C4, 40min) : $t_r = 23,8\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

Formule brute: $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3$, **Masse molaire**: $393,21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF** : $394,3[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,86 (quint, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7\text{Hz}$); 2,17 (s, 3H, $\text{H}_{4'}$); 2,42 (t, 2H, $\text{H}_{3'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 2,76 (dd, 1H, $\text{H}_{10\alpha}$, $J_{10\alpha-10a} = 12\text{Hz}$, $^2J = 15\text{Hz}$); 3,24 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$); 3,42 (s, 2H, $\text{H}_{5'}$); 3,62 (t, 2H, $\text{H}_{1'}$, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$); 3,75 (s, 3H, OCH_3); 4,03 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$, $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$); 4,40 (d, 1H, H_5 , $^2J = 16\text{Hz}$); 5,02 (d, 1H, H_5 , $^2J = 16\text{Hz}$); 6,7-6,8 (m, 2H, $\text{H}_{7'}$ et H_8 , $J_{7'-6'} = 6,6\text{Hz}$, $J_{7'-7'} = 3\text{Hz}$); 7,2-7,3 (m, 6H, $\text{H}_{6'}$, H_6 , H_7 , H_8 et H_9)

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 25,6 ($\text{C}_{2'}$); 30,7 (C_{10}); 37,1 ($\text{C}_{1'}$); 41,5 (C_5); 41,7 ($\text{C}_{4'}$); 54,2 ($\text{C}_{3'}$); 54,5 (C_{10a}); 55,1 (OCH_3); 61,5 ($\text{C}_{5'}$); 126,5-127,2 ($\text{C}_{7'}$) 129,3-130,1 ($\text{C}_{6'}$, C_6 , C_7 , C_8 et C_9)

(S)-2-{3-[méthyl(4-méthylbenzyl)amino]propyl}-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (47)



Le composé **54** (0,25mmol, 90mg) est dissout dans 2mL d'ACN. La réaction est refroidie à 0°C , le formaldéhyde (5eq, 0,093mL) et le cyanoborohydrure de sodium (1,6eq, 25mg) sont ajoutés et le milieu est agité 15min à T.A.. L'acide acétique glacial (1mL) est ajouté jusqu'à $\text{pH} = 6-7$ et la réaction est agitée 45min. Le solvant est évaporé. Le résidu est ensuite repris dans 1mL d'une solution aqueuse de NaOH 1M. Puis la phase aqueuse est extraite avec 3x20mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 93/7. Le produit est obtenu sous forme d'huile (21mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 23%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5) $R_f = 0,4$

HPLC (TSK gel, 10min) : $t_r = 4,8\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 90\%$

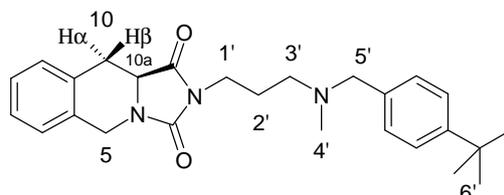
HPLC (C4, 40min) : $t_r = 11,3\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

Formule brute: $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$, **Masse molaire**: $377,49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **ES-MS**: $378,1 [\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,84 (quint, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7\text{Hz}$); 2,17 (s, 3H, $\text{H}_{4'}$); 2,27 (s, 3H, $\text{H}_{8'}$); 2,42 (t, 2H, $\text{H}_{3'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 2,75 (dd, 1H, $\text{H}_{10\alpha}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\alpha-10a} = 12\text{Hz}$); 3,23 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$); 3,43 (s, 2H, $\text{H}_{5'}$); 3,62 (t, 2H, $\text{H}_{1'}$, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$); 4,03 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$); 4,40 (d, 1H, H_5 , $^2J = 16\text{Hz}$); 5,02 (d, 1H, H_5 , $^2J = 16\text{Hz}$); 7,0-7,1 (m, 2H, $\text{H}_{6'}$, $J_{6'-5'} = 8\text{Hz}$); 7,1-7,3 (m, 6H, $\text{H}_{5'}$, H_6 , H_7 , H_8 et H_9)

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 21,1(C_{8'}); 26,0 (C_{2'}); 31,1 (C₁₀); 37,4 (C_{1'}); 41,9 (C₅); 42,1 (C_{4'}); 54,6 (C_{3'}); 54,9 (C_{10a}); 62,2 (C_{5'}); 124,9-126,9-127,4-127,6-129,1-129,3-129,7 (C_{6'}, C_{7'}, C₆, C₇, C₈ et C₉)

(S)-2-{3-[(4-*tert*-butylbenzyl)méthylamino]propyl}-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-*b*]isoquinoléine-1,3-dione (48)



Le composé **55** (0,11mmol, 45mg) est dissout dans 2mL d'ACN. La réaction est refroidie à 0°C, le formaldéhyde (5eq, 0,043mL) et le cyanoborohydrure de sodium (1,6eq, 11mg) sont ajoutés et le milieu est agité 15min à T.A.. L'acide acétique glacial (1mL) est ajouté jusqu'à pH = 6-7 et la réaction est agitée 45min. Le solvant est évaporé. Le résidu est ensuite repris dans 1mL d'une solution aqueuse de NaOH 1M. Puis la phase aqueuse est extraite avec 3x20mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 94/6. Le produit est obtenu sous forme d'huile (19mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement :** 41%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,3

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 5,7min; P_{HPLC} = 99%

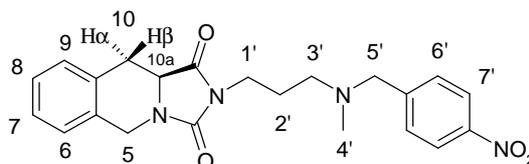
HPLC (C4, 40min) : tr = 14,2min ; P_{HPLC} = 99%

Formule brute: C₂₆H₃₃N₃O₂, **Masse molaire:** 419,57 g.mol⁻¹, **ES-MS:** 420,2 [M+H]⁺

RMN ^1H 300MHz (CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 1,28 (s, 9H, H_{6'}); 1,87 (quint, 2H, H_{2'}, $J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7\text{Hz}$); 2,18 (s, 3H, H_{4'}); 2,44 (t, 2H, H_{3'}, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 2,80 (dd, 1H, H_{10 α} , $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\alpha-10a} = 12\text{Hz}$); 3,25 (dd, 1H, H_{10 β} , $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$); 3,44 (s, 2H, H_{5'}); 3,63 (t, 2H, H_{1'}, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$); 4,04 (dd, 1H, H_{10a}, $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$); 4,41 (d, 1H, H₅, $^2J = 16\text{Hz}$); 5,02 (d, 1H, H₅, $^2J = 16\text{Hz}$); 7,1-7,3 (m, 8H, H_{aro}).

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 26,1 (C_{2'}); 31,2 (C₁₀); 31,7 (C_{6'}); 37,5 (C_{1'}); 41,9 (C₅); 42,2 (C_{4'}); 54,9 (C_{3'}); 55,0(C_{10a}); 62,1 (C_{5'}); 125,3-126,9-127,5-127,6-127,6-129,0-129,7 (C_{aro})

(S)-2-{3-[méthyl(4-nitrobenzyl)amino]propyl}-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-*b*]isoquinoléine-1,3-dione (49)



Le composé **56** (0,13mmol, 45mg) est dissout dans 2mL d'ACN. La réaction est refroidie à 0°C, le formaldéhyde (5eq, 0,047mL) et le cyanoborohydrure de sodium (1,6eq, 13mg) sont

ajoutés et le milieu est agité 15min à T.A.. L'acide acétique glacial (1mL) est ajouté jusqu'à pH = 6-7 et la réaction est agitée 45min. Le solvant est évaporé. Le résidu est ensuite repris dans 1mL d'une solution de NaOH 1M. Puis la phase aqueuse est extraite avec 3x20mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 94/6. Le produit est obtenu sous forme d'huile (12mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 23%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,5

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,6min; P_{HPLC} = 99%

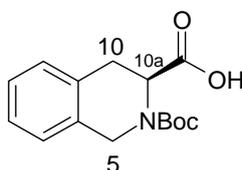
HPLC (C4, 40min) : tr = 10,2min ; P_{HPLC} = 99%

Formule brute: C₂₂H₂₄N₄O₄, **Masse molaire**: 408,46 g.mol⁻¹, **ES-MS**: 409,1 [M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 1,88 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7Hz); 2,18 (s, 3H, H_{4'}); 2,46 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 2,76 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 15Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 3,25 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,56 (s, 2H, H_{5'}); 3,65 (t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz); 4,06 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 4,41 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz); 5,02 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz); 7,1-7,3 (m, 4H, H₆, H₇, H₈ et H₉); 7,4-7,5 (m, 2H, H_{7'}, J_{7'-6'} = 9Hz, J_{7'-7'} = 2Hz); 8,1-8,2 (m, 2H, H_{6'}, J_{6'-7'} = 9Hz, J_{6'-6'} = 2Hz)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 26,3 (C_{2'}); 31,2 (C₁₀); 37,3 (C_{1'}); 42,0 (C₅); 42,4 (C_{4'}); 55,0 (C_{10a}); 55,3 (C_{3'}); 62,0 (C_{5'}); 123,9 (C_{7'}) 127,0-127,6-127,8-129,8 (C_{6'}, C₆, C₇, C₈ et C₉)

ester tert-butyle de l'acide 3-carboxy-(S)-3,4-dihydro-1H-isoquinoléine-2-carboxylique (50)



La L-TicOH (2,82mmol, 500mg) est dissout dans un mélange 1,4 dioxane/H₂O/NaOH 1M 5-5-5mL. Une solution de Boc₂O (1,1eq, 677g) dans 5mL de 1,4 dioxane est ajoutée. Puis le milieu est agité à T.A. pendant une nuit. Le solvant est évaporé, le résidu est repris dans 30mL d'AcOEt. La phase organique est ensuite lavée avec 2x20mL d'une solution aqueuse d'acide citrique 5% et 2x20mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄. Le solvant est évaporé pour donner le produit attendu suffisamment pur pour être utilisé sans purification (751mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 96%

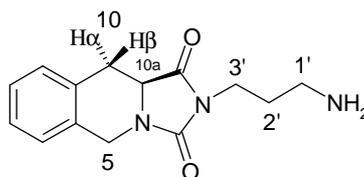
CCM (CH₂Cl₂/MeOH: 9/1) R_f = 0,7

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 5,7min ; P_{HPLC} = 99%

Formule brute: C₁₅H₁₉NO₄, **Masse molaire**: 277,32 g.mol⁻¹

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 1,34 (s, 9H, C(CH₃)₃); 3,0-3,1 (m, 2H, H₁₀); 4,3-4,4 (m, 1H, H₅); 4,5-4,6 (m, 1H, H_{10a}); 4,6-4,7 (m, 1H, H₅); 7,0-7,2 (m, 4H, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 28,2 (C(CH₃)₃); 30,8 (C₁₀); 44,5 (C₅); 54,1 (C_{10a}); 126,2-126,8-127,8-128,5 (C_{aro})

(S)-2-(3-aminopropyl)-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (51)

L'amine **36** (5,17mmol, 1,86g) est dissoute dans un mélange équimoléculaire CH₂Cl₂/TFA : 15/15mL). Le milieu est agité à T.A. pendant 30min. Le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 50mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec 20mL de solution aqueuse de NaOH 1M. La phase aqueuse est extraite avec 3x50mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé pour donner le produit attendu suffisamment pur pour être utilisé sans purification (1g).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 75%

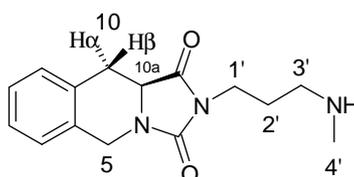
CCM (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5) R_f = 0,1

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 3,94min ; P_{HPLC} = 99%

Formule brute: C₁₄H₁₇N₃O₂, **Masse molaire**: 259,31 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 260,2 [M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 2,01 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7Hz) ; 2,93 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 15Hz, J_{10α-10a} = 12Hz) ; 3,02 (t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz) ; 3,27 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz) ; 3,69 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz) ; 4,29 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz) ; 4,48 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 4,96 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 4,99 (t, 1H, NH) ; 7,2-7,3 (m, 4H, H_{aro}).

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 26,5 (C_{2'}) ; 30,4 (C₁₀) ; 35,3 (C_{3'}) ; 37,3 (C_{1'}) ; 41,6 (C₅) ; 55,3 (C_{10a}) ; 126,7-127,2-127,3-129,5 (C_{aro})

(S)-2-(3-méthylaminopropyl)-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (52)

L'amine **51** (0,5mmol, 129mg) est ensuite dissoute dans 5mL de MeOH préalablement séché sur tamis moléculaire 3Å. Le formaldéhyde à 37% (1eq, 0,04mL) est ajouté et le milieu est agité 10min à T.A.. Puis l'acide formique (2eq, 0,04mL) est ajouté et le milieu est agité une nuit à T.A.. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 8,5/1,5. L'amine secondaire est obtenue sous forme d'huile (35mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 26%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH: 9/1) R_f = 0,2

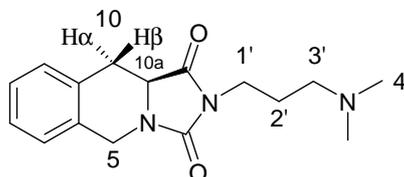
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 3,6min ; P_{HPLC} = 87%

Formule brute: C₁₅H₁₉N₃O₂, **Masse molaire**: 273,34 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 274,1 [M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 1,85 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7Hz) ; 2,43 (s, 3H, H_{4'}) ; 2,61 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz) ; 2,84 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 15Hz, J_{10α-10a} = 12Hz) ; 3,24 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz) ; 3,66 (t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz) ; 4,11 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz) ; 4,39 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 4,96 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 7,1-7,3 (m, 4H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 27,3 ($\text{C}_{2'}$) ; 30,6 (C_{10}) ; 35,6 ($\text{C}_{1'}$) ; 36,9 ($\text{C}_{3'}$) ; 41,6 (C_5) ; 50,2 ($\text{C}_{4'}$) ; 54,7 (C_{10a}) ; 126,6-127,2-127,3-129,4 (C_{aro})

(S)-2-(3-diméthylaminopropyl)-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (53)



Lamine tertiaire est obtenu sous forme d'huile (10mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement :** 7%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 98/2) Rf = 0,5

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,1min ; $\text{P}_{\text{HPLC}} = 99\%$

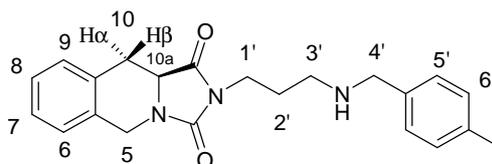
HPLC (C4, 40min) : tr = 9,2 min ; $\text{P}_{\text{HPLC}} = 99\%$

Formule brute: $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$, **Masse molaire:** 287.36 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF :** 288,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,82 (quint, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7\text{Hz}$); 2,22 (s, 6H, $\text{H}_{4'}$); 2,35 (t, 2H, $\text{H}_{3'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 2,83 (dd, 1H, H_{10a} , $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$); 3,26 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$); 3,61 (t, 2H, $\text{H}_{1'}$, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$); 4,07 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$); 4,42 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$); 5,01 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$) ; 7,1-7,3 (m, 4H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 26,1 ($\text{C}_{3'}$); 30,8 (C_{10}); 37,1 ($\text{C}_{1'}$) ; 41,7 (C_5) ; 45,7 ($\text{C}_{4'}$) ; 54,7 (C_{10a}) ; 56,7 ($\text{C}_{2'}$) ; 126,7-127,2-127,4-129,5 (C_{aro})

(S)-2-[3-(4-méthylbenzylamino)propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (54)



Le composé **36** (0,38mmol, 135mg) est dissout dans 5mL de MeOH. Une solution de HCl 12N (3eq, 0,095mL) est ajoutée et le milieu est agité 2h30 à T.A.. Le solvant est évaporé à l'aide d'une pompe à palette. Le produit est repris dans 5mL d'EtOH absolu. Le p-tolualdéhyde (1,1eq, 0,049mL), la TEA (4eq, 0,211mL) et du tamis moléculaire 3Å sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 3h. Puis, il est refroidi à 0°C. Le NaBH_4 (5eq, 71,1mg) est ajouté par petites portions. La réaction est agitée à T.A. pendant une nuit. 10mL d' H_2O sont ajoutés. Après filtration sur célite, le solvant est évaporé. Le résidu est ensuite repris dans une solution aqueuse de NaOH 1M. Puis la phase aqueuse est extraite avec 3x20mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5. Le produit est obtenu sous forme d'huile (91mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 66%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5) Rf = 0,5

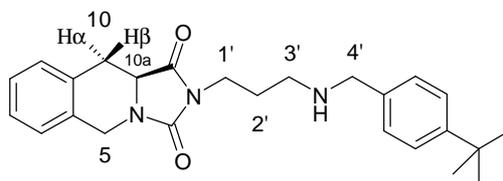
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,8min; P_{HPLC} = 80%

Formule brute: $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$, **Masse molaire**: 363,46 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF** : 364,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,89 (quint, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7\text{Hz}$); 2,32 (s, 3H, Me); 2,67 (t, 2H, $\text{H}_{3'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 2,78 (dd, 1H, $\text{H}_{10\alpha}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\alpha-10a} = 12\text{Hz}$); 3,26 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$); 3,68 (t, 2H, $\text{H}_{1'}$, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$); 3,76 (s, 2H, $\text{H}_{4'}$); 4,07 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$); 4,44 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$); 5,04 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$); 7,1-7,2 (m, 2H, $\text{H}_{6'}$, $J_{6'-5'} = 8\text{Hz}$); 7,2-7,4 (m, 6H, H_5 , H_6 , H_7 , H_8 et H_9).

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 20,94(C_{Me}) 28,0 ($\text{C}_{2'}$); 30,8 (C_{10}); 36,6 ($\text{C}_{1'}$); 41,5 (C_5); 45,7 ($\text{C}_{3'}$) 53,4 (C_4); 54,5 (C_{10a}); 126,5-127,1-127,2-128,0-128,9-129,3 ($\text{C}_{5'}$, $\text{C}_{6'}$, C_6 , C_7 , C_8 et C_9)

(S)-2-[3-(4-tert-butylbenzylamino)propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (55)



Le composé **36** (0,38mmol, 135mg) est dissout dans 5mL de MeOH. Une solution de HCl 12N (3eq, 0,095mL) est ajoutée et le milieu est agité 2h30 à T.A.. Le solvant est évaporé à l'aide d'une pompe à palette. Le produit est repris dans 5mL d'EtOH absolu. Le 4-terbutylbenzaldéhyde (1,1eq, 67mg), la TEA (4eq, 0,211mL) et du tamis moléculaire 3Å sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 3h. Puis, il est refroidi à 0°C. Le NaBH_4 (5eq, 71,1mg) est ajouté par petites portions. La réaction est agitée à T.A. pendant une nuit. 10mL d' H_2O sont ajoutés. Après filtration sur célite, le solvant est évaporé. Le résidu est ensuite repris dans une solution de NaOH 1M. Puis la phase aqueuse est extraite avec 3x20mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5. Le produit est obtenu sous forme d'huile (46mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 30%

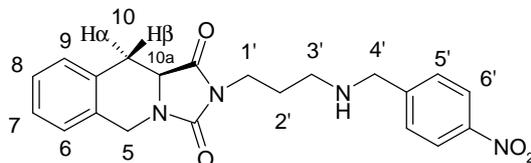
CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 98/2) Rf = 0,5

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 5,7min; P_{HPLC} = 93%

Formule brute: $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$, **Masse molaire**: 405,54 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **ES-SM**: 406,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,21 (s, 9H terButyl); 1,76 (quint, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7\text{Hz}$); 2,58 (t, 2H, $\text{H}_{3'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 2,71 (dd, 1H, $\text{H}_{10\alpha}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\alpha-10a} = 12\text{Hz}$); 3,16 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$); 3,58 (t, 2H, $\text{H}_{1'}$, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$); 3,65 (s, 2H, $\text{H}_{4'}$); 3,96 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$, $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$); 4,32 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$); 4,94 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$); 7,1-7,3 (m, 8H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 28,3 ($\text{C}_{2'}$); 30,8 (C_{10}); 31,3($\text{C}_{\text{terbutyl}}$); 36,7 ($\text{C}_{1'}$); 41,6 (C_5); 46,1 ($\text{C}_{3'}$) 53,5 (C_4); 54,6 (C_{10a}); 125,2-126,6-127,1-127,3-127,8-129,4 (C_{aro})

(S)-2-[3-(4-nitrobenzylamino)propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (56)

Le composé **36** (0,42mmol, 150mg) est dissout dans 5mL de MeOH. Une solution de HCl 12N (3eq, 0,105mL) est ajoutée et le milieu est agité 2h30 à T.A.. Le solvant est évaporé à l'aide d'une pompe à palette. Le produit est repris dans 5mL d'EtOH absolu. Le 4-nitrobenzaldéhyde (1,1eq, 69mg), la TEA (4eq, 0,235mL) et du tamis moléculaire 3Å sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 3h. Puis, il est refroidi à 0°C. Le NaBH₄ (5eq, 79mg) est ajouté par petites portions. La réaction est agitée à T.A. pendant une nuit. 10mL d'H₂O sont ajoutés. Après filtration sur célite, le solvant est évaporé. Le résidu est ensuite repris dans une solution aqueuse de NaOH 1M. Puis la phase aqueuse est extraite avec 3x20mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 95/5. Le produit est obtenu sous forme d'huile (83mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 50%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,5

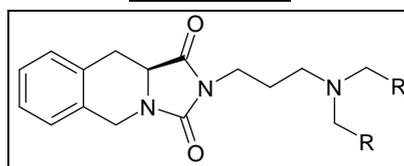
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,6min; P_{HPLC} > 99%

Formule brute: C₂₁H₂₂N₄O₄, **Masse molaire**: 394,43 g.mol⁻¹, **ES-MS**: 395,1 [M+H]⁺

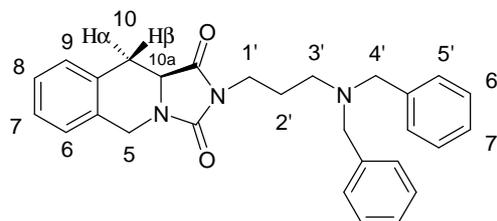
RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,81 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7Hz); 2,58 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 2,70 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 15Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 3,19 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,64 (t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz); 3,81 (s, 2H, H_{4'}); 4,01 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 4,35 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 4,95 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 7,1-7,3 (m, 4H, H₆, H₇, H₈ et H₉); 7,4-7,5 (m, 2H, H_{6'}, J_{6'-5'} = 9Hz); 8,0-8,1 (m, 2H, H_{5'}, J_{5'-6'} = 9Hz, J_{5'-5'} = 2Hz.)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 31,2 (C_{2'}); 33,9 (C₁₀); 39,4 (C_{1'}); 44,6 (C₅); 49,0 (C_{3'}); 56,1 (C₄); 57,7 (C_{10a}); 126,5 (C_{5'}); 129,6-130,3-130,4-132,4 (C₆, C₇, C₈ et C₉) ; 131,7 (C_{6'})

2.2. Disubstitution de l'atome d'azote protonable par 2 groupements identiques



a) Substitution par 2 groupements aromatiques

(S)-2-(3-dibenzylaminopropyl)-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (57)

A une solution de l'amine **57** (0,58mmol, 152mg.) dans 5mL de CH₂CL₂ préalablement séché sur tamis moléculaire, sont ajoutés le benzaldéhyde (3eq, 0,18mL) et NaHB(OAc)₃ (3eq, 373mg). La réaction est agitée 4h à T.A.. 5mL d'une solution aqueuse de NaOH 1M sont ajoutés puis le milieu est agité 15min à T.A.. La phase aqueuse est extraite par 3x15mL de CH₂CL₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant AcOEt/Cyclohexane: 2/8. Le produit est obtenu sous forme d'huile (104mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 41%

CCM (AcOEt/Cyclohexane : 3/7) R_f = 0,8,

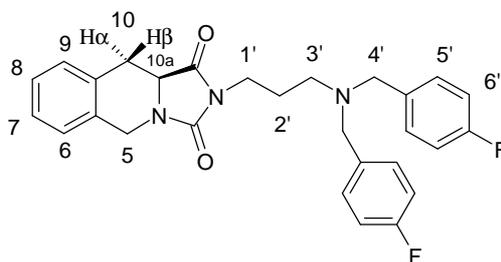
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 5,12min ; P_{HPLC} = 95%,

HPLC (C4, 40min) : tr = 20,80min ; P_{HPLC} = 97%

Formule brute: C₂₈H₂₉N₃O₂, **Masse molaire**: 439,56 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 440,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,85 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz) ; 2,45 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz) ; 2,61 (dd, 1H, H_{10α}, J_{10α-10a} = 12Hz, ²J = 16Hz) ; 3,17 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 16Hz, J_{10β-10a} = 5Hz) ; 3,5-3,6 (m, 6H, H_{5'} et H_{1'}) ; 3,96 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10β} = 5Hz, J_{10a-10α} = 12Hz) ; 4,37 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 4,98 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 7,1-7,3 (m, 14H, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 25,6 (C_{2'}) ; 31,0 (C₁₀) ; 37,2 (C_{1'}) ; 41,7 (C₅) ; 41,7 (C_{3'}) ; 54,7 (C_{10a}) ; 58,4 (C_{4'}) ; 126,8-127,0-127,3-127,5-128,4-129,1-129,6-129,9 (C_{aro})

(S)-2-{3-[bis(4-fluorobenzyl)amino]propyl}-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (58)

A une solution de l'amine **51** (0,44mmol, 115mg.) dans 5mL de CH₂CL₂ préalablement séché sur tamis moléculaire, sont ajoutés le 4-fluorobenzaldéhyde (3eq, 0,14mL) et NaHB(OAc)₃ (3eq, 282mg). La réaction est agitée 4h à T.A.. 5mL d'une solution aqueuse de NaOH 1M sont ajoutés puis le milieu est agité 15min à T.A.. La phase aqueuse est extraite par 3x15mL de CH₂CL₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant AcOEt/Cyclohexane: 2/8. Le composé est obtenu sous forme d'huile (117mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 56%

CCM (AcOEt/Cyclohexane : 2/8) Rf = 0,2

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 5,4min ; P_{HPLC} = 98%

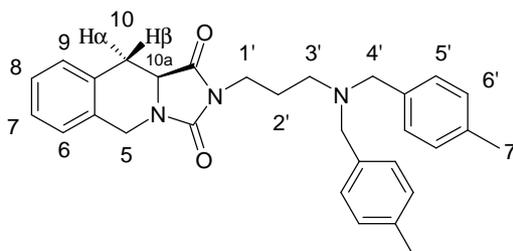
HPLC (C4, 40min) : tr = 18,9min ; P_{HPLC} = 97%

Formule brute: C₂₈H₂₇F₂N₃O₂, **Masse molaire**: 475,54 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 476,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 1,84 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz) ; 2,43 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz) ; 2,67 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 16Hz, J_{10α-10a} = 12Hz) ; 3,21 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 16Hz, J_{10β-10a} = 5Hz) ; 3,5-3,6 (m, 6H, H_{4'} et H_{1'}) ; 4,00 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz) ; 4,38 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 4,99 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 6,9-7,0 (tt, 4H, H_{6'}, J_{6'-5'} = J_{6'-F} = 8,7Hz, J_{6'-6'} = 2,8Hz) ; 7,2-7,3 (m, 8H, H_{5'}, H₆, H₇, H₈ et H₉)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 23,8 (C_{2'}) ; 29,2 (C₁₀) ; 35,2 (C_{1'}) ; 39,9 (C₅) ; 48,5 (C_{3'}) ; 52,9 (C_{10a}) ; 55,7 (C_{4'}) ; 113,17-113,18 (C_{5'}, J_{C-F} = 21Hz) ; 126,6-130,5 (C_{6'}, C₆, C₇, C₈ et C₉)

(S)-2-{3-[Bis(4méthylbenzyl)amino]propyl}-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (59)



A une solution de l'amine **51** (0,57mmol, 147mg,) dans 5mL de CH₂Cl₂ préalablement séché sur tamis moléculaire, sont ajoutés le p-tolualdéhyde (3eq, 0,20mL) et NaHB(OAc)₃ (3eq, 362mg). La réaction est agitée 4h à T.A.. 5mL d'une solution aqueuse de NaOH 1M sont ajoutés puis le milieu est agité 15min à T.A.. La phase aqueuse est extraite par 3x15mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant AcOEt/Cyclohexane: 3/7. Le composé est obtenu sous forme d'huile (71mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 26%

CCM (AcOEt/Cyclohexane : 3/7) Rf = 0,5

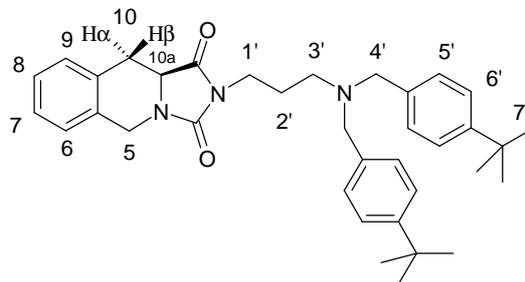
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 5,7min ; P_{HPLC} = 97%

HPLC (C4, 40min) : tr = 28,7min ; P_{HPLC} = 90%

Formule brute: C₃₀H₃₃N₃O₂, **Masse molaire**: 467,62 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 468,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 1,86 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz) ; 2,25 (s, 6H, H_{7'}) ; 2,43 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz) ; 2,63 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 16Hz, J_{10α-10a} = 12Hz) ; 3,19 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 16Hz, J_{10β-10a} = 5Hz) ; 3,5-3,6 (m, 6H, H_{4'} et H_{1'}) ; 3,95 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz) ; 4,39 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 4,98 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 7,0-7,1 (m, 4H, H_{6'}, H_{8'}, J_{6'-5'} = 7,8 Hz) ; 7,2-7,3 (m, 8H, H_{5'}, H₆, H₇, H₈ et H₉)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 16,4 (C_{7'}) ; 20,7 (C_{2'}) ; 26,2 (C₁₀) ; 32,4 (C_{1'}) ; 36,9 (C₅) ; 45,3 (C_{3'}) ; 49,9 (C_{10a}) ; 53,1 (C_{4'}) ; 122,0-122,5-122,7-124,2-124,8-125,0 (C_{aro})

(S)-2-[3-[bis(4-tert-butylbenzyl)amino]propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (60)

A une solution de l'amine **51** (0,57mmol, 149mg,) dans 5mL de CH₂Cl₂ séché sur tamis moléculaire, sont ajoutés 4-tert-butylbenzaldéhyde (3eq, 0,29mL) et NaHB(OAc)₃ (3eq, 376mg). La réaction est agitée 4h à T.A.. 5mL d'une solution aqueuse de NaOH 1M sont ajoutés puis le milieu est agité 15min à T.A.. La phase aqueuse est extraite par 3x15mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant AcOEt/Cyclohexane:3/7. Le composé est obtenu sous forme d'huile (92mg).

Aspect : huile blanchâtre, **Rendement** : 29%

CCM (AcOEt/Cyclohexane : 3/7) R_f = 0,6

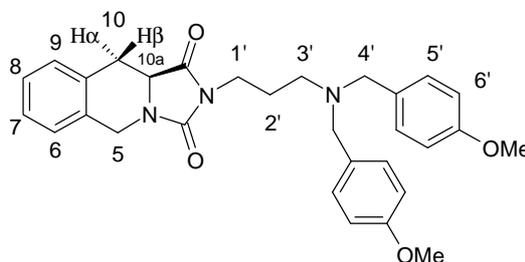
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 7,2min ; P_{HPLC} = 98%

HPLC (C4, 40min) : tr = 18,1min ; P_{HPLC} = 92%

Formule brute: C₃₆H₄₅N₃O₂, **Masse molaire**: 551,78 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 552,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,28 (s, 18H, H_{7'}) ; 1,88 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz) ; 2,48 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz) ; 2,75 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 16Hz, J_{10α-10a} = 12Hz) ; 3,23 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 16Hz, J_{10β-10a} = 5Hz) ; 3,5-3,6 (m, 6H, H_{4'} et H_{1'}) ; 3,98 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz) ; 4,39 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 5,00 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 7,2-7,3 (m, 12H, H_{5'}, H_{6'}, H₆, H₇, H₈ et H₉)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 24,6 (C_{2'}) ; 30,1 (C₁₀) ; 30,6 (C_{7'}) ; 33,6 (C_{1'}) ; 40,8 (C₅) ; 49,5 (C_{3'}) ; 53,8 (C_{10a}) ; 56,8 (C_{4'}) ; 124,2-125,8-126,4-126,5-127,6-128,6 (C_{aro})

(S)-2-[3-[bis(4-méthoxybenzyl)amino]propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (61)

A une solution de l'amine **51** (0,69mmol, 177mg,) dans 5mL de CH₂Cl₂ préalablement séché sur tamis moléculaire, sont ajoutés le 4-méthoxybenzaldéhyde (3eq, 0,25mL) et NaHB(OAc)₃ (3eq, 436mg). La réaction est agitée 4h à T.A.. 5mL d'une solution aqueuse de NaOH 1M sont ajoutés puis le milieu est agité 15min à T.A.. La phase aqueuse est extraite par 3x15mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est

éaporé, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant AcOEt/Cyclohexane: 3/7. Le composé est obtenu sous forme d'huile (146mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 42%

CCM (AcOEt/ Cyclohexane : 3/7) Rf = 0,3

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 5,2min ; P_{HPLC} = 96%

HPLC (C4, 40min) : tr = 22,3min ; P_{HPLC} = 96%

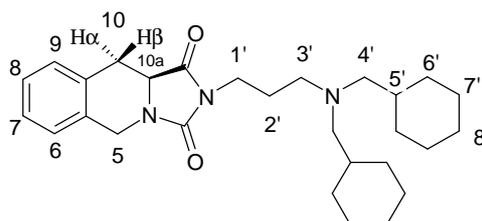
Formule brute: C₃₀H₃₃N₃O₄, **Masse molaire**: 499,62g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 500,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,83 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz); 2,44 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 2,66 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 15Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 3,20 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,5-3,6 (m, 6H, H_{4'} et H_{1'}); 3,74 (s, 2x3H, OCH₃); 3,97 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 4,39 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 4,99 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 6,8-6,9 (m, 4H, H_{6'}, J_{6'-5'} = 5Hz, J_{6'-6'} = 3Hz); 7,2-7,3 (m, 12H, H_{6'}, H_{9'}, H₆, H₇, H₈ et H₉)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 21,5 (C_{2'}); 27,1 (C₁₀); 33,3 (C_{1'}); 37,8 (C₅); 46,4 (C_{3'}); 50,8 (C_{10a}); 51,4 (OCH₃); 53,5 (C_{4'}); 120,1-122,9-123,4-123,6-125,7-126,3 (C_{aro})

b) Substitution par 2 groupements aliphatiques

(S)-2-[3-(bis(cyclohexylméthyl)amino)propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (62)



A une solution de l'amine **51** (0,34mmol, 88mg,) dans 5mL de CH₂Cl₂ préalablement séché sur tamis moléculaire, sont ajoutés le cyclohexanecarboxaldéhyde (3eq, 0,12mL) et NaHB(OAc)₃ (3eq, 217mg). La réaction est agitée 4h à T.A.. 5mL d'une solution aqueuse de NaOH 1M sont ajoutés puis le milieu est agité 15min à T.A.. La phase aqueuse est extraite par 3x15mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant AcOEt/Cyclohexane: 2/8. Le composé est obtenu sous forme d'huile (86mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 56%

CCM (AcOEt/Cyclohexane : 2/8) Rf = 0,4

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 6,5min ; P_{HPLC} = 98%

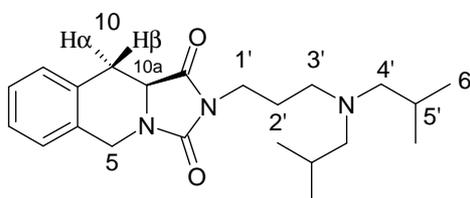
HPLC (C4, 40min) : tr = 15,9min ; P_{HPLC} = 98%

Formule brute: C₂₈H₄₁N₃O₂, **Masse molaire**: 451,66g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 452,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 0,7-0,9 (m, 4H, H_{6'a}); 1,1-1,3 (m, 3H, H_{7'a} et H_{8'a}); 1,3-1,5 (m, 2H, H_{5'a}); 1,6-1,8 (m, 12H, H_{6'e}, H_{7'e}, H_{8'e} et H_{2'}); 2,08 (d, 2x2H, H_{4'}, J_{4'-5'} = 7Hz); 2,36 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 2,82 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 16Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 3,27 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 16Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,58 (t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz); 4,06 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 4,41 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 5,03 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 7,2-7,3 (m, 4H, H_{aro}).

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 28,8 et 29,4 ($\text{C}_{7'}$ et $\text{C}_{8'}$) ; 33,6 (C_{10}) ; 34,7 ($\text{C}_{6'}$) ; 38,7 ($\text{C}_{5'}$) ; 40,2 ($\text{C}_{1'}$) ; 44,1 (C_5) ; 54,2 (C_{10a}) ; 55,1 ($\text{C}_{3'}$) ; 64,8 ($\text{C}_{4'}$) ; 129,3-129,9-132,0 (C_{aro})

(S)-2-(3-diisobutylaminopropyl)-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (63)



L'amine **51** (0,44mmol, 115,2mg) est dissoute dans 5mL de CH_2Cl_2 préalablement séché sur tamis moléculaire. L'isobutyraldéhyde (3eq, 0,121mL) et $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (3eq, 281,9mg) sont ajoutés et le milieu est mis sous atmosphère d'azote. La réaction est agitée 7h à T.A.. 7mL d'une solution aqueuse de NaOH 1M sont ajoutés. Le milieu est agité 15min. La phase aqueuse est extraite avec 3x20mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 98/2. Le composé est obtenu sous forme d'huile (72mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement :** 48%

CCM ($\text{AcOEt}/\text{Cyclohexane}$: 5/5) $R_f = 0,8$

HPLC (TSK gel , 10min) : $t_r = 4,7\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

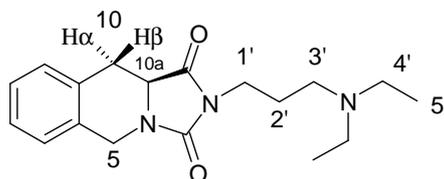
HPLC (C4 , 40min) : $t_r = 12,1\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

Formule brute: $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_2$, **Masse molaire:** $371,53 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF :** $372,3[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 0,8-0,9 (m, 12H, $\text{H}_{6'}$) ; 1,6-1,7 (m, 4H, $\text{H}_{5'}$ et $\text{H}_{2'}$) ; 2,05(d, 4H, $\text{H}_{4'}$, $J_{4'-5'} = 7\text{Hz}$) ; 2,39 (t, 2H, $\text{H}_{3'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$) ; 2,81 (dd, 1H, $\text{H}_{10\alpha}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\alpha-10a} = 12\text{Hz}$) ; 3,27 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$) ; 3,5-3,6 (m, 2H, $\text{H}_{1'}$, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$) ; 4,41 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$) ; 4,41 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$) ; 5,03 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$) ; 7,2-7,3 (m, 4H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 20,8 ($\text{C}_{6'}$) ; 25,9 ($\text{C}_{2'}$) ; 26,4 ($\text{C}_{5'}$) ; 30,8 (C_{10}) ; 37,4 ($\text{C}_{1'}$) ; 41,5 (C_5) ; 52,5 ($\text{C}_{3'}$) ; 54,5 (C_{10a}) ; 63,7 ($\text{C}_{4'}$) ; 126,5-127,0-127,2-129,3 (C_{aro})

(S)-2-(3-diéthylaminopropyl)-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (64)



L'amine **51** (0,39mmol, 103mg) est dissoute dans 7mL de CH_2Cl_2 préalablement séché sur tamis moléculaire. L'acétaldéhyde (3eq, 0,068mL) et $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (3eq, 253mg) sont ajoutés et le milieu est placé sous atmosphère d'azote. La réaction est agitée 7h à T.A.. 7mL d'une solution aqueuse de NaOH 1M sont ajoutés. Le milieu est agité 15min. La phase aqueuse est extraite avec 3x20mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont réunies puis séchées sur

MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : AcOEt/MeOH : 94/6. Le composé est obtenu sous forme d'huile (32mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 26%

CCM (AcOEt/MeOH : 94/6) Rf = 0,2

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 3,9min ; P_{HPLC} = 98%

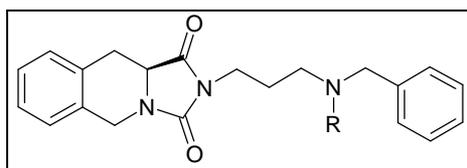
HPLC (C4, 40min) : tr = 10,7min ; P_{HPLC} = 98%

Formule brute: C₁₈H₂₅N₃O₂, **Masse molaire**: 315,42 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 316,1 [M+H]⁺

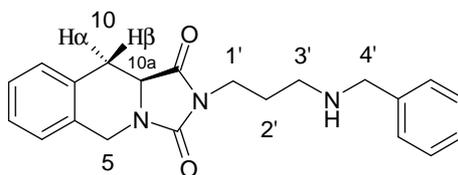
RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,01 (t, 6H, H_{5'}, J_{5'-4'} = 7Hz); 1,82 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7Hz); 2,5-2,6 (m, 6H, H_{3'} et H_{4'}); 2,82 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 15Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 3,27 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz.); 3,60 (t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz); 4,07 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 4,42 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 5,00 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz) ; 7,1-7,3 (m, 4H, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 14,1 (C_{5'}); 28,1 (C_{2'}); 33,3 (C₁₀); 40,0 (C_{1'}); 44,1 (C₅); 49,2 (C_{4'}); 52,8 (C_{3'}); 57,3 (C_{10a}); 129,3-129,8 (C_{aro})

2.3. Evaluation du petit groupement sur l'azote protonable



(S)-2-(3-benzylaminopropyl)-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (65)



A une solution de l'amine **51** (1,61mmol, 418mg) dans 10mL CH₂Cl₂, sont ajoutés le benzaldéhyde (1,1eq, 0,18mL), la TEA (0,4eq, 0,09mL) et du tamis moléculaire 3Å. Le milieu réactionnel est agité pendant 3h, ensuite il est refroidi à 0°C et NaBH₄ (5eq, 305mg) est ajouté par petites portions. La réaction est agitée à T.A. pendant 1h30. 10mL d'H₂O sont ajoutés. Après filtration, la phase aqueuse est extraite avec 3x10mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 95/5. Le composé est obtenu sous forme d'huile (119mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 21%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) Rf = 0,4

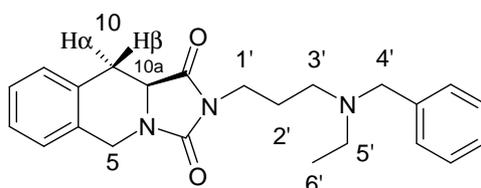
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,7min ; P_{HPLC} = 98%

Formule brute: C₂₁H₂₃N₃O₂, **Masse molaire**: 349,44 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 350,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,86 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz); 2,63 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 2,6-2,7 (m, 1H, H_{10α}); 3,19 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,63

(t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz); 3,76 (s, 2H, H_{4'}); 4,03 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 4,37 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 4,98 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 7,2-7,3 (m, 9H, H_{aro})
RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 27,9 (C_{2'}); 30,7 (C₁₀); 36,5 (C_{1'}); 41,5 (C₅); 45,7 (C_{3'}); 53,6 (C_{4'}); 54,5 (C_{10a}); 126,5-126,9-127,1-127,2-128,2-128,3-129,3 (C_{aro})

(S)-2-[3-(benzyléthylamino)propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (66)



L'amine **65** (0,29mmol, 100,6mg) et l'acétaldéhyde (2eq, 0,032mL) sont dissous dans 5mL de CH₂Cl₂. La réaction est agitée 15min à T.A.. NaBH(OAc)₃ (5eq, 296,7mg) et l'acide acétique glacial (1eq, 0,017mL) sont ajoutés et le milieu est agité à T.A. une nuit. 5mL de solution aqueuse de NaHCO₃ 1M sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite avec 3x10mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par flash chromatographie éluant : AcOEt/Hexane : 2/8 suivie par une chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH/NH₄OH : 7/2,5/0,5/0,25 et. Le produit est obtenu sous forme d'huile (20mg).

Aspect : huile jaune, **Rendement** : 18%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,5

HPLC (TSK gel, 10min): tr = 4,1 min; P_{HPLC} = 75%

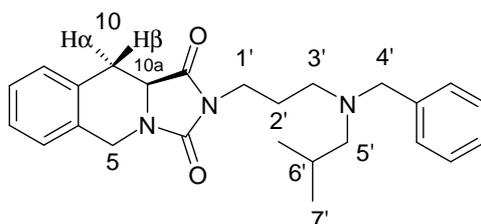
HPLC (C4, 40min): tr = 14,1min; P_{HPLC} = 92%

Formule brute: C₂₃H₂₇N₃O₂, **Masse molaire**: 377,49 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 378,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,03 (t, 3H, H_{6'}, J_{6'-5'} = 7Hz); 1,81 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz); 2,47 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 2,49 (q, 2H, H_{5'}, J_{5'-6'} = 7Hz); 2,71 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 15Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 3,22 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,47 (s, 2H, H_{4'}); 3,55 (t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz); 4,03 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 4,40 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 4,98 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 7,1-7,3 (m, 9H, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 11,5 (C_{6'}); 25,5 (C_{2'}); 30,8 (C₁₀); 37,1 (C_{1'}); 41,5 (C₅); 47,0 (C_{5'}); 50,1 (C_{3'}); 54,5 (C_{10a}); 57,8 (C_{4'}); 126,5-126,6-127,1-127,2-128,0-128,8-129,3 (C_{aro})

2-[3-(benzylisobutylamino)propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (67)



L'amine **65** (0,33mmol, 349,4mg) et l'isobutyraldéhyde (1eq, 0,030mL) sont dissous dans 5mL de CH₂Cl₂, préalablement séché sur tamis moléculaire. La réaction est agitée 1h à T.A. sous atmosphère d'azote. NaBH(OAc)₃ (5eq, 211,94mg) et l'acide acétique glacial (1eq, 0,019mL) sont ajoutés à 0°C et le milieu est agité à T.A. une nuit. 5mL de solution aqueuse de NaHCO₃ 1M sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite avec 3x10mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par 2 chromatographies sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 95/5 et CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH : 7/2,5/0,5. Le produit est obtenu sous forme d'huile (32mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 24%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,8

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 5,0min ; P_{HPLC} = 98%

HPLC (C4, 40min) : tr = 12,6min ; P_{HPLC} = 98%

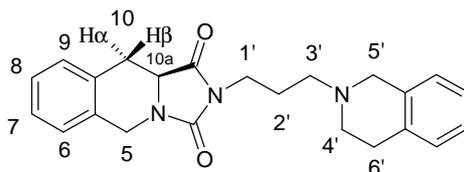
Formule brute: C₂₅H₃₁N₃O₂, **Masse molaire**: 405,54 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 406,3[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 0,89 (d, 6H, H₇, J_{7-6'} = 7Hz); 1,7-1,8 (m, 3H, H_{6'} et H_{2'}); 1,16 (d, 2H, H_{5'}, J_{5'-6'} = 7Hz); 2,39 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 2,68 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 15Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 3,20 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,50 (s, 2H, H_{4'}); 3,55 (t, 2H, H_{1'}, J_{1'-2'} = 7Hz); 3,99 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 4,38 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 4,99 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 7,1-7,3 (m, 9H, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 21,0 (C_{7'}); 25,8 (C_{2'}); 26,5 (C_{6'}); 31,0 (C₁₀); 37,4 (C_{1'}); 41,7 (C₅); 51,4 (C_{3'}); 54,7 (C_{10a}); 59,2 (C_{4'}); 62,7 (C_{5'}); 126,8-127,3-127,5-128,2-129,0-129,6 (C_{aro})

2.4. Evaluation du petit groupement sur l'azote protonable

(S)-2-[3-(3,4-dihydro-1H-isoquinoléin-2-yl)propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (**68**)



Le composé **40** (1,26mmol, 382mg) est dissout dans un mélange acétone/HCl à 37% :18/2mL. La réaction est agitée 1h à T.A.. Le solvant est évaporé, le résidu repris dans 20mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec 2x10mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃ puis séchée sur MgSO₄. L'aldéhyde ainsi obtenu quantitativement est utilisé sans purification. Celui-ci (1,1eq, 329mg) est dissout dans 30mL de CH₂Cl₂. La tétrahydroisoquinoléine (1,15mmol, 0,152mL) est ajoutée et le milieu est agité 15min à T.A.. Puis le NaBH(OAc)₃ (5eq, 1,22g) et l'acide acétique glacial (1eq, 0,067mL) sont ajoutés. Le milieu est agité 1 nuit à T.A.. 30mL de solution aqueuse de NaHCO₃ 1M sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite par 3x30mL CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par 2 chromatographies sur plaques de silice, éluant CH₂Cl₂/MeOH : 95/5 et CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH : 7,2/2/0,8. Le produit est obtenu sous forme d'huile (168mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 39%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1) $R_f = 0,7$

HPLC (TSK gel, 10min) : $t_r = 4,5\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 95\%$

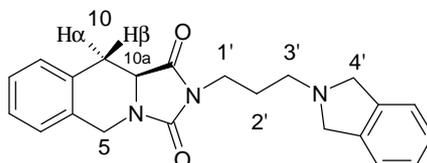
HPLC (C4, 40min) : $t_r = 16,5\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 95\%$

Formule brute: $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$, **Masse molaire**: $375,47\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF** : $376,2 [\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,94 (quint, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J_{2'-1'} = J_{2'-3'} = 7\text{Hz}$); 2,5-2,6 (m, 4H, $\text{H}_{3'}$ et $\text{H}_{6'}$); 2,66 (dd, 1H, $\text{H}_{10\alpha}$, $^2J = 16\text{Hz}$, $J_{10\alpha-10a} = 12\text{Hz}$); 2,8-2,9 (m, 2H, $\text{H}_{4'}$) ; 3,16 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 16\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$); 3,5-3,6 (m, 2H, $\text{H}_{5'}$); 3,6-3,7 (m, 2H, $\text{H}_{1'}$, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$); 3,94 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$); 4,30 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$) ; 4,98 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$) ; 7,0-7,3 (m, 8H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 25,1 ($\text{C}_{2'}$) ; 28,9 ($\text{C}_{6'}$) ; 30,5 (C_{10}) ; 37,4 ($\text{C}_{1'}$) ; 41,4 (C_5) ; 50,8 ($\text{C}_{4'}$) 54,4 (C_{10a}) ; 55,7 ($\text{C}_{5'}$) ; 55,9 ($\text{C}_{3'}$) ; 125,4-129,3 (C_{aro})

(S)-2-[3-(1,3-dihydroisoindol-2-yl)propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (69)



Le composé **40** (1,02mmol, 308mg) est dissout dans un mélange acétone/HCl à 37% :18/2mL. La réaction est agitée 1h à T.A.. Le solvant est évaporé, le résidu repris dans 20mL de CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec 2x10mL de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 puis séchée sur MgSO_4 . L'aldéhyde ainsi obtenu quantitativement est utilisé sans purification. Celui-ci (1,1eq, 264mg) est dissout dans 20mL de CH_2Cl_2 . L'isoindoline (0,93mmol, 0,176mL) est ajoutée et le milieu agité 15min à T.A.. Puis le $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (5eq, 985mg) et l'acide acétique glacial (1eq, 0,054mL) sont ajoutés. Le milieu est agité 1 nuit à T.A.. 30mL de solution aqueuse de NaHCO_3 1M sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite par 2x20mL CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par flash chromatographie éluant AcOEt/PET : 3/7 suivie par une chromatographie sur plaques de silice éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5. Le produit est obtenu sous forme d'huile (67mg).

Aspect : huile transparente, **Rendement** : 20%

CCM (AcOEt/MeOH : 92/8) $R_f = 0,6$

HPLC (TSK gel, 10min): $t_r = 4,4\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 96\%$

HPLC (C4, 40min): $t_r = 13,1\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 93\%$

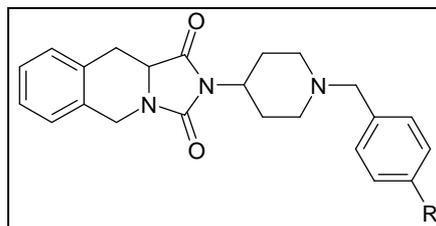
Formule brute: $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$, **Masse molaire**: $361,45\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **MALDI-TOF** : $362,1[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,93 (quint, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7\text{Hz}$); 2,7-2,8 (m, 3H, $\text{H}_{3'}$ et $\text{H}_{10\alpha}$); 3,20 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$); 3,69 (t, 2H, $\text{H}_{1'}$, $J_{1'-2'} = 7\text{Hz}$); 3,91 (s, 4H, $\text{H}_{4'}$); 4,02 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$); 4,36 (d 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$); 4,98 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$) ; 7,1-7,3 (m, 8H, H_{aro})

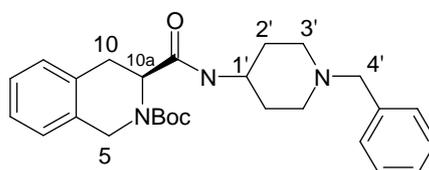
RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 27,1 ($\text{C}_{2'}$) ; 30,6 (C_{10}) ; 37,2 ($\text{C}_{1'}$) ; 41,5 (C_5) ; 53,4 ($\text{C}_{3'}$) ; 54,6 (C_{10a}) ; 58,4 ($\text{C}_{4'}$) ; 122,2-123,0-126,6-126,7-127,1-127,2-127,5-127,9-129,4 (C_{aro})

2.5. Introduction d'un motif pipéridine et pipérazine.

a) Introduction d'un motif pipéridine.



ester *tert*-butylique de l'acide (S)-3-(1-Benzylpipéridin-4-ylcarbamoyl)-3,4-dihydro-1*H*-isoquinoléine-2-carboxylique (70)



Le Boc-D-Tic-OH **50** (5,20mmol, 1,44g) est dissout dans 100mL de CH₂Cl₂. La DIEA (3eq, 2,7mL) est ajoutée. Puis l'HOBt (1,2eq, 843mg), l'HBTU (1,2eq, 2,37g) et la benzylpipéridine (5,20mmol, 2,99mL) sont ajoutés. Le milieu est agité 12h à T.A. sous atmosphère d'azote. La phase organique est lavée avec 3x70mL d'une solution aqueuse de NaHCO₃ 5% et 1x70mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl et séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant CH₂Cl₂/MeOH : 95/5. Le composé est obtenu sous forme d'un solide blanc (1,68g).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 72%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,5

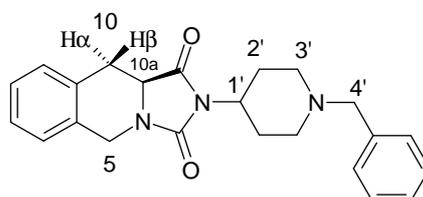
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 2,2min ; P_{HPLC} = 69%

Formule brute: C₂₇H₃₅N₃O₃, **Masse molaire**: 449,60 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 450,3[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,2-1,3 (m, 2H, H_{2'}); 1,46 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,7-1,8 (m, 2H, H_{2'}); 2,0-2,1 (m, 2H, H_{3'}); 2,5-2,6 (m, 2H, H_{3'}); 3,0-3,2 (m, 2H, H₁₀); 3,40 (s, 2H, H_{4'}); 3,6-3,7 (m, 2H, H_{1'}); 4,4-4,6 (m, 3H, H₅ et H_{10a}); 7,2-7,3 (m, 9H, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 28,3 (C(CH₃)₃); 32,0 (C_{2'}); 32,3 (C₁₀); 44,5 (C₅); 45,8 (C_{1'}); 51,9 (C_{3'}); 56,9 (C_{10a}); 63,0 (C_{4'}); 126,1-127,0-127,8-128,2-129,1 (C_{aro})

(S)-2-(1-benzylpipéridin-4-yl)-10,10a-dihydro-5*H*-imidazo[1,5-*b*]isoquinoléine-1,3-dione (71)



Une solution du composé **70** (4,82mmol, 2,17g) dans 10mL d'un mélange CH₂Cl₂/TFA : 6/4 est agitée à T.A. pendant 1h. La réaction est suivie en HPLC. Le solvant est évaporé à l'aide d'une pompe à palette.

Le produit est ensuite dissout dans 50mL de THF. La DIEA (3eq, 2,52mL) est ajoutée et le milieu agité 10min à T.A.. Le CDI (3eq, 2,35g) est ajouté et le milieu est chauffé à reflux une nuit. La réaction est suivie en HPLC. Le solvant est évaporé. Le résidu est ensuite repris dans 100mL d'AcOEt et la phase organique lavée avec 2x50mL d'une solution aqueuse de NaHCO₃ 5% et 1x50mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl et séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par flash chromatographie, éluant AcOEt/Cyclohexane : 3/7. Le composé est obtenu sous forme d'un solide blanc (1,0g).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 55%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 98/2) R_f = 0,5

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,8min ; P_{HPLC} = 98%

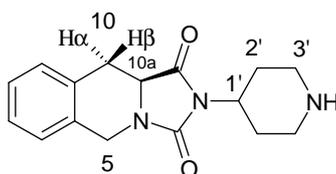
HPLC (C4, 40min) : tr = 11,0min ; P_{HPLC} = 99 %

Formule brute: C₂₃H₂₅N₃O₂, **Masse molaire**: 375,47 g.mol⁻¹, **ES-MS** : 376,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 1,6-1,7 (m, 2H, H_{2eq'}); 2,06 (td, 2H, H_{3ax'}, ²J = J_{3ax'-2ax'} = 12Hz, J_{3ax'-2eq'} = 2Hz); 2,50 (qd, 2H, H_{2ax'}, ²J = J_{2ax'-3ax'} = J_{2ax'-1ax'} = 12Hz, J_{2ax'-3eq'} = 3Hz); 2,81 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 16Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 2,9-3,0 (m, 2H, H_{3eq'}, ²J = 12Hz); 3,24 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,52 (s, 2H, H_{4'}); 3,9-4,0 (m, 2H, H_{1'} et H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 4,39 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz); 4,99 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz); 7,2-7,4 (m, 9H, H_{aro})

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 31,1 (C_{2'}); 33,4 (C₁₀); 44,1 (C₅); 52,6 (C_{1'}); 55,4 (C_{3'}); 56,7 (C_{10a}); 65,2 (C_{4'}); 129,1-129,4-129,7-129,8-130,7-131,5-131,9(C_{aro})

(S)-2-pipéridin-4-yl-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (72)



A une solution du composé **71** (2,64mmol, 990mg) dans 30mL de MeOH, préalablement séché sur tamis moléculaire, sont ajoutés le Pd/C 10% (0,3eq, 84mg) et le formiate d'ammonium (3eq, 499mg). Le milieu est chauffé à reflux sous atmosphère d'azote pendant 5h. Puis il est filtré sur célite et celle-ci lavée avec 200mL de CH₂Cl₂. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par flash chromatographie, éluant CH₂Cl₂/MeOH : 9/1. Le composé est obtenu sous forme d'un solide blanc (746mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 99%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 8/2) R_f = 0,2

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 3,7min ; P_{HPLC} = 90%

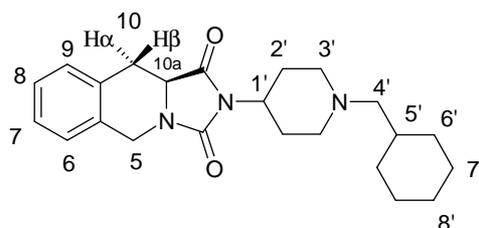
Formule brute: C₁₆H₁₉N₃O₂, **Masse molaire**: 285,36 g.mol⁻¹, **ES-MS** : 286,19[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 1,6-1,7 (m, 2H, H_{2eq'}); 2,2-2,3 (m, 2H, H_{2ax'}, ²J = J_{2ax'-3ax'} = J_{2ax'-1ax'} = 12Hz, J_{2ax'-3eq'} = 2Hz); 2,62 (td, 2H, H_{3ax'}, ²J = J_{3ax'-2ax'} = 12Hz, J_{3ax'-2eq'} = 2Hz); 2,75 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 16Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 3,1-3,2 (m, 2H, H_{3eq'}); 3,18 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,96 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 3,1-4,1 (m,

1H, $H_{1a'}$, $J_{1ax'-2ax'} = 12\text{Hz}$); 4,34 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$); 4,95 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$); 7,1-7,2 (m, 9H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 29,90 ($C_{2'}$); 30,9 (C_{10}); 41,6 (C_5); 46,0 ($C_{3'}$); 49,7 ($C_{1'}$); 54,1 (C_{10a}); 126,6-127,2-127,3-129,4(C_{aro})

(S)-2-(1-(cyclohexylméthyl)pipéridin-4-yl)-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (73)



L'amine **72** (0,55mmol, 157mg) et le cyclohexanecarboxaldéhyde (1,5eq, 0,1mL) sont dissous dans 5mL de CH₂Cl₂. La réaction est agitée 15 min à T.A.. Le NaBH(OAc)₃ (1,5eq, 174mg) est ajouté et le milieu est agité à T.A. une nuit. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 95/5. Le composé est obtenu sous forme d'un solide blanc (122mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 58%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH :96/4) Rf = 0,3

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,9min ; P_{HPLC} = 99%

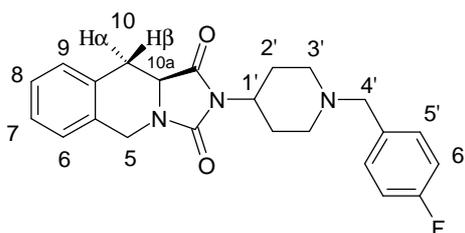
HPLC (C4, 40min) : tr = 11,4min ; P_{HPLC} = 99%

Formule brute: C₂₃H₃₁N₃O₂, **Masse molaire**: 381,52 g.mol⁻¹, **ES-MS** : 382,2[M+H]⁺

RMN ^1H 300MHz (CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 0,8-0,9 (m, 2H, $H_{7'}$, $^2J = J_{7'-6'} = J_{7'-8'} = 12\text{Hz}$); 1,0-1,1 (m, 3H, $H_{6'}$ et $H_{8'}$); 1,4-1,5 (m, 1H, $H_{5'}$); 1,5-1,9 (m, 7H, $H_{2\text{eq}'}$, $H_{6'}$, $H_{7'}$ et $H_{8'}$); 2,0-2,1 (m, 2H, $H_{3\text{ax}'}$); 2,16 (d, 2H, $H_{4'}$, $J_{4'-5'} = 7\text{Hz}$); 2,4-2,6 (qd, 2H, $H_{2\text{ax}'}$, $^2J = J_{2\text{ax}'-1\text{ax}'} = J_{2\text{ax}'-3\text{ax}'} = 12\text{Hz}$, $J_{2\text{ax}'-3\text{eq}'} = 4\text{Hz}$); 2,72 (dd, 1H, $H_{10\alpha}$, $^2J = 16\text{Hz}$, $J_{10\alpha-10a} = 12\text{Hz}$); 2,9-3,1 (m, 2H, $H_{3\text{eq}'}$, $^2J = 12\text{Hz}$); 3,19 (dd, 1H, $H_{10\beta}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$); 3,8-4,0 (m, 1H, $H_{1\text{ax}'}$, $J_{1\text{ax}'-2\text{ax}'} = 12\text{Hz}$); 3,96 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$); 4,33 (d, 1H, H_5 , $^2J = 16\text{Hz}$); 4,94 (d, 1H, H_5 , $^2J = 16\text{Hz}$); 7,1-7,2 (m, 4H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 29,1 ($C_{6'}$); 29,7 ($C_{8'}$); 30,9 ($C_{2'}$); 33,9 (C_{10}); 34,8 ($C_{7'}$); 38,1 ($C_{5'}$); 44,6 ($C_{5'}$); 52,8 ($C_{1'}$); 56,2 ($C_{3'}$); 57,2 (C_{10a}); 67,5 ($C_{4'}$); 129,6-130,2-130,3-132,4 (C_{aro})

(S)-2-[1-(4-fluorobenzyl)pipéridin-4-yl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (74)



L'amine **72** (0,23mmol, 66mg) et le 4-tert-butylbenzaldéhyde (1,5eq, 0,036mL) sont dissous dans 2mL de CH₂Cl₂. La réaction est agitée 15min à T.A.. Le NaBH(OAc)₃ (1,5eq, 72mg) est ajouté et le milieu est agité à T.A. une nuit. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH : 6,5/3/0,5. Le composé est obtenu sous forme d'un solide blanc (53mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 59%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 96/4) R_f = 0,6

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,7min ; P_{HPLC} = 99%

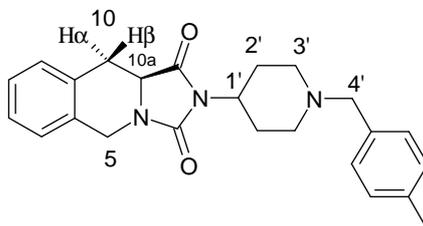
HPLC (C4, 40min) : tr = 21,8min ; P_{HPLC} = 96%

Formule brute: C₂₃H₂₄FN₃O₂, **Masse molaire**: 393,47 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF** : 394,1[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,6-1,7 (m, 2H, H_{2eq'}); 2,04 (td, 2H, H_{3ax'}, ²J = J_{3ax'-2ax'} = 12Hz, J_{3ax'-2eq'} = 2Hz); 2,51 (qd, 2H, H_{2ax'}, ²J = J_{2ax'-3ax'} = J_{2ax'-1ax'} = 12Hz, J_{2ax'-3eq'} = 3Hz); 2,81 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 16Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 2,9-3,0 (m, 2H, H_{3eq'}, ²J = 12Hz); 3,26 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,48 (s, 2H, H_{4'}); 3,9-3,4 (m, 1H, H_{1ax'}, J_{1ax'-2ax'} = 12Hz); 4,01 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10β} = 5Hz, J_{10a-10α} = 12Hz); 4,39 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz); 5,00 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz); 6,9-7,1 (m, 2H, H_{6'}, J_{6'-5'} = 9Hz, J_{6'-6'} = 2Hz); 7,2-7,4 (m, 6H, H_{5'}, H_{9'}, H₆, H₇, H₈ et H₉)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 30,8 (C_{2'}); 33,3 (C₁₀); 43,9 (C₅); 52,3 (C_{1'}); 55,3 (C_{3'}); 56,6 (C_{10a}); 64,2 (C_{4'}); 117,2 (C_{6'}); 129,0-129,6-129,7-131,8-132,7-132,8 (C_{5'}, C_{9'}, C₆, C₇, C₈ et C₉)

(S)-2-[1-(4-méthylbenzyl)pipéridin-4-yl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (75)



L'amine **72** (0,84mmol, 240mg) et le p-tolualdéhyde (1,5eq, 0,15mL) sont dissous dans 2mL de CH₂Cl₂. La réaction est agitée 15min à T.A.. Le NaBH(OAc)₃ (1,5eq, 268mg) est ajouté et le milieu est agité à T.A. une nuit. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 95/5. Le composé est obtenu sous forme d'un solide blanc (121mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 37%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,3

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,8min ; P_{HPLC} = 98%

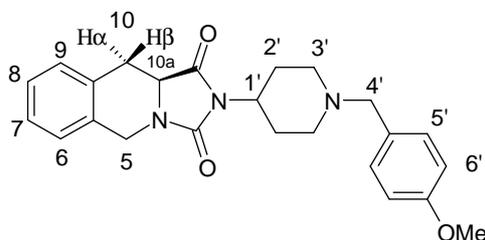
HPLC (C4, 40min) : tr = 3,3min ; P_{HPLC} = 99%

Formule brute: C₂₄H₂₇N₃O₂, **Masse molaire**: 389,50 g.mol⁻¹, **ES-MS** : 390,1[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,6-1,7 (m, 2H, H_{2eq'}, ²J = 12Hz); 2,19 (td, 2H, H_{3ax'}, ²J = J_{3ax'-2ax'} = 12Hz, J_{3ax'-2ex'} = 2Hz); 2,35 (s, 3H, CH₃); 2,59 (qd, 2H, H_{2ax'}, ²J = J_{2ax'-3ax'} = J_{2ax'-1ax'} = 12Hz, J_{2ax'-3eq'} = 3Hz); 2,81 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 16Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 3,0-3,1 (m, 2H, H_{3eq'}, ²J = 12Hz); 3,26 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,50 (s, 2H, H_{4'}); 3,9-4,1 (m, 1H, H_{1ax'}, J_{1ax'-2ax'} = 12Hz); 4,01 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 5,01 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz); 7,1-7,3 (m, 2H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 24,1 (CH_3) ; 30,7 ($\text{C}_{2'}$) ; 33,8 (C_{10}) ; 44,6 (C_5) ; 52,4 ($\text{C}_{1'}$) ; 55,1 ($\text{C}_{3'}$) ; 57,1 (C_{10a}) ; 64,2 ($\text{C}_{4'}$) ; 129,6-130,2-130,3-132,0-132,4-132,5 (C_{aro})

(S)-2-[1-(4-méthoxybenzyl)pipéridin-4-yl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (76)



L'amine **72** (0,16mmol, 46,5mg) et le 4-méthoxybenzaldéhyde (1,5eq, 0,03mL) sont dissous dans 2mL de CH_2Cl_2 . La réaction est agitée 15min à T.A.. Le $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (1,5eq, 51mg) est ajouté et le milieu est agité à T.A. une nuit. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{MeOH}$: 6/3,5/0,5. Le composé est obtenu sous forme d'un solide blanc (22mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement :** 34%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{MeOH}$: 6/3,5/0,5) $R_f = 0,3$

HPLC (TSK gel, 10min) : $t_r = 4,9\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

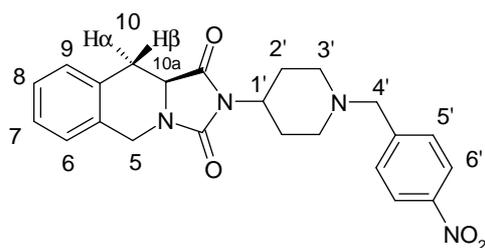
HPLC (C4, 40min) : $t_r = 3,7\text{min}$; $P_{\text{HPLC}} = 99\%$

Formule brute: $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3$, **Masse molaire:** $405,50 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **ES-MS :** $406,2[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,5-1,6 (m, 2H, $\text{H}_{2\text{eq}'}$) ; 1,97 (td, 2H, $\text{H}_{3a'}$, $^2J = J_{3\text{ax}'-2\text{ax}'} = 12\text{Hz}$, $J_{3\text{ax}'-2\text{eq}'} = 2\text{Hz}$) ; 2,44 (qd, 2H, $\text{H}_{2\text{ax}'}$, $^2J = J_{2\text{ax}'-3\text{ax}'} = J_{2\text{ax}'-1\text{ax}'} = 12\text{Hz}$, $^2J = 3\text{Hz}$) ; 2,73 (dd, 1H, $\text{H}_{10\alpha}$, $^2J = 16\text{Hz}$, $J_{10\alpha-10a} = 12\text{Hz}$) ; 2,9-3,0 (m, 2H, $\text{H}_{3\text{eq}'}$, $^2J = 12\text{Hz}$) ; 3,18 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$) ; 3,39 (s, 2H, $\text{H}_{4'}$) ; 3,73 (s, 3H, OCH_3) ; 3,8-4,0 (m, 1H, $\text{H}_{1\text{ax}'}$, $J_{1\text{ax}'-2\text{ax}'} = 12\text{Hz}$) ; 3,93 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$) ; 4,31 (d, 1H, H_5 , $^2J = 16\text{Hz}$) ; 4,93 (d, 1H, H_5 , $^2J = 16\text{Hz}$) ; 6,7-6,8 (m, 2H, $\text{H}_{6'}$, $J_{6'-5'} = 9\text{Hz}$, $J_{6'-6'} = 3\text{Hz}$) ; 7,1-7,2 (m, 6H, H_5 , H_9 , H_6 , H_7 , H_8 et H_9)

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 31,0 ($\text{C}_{2'}$) ; 33,5 (C_{10}) ; 44,1 (C_5) ; 52,6 ($\text{C}_{1'}$) ; 55,3 ($\text{C}_{3'}$) ; 56,7 (C_{10a}) ; 57,8 (OCH_3) ; 64,4 ($\text{C}_{4'}$) ; 116,1 ($\text{C}_{6'}$) ; 129,2-129,7-129,8-131,9-132,7 ($\text{C}_{5'}$, C_9 , C_6 , C_7 , C_8 et C_9)

(S)-2-[1-(4-nitrobenzyl)pipéridin-4-yl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (77)



L'amine **72** (0,81mmol, 231mg) et le 4-nitrobenzaldéhyde (1,5eq, 183mg) sont dissous dans 2mL de CH₂Cl₂. La réaction est agitée 15min à T.A.. Le NaBH(OAc)₃ (1,5eq, 258mg) est ajouté et le milieu est agité à T.A. une nuit. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 98/2. Le composé est obtenu sous forme d'un solide jaune (364mg).

Aspect : solide jaune, **Rendement** : 94%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,5

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,7min ; P_{HPLC} = 98%

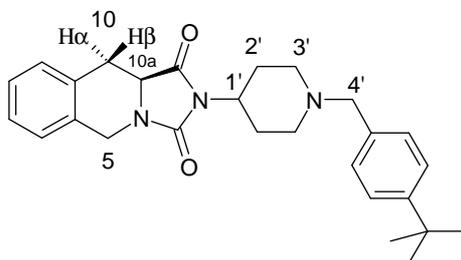
HPLC (C4, 40min) : tr = 10,2min ; P_{HPLC} = 98%

Formule brute: C₂₃H₂₄FN₄O₄, **Masse molaire**: 420,47 g.mol⁻¹, **ES-MS** : 421,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,6-1,7 (m, 2H, H_{2eq}, ²J = 12Hz); 2,14 (td, 2H, H_{3ax}, ²J = 12Hz, ³J_{3ax'-2ax'} = 3Hz); 2,55 (qd, 2H, H_{2ax}, ²J = J_{2ax'-3ax'} = J_{2ax'-1ax'} = 12Hz, ²J_{2ax'-3eq'} = 3Hz); 2,81 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 16Hz, ³J_{10α-10a} = 12Hz); 2,9-3,0 (m, 2H, H_{3eq}, ²J = 12Hz); 3,26 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, ³J_{10β-10a} = 5Hz); 3,62 (s, 2H, H_{4'}); 3,9-4,0 (m, 1H, H_{1ax}, ²J_{1ax'-2ax'} = 12Hz); 4,03 (dd, 1H, H_{10a}, ²J_{10a-10α} = 12Hz, ³J_{10a-10β} = 5Hz); 4,39 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz); 5,00 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz); 7,2-7,3 (m, 4H, H₆, H₇, H₈ et H₉); 7,5-7,6 (d, 2H, H_{6'}, ²J_{5'-6'} = 9Hz); 8,1-8,2 (m, 2H, H_{5'}, ²J_{5'-6'} = 9Hz, ³J_{5'-5'} = 2Hz)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 31,4 (C_{2'}); 33,9 (C₁₀); 44,6 (C₅); 52,6 (C_{1'}); 56,0 (C_{3'}); 57,2 (C_{10a}); 64,6 (C_{4'}); 126,5 (C_{6'}); 129,6-130,2-130,3 (C₆, C₇, C₈ et C₉); 132,4 (C_{5'})

(S)-2-[1-(4-tert-butylbenzyl)pipéridin-4-yl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (78)



L'amine **72** (0,18mmol, 53mg) et le 4-tert-butylbenzaldéhyde (1,5eq, 0,046mL) sont dissous dans 2mL de CH₂Cl₂. La réaction est agitée 15min à T.A.. Le NaBH(OAc)₃ (1,5eq, 59mg) est ajouté et le milieu est agité à T.A. une nuit. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH : 6/3,5/0,5. Le composé est obtenu sous forme d'un solide blanc (23mg).

Aspect : solide blanc, **Rendement** : 28%

CCM (CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH : 6/3,5/0,5) R_f = 0,3

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 6,0min ; P_{HPLC} = 97%

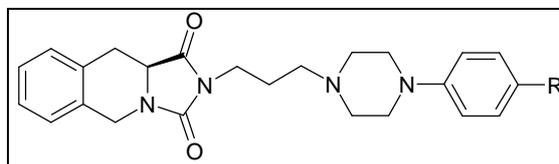
HPLC (C4, 40min) : tr = 13,5min ; P_{HPLC} = 97%

Formule brute: C₂₇H₃₃N₃O₂, **Masse molaire**: 431,58 g.mol⁻¹, **ES-MS** : 432,2[M+H]⁺

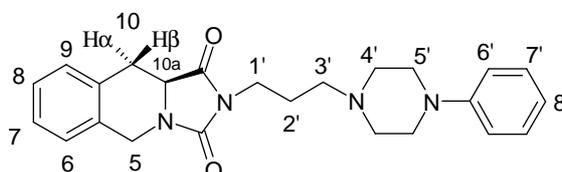
RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,25 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,5-1,6 (m, 2H, H_{2eq}, ²J = 12Hz); 2,0-2,1 (m, 2H, H_{3ax}, ²J = J_{3ax'-2ax'} = 12Hz); 2,45 (qd, 2H, H_{2ax}, ²J = J_{2ax'-3ax'} = J_{2ax'-1ax'} = 12Hz, ²J_{2ax'-3eq'} = 4Hz); 2,73 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 16Hz, ³J_{10α-10a} = 12Hz); 2,9-3,0 (m, 2H, H_{3eq}, ²J = 12Hz); 3,19 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, ³J_{10β-10a} = 5Hz); 3,43 (s, 2H, H_{4'}); 3,9-4,0 (m, 1H, H_{1ax}, ²J_{1ax'-2ax'} = 12Hz); 3,94 (dd, 1H, H_{10a}, ²J_{10a-10α} = 12Hz, ³J_{10a-10β} = 5Hz); 4,32 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz); 4,94 (d, 1H, H₅, ²J = 16Hz); 7,1-7,3 (m, 8H, H_{aro})

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 31,0 ($\text{C}_{2'}$) ; 33,3 (C_{10}) ; 33,7 (CH_3) ; 43,9 (C_5) ; 52,5 ($\text{C}_{1'}$) ; 55,3 ($\text{C}_{3'}$) ; 56,5 (C_{10a}) ; 64,7 ($\text{C}_{4'}$) ; 127,4-129,0-129,5-129,7-131,1-131,8 (C_{aro})

b) Introduction d'un motif pipérazine.



(S)-2-[3-(4-phénylpipérazin-1-yl)propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (79)



Le composé **40** (0,48mmol, 145mg) est dissout dans 20mL d'un mélange acétone/ $\text{HCl}_{37\%}$:18/2. La réaction est agitée 1h à T.A.. Le solvant est évaporé, le résidu repris dans 20mL de CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec 2x10mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 puis séchée sur MgSO_4 . L'aldéhyde ainsi obtenu quantitativement est utilisé sans purification. Celui-ci (1,1eq, 0,48mmol) est dissout dans 15mL de CH_2Cl_2 . La phénylpipérazine (0,44mmol, 0,067mL) est ajoutée et le milieu est agité 15min à T.A.. Puis le $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (5eq, 465mg) et l'acide acétique glacial (1eq, 0,025mL) sont ajoutés. Le milieu est agité 1 nuit à T.A.. 30mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 1M sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite par 2x30mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5. Le composé est obtenu sous forme d'huile (85mg).

Aspect : huile orange, **Rendement :** 44%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5) $R_f = 0,4$

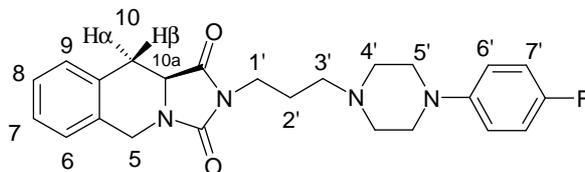
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,9min ; $P_{\text{HPLC}} = 95\%$

HPLC (C4, 40min) : tr = 11,1min ; $P_{\text{HPLC}} = 99\%$

Formule brute: $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2$, **Masse molaire:** 404,52 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **ES-MS :** 405,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,88 (quint, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7\text{Hz}$) ; 2,47 (t, 2H, $\text{H}_{3'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$) ; 2,5-2,6 (m, 4H, $\text{H}_{4'}$, $J_{4'-5'} = 5\text{Hz}$) ; 2,84 (dd, 1H, H_{10a} , $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10a-10a} = 12\text{Hz}$) ; 3,1-3,2 (m, 4H, $\text{H}_{5'}$, $J_{5'-4'} = 5\text{Hz}$) ; 3,27 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$) ; 3,65 (t, 2H, $\text{H}_{1'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$) ; 4,06 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$) ; 4,41 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$) ; 5,02 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$) ; 6,84 (td, 1H, $\text{H}_{8'}$, $J_{8'-7'} = 7\text{Hz}$, $J_{8'-6'} = 1\text{Hz}$) ; 6,90 (td, 2H, $\text{H}_{6'}$, $J_{6'-7'} = 7\text{Hz}$, $J_{6'-8'} = J_{6'-6'} = 1\text{Hz}$) ; 7,2-7,3 (m, 6H, $\text{H}_{7'}$, H_6 , H_7 , H_8 et H_9)

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 27,7 ($\text{C}_{2'}$) ; 33,3 (C_{10}) ; 39,7 ($\text{C}_{1'}$) ; 44,0 (C_5) ; 51,5 ($\text{C}_{5'}$) ; 55,5 ($\text{C}_{4'}$) ; 57,0 (C_{10a}) ; 58,2 ($\text{C}_{3'}$) ; 118,3 ($\text{C}_{6'}$) ; 122,0 ($\text{C}_{8'}$) ; 129,0-129,6-129,7-131,4-131,8 (C_{aro})

(S)-2-[3-[4-(4-fluorophényl) pipérazin-1-yl]propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (80)

Le composé **40** (0,38mmol, 115mg) est dissout dans un mélange acétone- $\text{HCl}_{37\%}$:18/2mL. La réaction est agitée 1h à T.A.. Le solvant est évaporé, le résidu repris dans 20mL de CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec 2x10mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 puis séchée sur MgSO_4 . L'aldéhyde ainsi obtenu quantitativement est utilisé sans purification. Celui-ci (1,1eq, 0,38mmol) est dissout dans 16mL CH_2Cl_2 . 1-(4-fluorophényl)pipérazine (0,34mmol, 62mg) est ajoutée et le milieu est agité 15min à T.A.. Puis le $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (5eq, 366mg) et l'acide acétique glacial (1eq, 0,021mL) sont ajoutés. Le milieu est agité 1 nuit à T.A.. 30mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 1M sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite par 2x30mL CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO_4 . Le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5. Le composé est obtenu sous forme d'huile (29mg).

Aspect : huile jaune, **Rendement** : 20%

CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5) $R_f = 0,4$

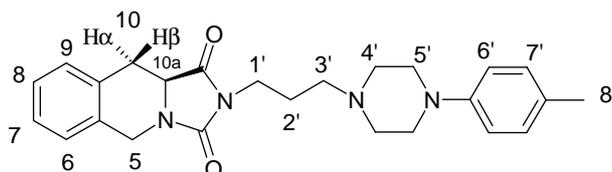
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,9min ; $P_{\text{HPLC}} = 99\%$

HPLC (C4, 40min) : tr = 22,4min ; $P_{\text{HPLC}} = 95\%$

Formule brute: $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{FN}_4\text{O}_2$, **Masse molaire**: $422,51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, **ES-MS**: $423,2[\text{M}+\text{H}]^+$

RMN ^1H 300MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 1,83 (quint, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7\text{Hz}$); 2,42 (t, 2H, $\text{H}_{3'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 2,5-2,6 (m, 4H, $\text{H}_{4'}$, $J_{4'-5'} = 5\text{Hz}$); 2,78 (dd, 1H, $\text{H}_{10\alpha}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\alpha-10a} = 12\text{Hz}$); 3,0-3,1 (m, 4H, $\text{H}_{5'}$, $J_{5'-4'} = 5\text{Hz}$); 3,20 (dd, 1H, $\text{H}_{10\beta}$, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta-10a} = 5\text{Hz}$); 3,59 (t, 2H, $\text{H}_{1'}$, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 4,03 (dd, 1H, H_{10a} , $J_{10a-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10a-10\beta} = 5\text{Hz}$); 4,43 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$); 4,97 (d, 1H, H_5 , $^2J = 17\text{Hz}$); 6,7-6,9 (m, 4H, $\text{H}_{7'}$ et $\text{H}_{6'}$); 7,1-7,2 (m, 4H, H_6 , H_7 , H_8 et H_9)

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 27,7 ($\text{C}_{2'}$); 33,3 (C_{10}); 39,7 ($\text{C}_{1'}$); 44,0 (C_5); 51,5 ($\text{C}_{5'}$); 55,5 ($\text{C}_{4'}$); 57,0 (C_{10a}); 58,2 ($\text{C}_{3'}$); 118,3 ($\text{C}_{6'}$); 122,0 ($\text{C}_{8'}$); 129,0-129,6-129,7-131,4-131,8 (C_{aro})

(S)-2-[3-(4-p-tolyl)pipérazin-1-yl]propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (81)

Le composé **40** (0,48mmol, 145mg) est dissout dans un mélange acétone- $\text{HCl}_{37\%}$:18/2mL. La réaction est agitée 1h à T.A.. Le solvant est évaporé, le résidu repris dans 20mL de CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec 2x10mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 puis séchée sur MgSO_4 . L'aldéhyde ainsi obtenu quantitativement est utilisé sans purification.

Celui-ci (1,1eq, 0,48mmol) est dissout dans 15mL CH₂Cl₂. La 1-(4-méthylphényl)pipérazine (0,44mmol, 77mg) est ajoutée et le milieu est agité 15min à T.A.. Puis le NaBH(OAc)₃ (5eq, 462mg) et l'acide acétique glacial (1eq, 0,025mL) sont ajoutés. Le milieu est agité 1 nuit à T.A.. 30mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ 1M sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite par 2x30mL CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 95/5. Le composé est obtenu sous forme d'un solide jaune (110mg).

Aspect : solide jaune, **Rendement** : 60%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) Rf = 0,4

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 5,1min ; P_{HPLC} = 98%

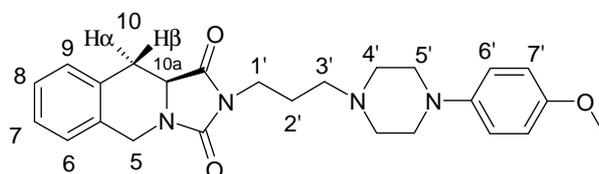
HPLC (C4, 40min) : tr = 11,1 min ; P_{HPLC} = 96%

Formule brute: C₂₅H₃₀N₄O₂, **Masse molaire**: 418,54g.mol⁻¹, **ES-MS**: 19,2[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 1,88 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz); 2,25 (s, 3H, H_{8'}); 2,47 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 2,5-2,6 (m, 4H, H_{4'}, J_{4'-5'} = 5Hz); 2,84 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 15Hz, J_{10α-10a} = 12Hz); 3,1-3,2 (m, 4H, H_{5'}, J_{5'-4'} = 5Hz); 3,27 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 5Hz); 3,65 (t, 2H, H_{1'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 4,06 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10α} = 12Hz, J_{10a-10β} = 5Hz); 4,41 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 5,02 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 6,82 (dt, 2H, H_{8'}, J_{7'-6'} = 9Hz, J_{7'-7'} = 2Hz) ; 6,90 (dt, 2H, H_{6'}, J_{6'-7'} = 9Hz, J_{6'-6'} = 2Hz) ; 7,2-7,3 (m, 4H, H₆, H₇, H₈ et H₉)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), **δ(ppm)** : 20,7 (C_{8'}); 25,6 (C_{2'}); 31,2 (C₁₀); 37,6 (C_{1'}); 41,9 (C₅); 50,1 (C_{5'}); 53,5 (C_{4'}); 55,0 (C_{10a}); 56,1 (C_{3'}); 118,3 (C_{6'}); 1116,7 (C_{6'}); 126,9-127,6-127,7-129,8-129,9 (C_{aro})

(S)-2-{3-[4-(4-méthoxyphényl)pipérazin-1-yl]propyl}-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (82)



Le composé **40** (0,39mmol, 120mg) est dissout dans un mélange acétone-HCl_{37%} : 13,5/1,5mL. La réaction est agitée 1h à T.A.. Le solvant est évaporé, le résidu repris dans 20mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec 2x10mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ puis séchée sur MgSO₄. L'aldéhyde ainsi obtenu quantitativement est utilisé sans purification. Celui-ci (1,1eq, 0,39mmol) est dissout dans 15mL CH₂Cl₂. La 1-(4-méthoxyphényl)pipérazine (0,36mmol, 69mg) est ajoutée et le milieu agité 15min à T.A.. Puis le NaBH(OAc)₃ (5eq, 383mg) et l'acide acétique glacial (1eq, 0,021mL) sont ajoutés. Le milieu est agité 1 nuit à T.A.. 30mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ 1M sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite par 2x30mL CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé, le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 95/5. Le composé est obtenu sous forme de solide orange (8mg).

Aspect : solide orange, **Rendement** : 5%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) Rf = 0,4

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,8 min ; P_{HPLC} = 99%

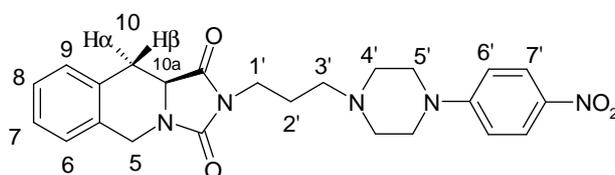
HPLC (C4, 40min) : tr = 21,9 min ; P_{HPLC} = 99%

Formule brute: C₂₅H₃₀N₄O₃, **Masse molaire**: 434,54g.mol⁻¹, **ES-MS** : 435,2[M+H]⁺

RMN ^1H 300MHz (CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 1,83 (quint, 2H, H_{2'}, $J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7\text{Hz}$); 2,43 (t, 2H, H_{3'}, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 2,5-2,6 (m, 4H, H_{4'}, $J_{4'-5'} = 5\text{Hz}$); 2,78 (dd, 1H, H_{10 α '}, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\alpha'-10\alpha} = 12\text{Hz}$); 3,0-3,1 (m, 4H, H_{5'}, $J_{5'-4'} = 5\text{Hz}$); 3,22 (dd, 1H, H_{10 β '}, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta'-10\alpha} = 5\text{Hz}$); 3,59 (t, 2H, H_{1'}, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 3,69 (s, 3H, OMe); 4,02 (dd, 1H, H_{10 α '}, $J_{10\alpha'-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10\alpha'-10\beta} = 5\text{Hz}$); 4,36 (d, 1H, H₅, $^2J = 17\text{Hz}$); 4,97 (d, 1H, H₅, $^2J = 17\text{Hz}$); 6,7-6,8 (m, 4H, H_{6'} et H_{7'}, $J_{7'-6'} = J_{6'-7'} = 9\text{Hz}$, $J_{7'-7'} = J_{6'-6'} = 2\text{Hz}$); 7,1-7,2 (m, 6H, H₆, H₇, H₈ et H₉)

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 25,2 (C_{2'}); 30,9 (C₁₀); 37,2 (C_{1'}); 41,6 (C₅); 50,5 (C_{5'}); 53,2 (C_{4'}); 54,7 (C_{10 α '}); 55,5 (C_{OMe}); 55,6 (C_{3'}); 114,4-118,2 (C_{6'} et C_{7'}); 126,7-127,2-127,4-129,4 (C_{aro})

(S)-2-[3-[4-(4-nitrophényl)pipérazin-1-yl]propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (83)



Le composé **40** (0,54mmol, 163mg) est dissout dans un mélange acétone-HCl_{37%} :18/2mL. La réaction est agitée 1h à T.A.. Le solvant est évaporé, le résidu repris dans 20mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec 2x10mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ puis séchée sur MgSO₄. L'aldéhyde ainsi obtenu quantitativement est utilisé sans purification. Celui-ci (1,1eq, 0,54mmol) est dissout dans 20mL CH₂Cl₂. La nitrophénylpipérazine (0,49mmol, 101mg) est ajoutée et le milieu est agité 15min à T.A.. Puis le NaBH(OAc)₃ (5eq, 518mg) et l'acide acétique glacial (1eq, 0,028mL) sont ajoutés. Le milieu est agité 1 nuit à T.A.. 30mL d'une solution aqueuse de NaHCO₃ 1M sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite par 2x30mL CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 95/5. Le composé est obtenu sous forme d'un solide orange (85mg).

Aspect : solide orange, **Rendement :** 35%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,5

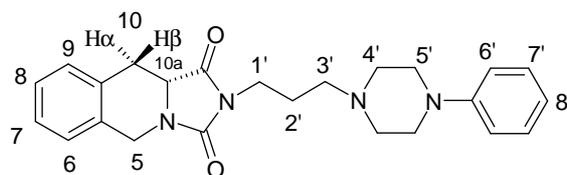
HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,9 min ; P_{HPLC} = 98%

HPLC (C₄, 40min) : tr=11,1 min ; P_{HPLC} = 99%

Formule brute: C₂₄H₂₇N₅O₄, **Masse molaire:** 449,51 g.mol⁻¹, **MALDI-TOF :** 450,1[M+H]⁺

RMN ^1H 300MHz (CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 1,88 (quint, 2H, H_{2'}, $J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7\text{Hz}$); 2,49 (t, 2H, H_{3'}, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 2,5-2,6 (m, 4H, H_{4'}, $J_{4'-5'} = 5\text{Hz}$); 2,84 (dd, 1H, H_{10 α '}, $J_{10\alpha'-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $^2J = 15\text{Hz}$); 3,28 (dd, 1H, H_{10 β '}, $^2J = 15\text{Hz}$, $J_{10\beta'-10\alpha} = 5\text{Hz}$); 3,3-3,4 (m, 4H, H_{5'}, $J_{5'-4'} = 5\text{Hz}$); 3,66 (t, 2H, H_{1'}, $J_{3'-2'} = 7\text{Hz}$); 4,09 (dd, 1H, H_{10 α '}, $J_{10\alpha'-10\alpha} = 12\text{Hz}$, $J_{10\alpha'-10\beta} = 5\text{Hz}$); 4,42 (d, 1H, H₅, $^2J = 17\text{Hz}$); 5,02 (d, 1H, H₅, $^2J = 17\text{Hz}$); 6,7-6,8 (m, 2H, H_{6'}, $J_{6'-7'} = 9\text{Hz}$, $J_{6'-6'} = 2\text{Hz}$); 7,2-7,3 (m, 4H, H₆, H₇, H₈ et H₉); 8,0-8,1 (m, 2H, H_{7'}, $J_{7'-6'} = 9\text{Hz}$; $J_{7'-7'} = 2\text{Hz}$);

RMN ^{13}C 75MHz (CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 28,1 (C_{2'}); 33,8 (C₁₀); 40,0 (C_{1'}); 44,6 (C₅); 49,9 (C_{5'}); 55,4 (C_{4'}); 57,7 (C_{10 α '}); 58,4 (C_{3'}); 115,6 (C_{6'}); 128,9 (C_{7'}); 129,9-129,7-130,3-130,4-132,8 (C_{aro})

(R)-2-[3-(4-phénylpipérazin-1-yl)propyl]-10,10a-dihydro-5H-imidazo[1,5-b]isoquinoléine-1,3-dione (84)

Le composé **40** (0,54mmol, 163mg) est dissout dans 20mL d'un mélange acétone/HCl_{37%} :18/2. La réaction est agitée 1h à T.A.. Le solvant est évaporé, le résidu repris dans 20mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec 2x10mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ puis séchée sur MgSO₄. L'aldéhyde ainsi obtenu quantitativement est utilisé sans purification. Celui-ci (1,1eq, 0,54mmol) est dissout dans 15mL de CH₂Cl₂. La phénylpipérazine (0,49mmol, 0,074mL) est ajoutée et le milieu est agité 15min à T.A.. Puis le NaBH(OAc)₃ (5eq, 518mg) et l'acide acétique glacial (1eq, 0,028mL) sont ajoutés. Le milieu est agité 1 nuit à T.A.. 30mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ 1M sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite par 2x30mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur plaques de silice, éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 95/5. Le composé est obtenu sous forme d'huile (42mg).

Aspect : huile orange, **Rendement** : 19%

CCM (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) R_f = 0,4

HPLC (TSK gel, 10min) : tr = 4,9min ; P_{HPLC} = 99%

HPLC (C4, 40min) : tr = 11,1min ; P_{HPLC} = 99%

Formule brute: C₂₄H₂₈N₄O₂, **Masse molaire**: 404,52 g.mol⁻¹, **ES-MS** : 405,5[M+H]⁺

RMN ¹H 300MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 1,88 (quint, 2H, H_{2'}, J_{2'-3'} = J_{2'-1'} = 7Hz); 2,47 (t, 2H, H_{3'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 2,5-2,6 (m, 4H, H_{4'}, J_{4'-5'} = 5Hz); 2,84 (dd, 1H, H_{10β}, ²J = 15Hz, J_{10β-10a} = 12Hz); 3,1-3,2 (m, 4H, H_{5'}, J_{5'-4'} = 5Hz); 3,27 (dd, 1H, H_{10α}, ²J = 15Hz, J_{10α-10a} = 5Hz); 3,65 (t, 2H, H_{1'}, J_{3'-2'} = 7Hz); 4,06 (dd, 1H, H_{10a}, J_{10a-10β} = 12Hz, J_{10a-10α} = 5Hz); 4,41 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 5,02 (d, 1H, H₅, ²J = 17Hz); 6,84 (td, 1H, H_{8'}, J_{8'-7'} = 7Hz, J_{8'-6'} = 1Hz); 6,90 (td, 2H, H_{6'}, J_{6'-7'} = 7Hz, J_{6'-8'} = J_{6'-6'} = 1Hz); 7,2-7,3 (m, 6H, H_{7'}, H₆, H₇, H₈ et H₉)

RMN ¹³C 75MHz (CDCl₃), δ(ppm) : 27,7 (C_{2'}); 33,3 (C₁₀); 39,7 (C_{1'}); 44,0 (C₅); 51,5 (C_{5'}); 55,5 (C_{4'}); 57,0 (C_{10a}); 58,2 (C_{3'}); 118,3 (C_{6'}); 122,0 (C_{8'}); 129,0-129,6-129,7-131,4-131,8 (C_{aro})

III. Affinités

Les essais de binding ont été réalisés par la société CEREP, d'après une procédure décrite par Ganapathy *et al*¹⁶⁸ pour la protéine σ_1 et Bowen *et al*¹⁶⁹ pour la protéine σ_2 .

Affinité envers la protéine σ_1

Les membranes de cellule Jurkat sont incubées (10-20mg de protéine par tube) en présence de la [³H](+)-pentazocine (8nM) et une gamme de concentration des composés testés, pendant 2h, à 22°C, dans 5mM de tampon Tris/HCl (pH=7,4). La radioactivité est ensuite déterminée par scintillation.

Affinité envers la protéine σ_2

Les membranes de cortex cérébral de rat sont incubées (10-20mg de protéine par tube) avec le [³H](+)-DTG (5nM) et en présence de [³H](+)-pentazocine (300nM) pour saturer les sites σ_1 et une gamme de concentration des composés testés, pendant 2h, à 22°C, dans 5mM de tampon Tris/HCl (pH=7,4). La radioactivité est ensuite déterminée par scintillation.

¹⁶⁸ Ganapathy, M. E. ; Prasad, P. D. ; Huang, W. ; Seth, P. ; Leibach, F. H. ; Ganapathy, V. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 289, 251-260. Molecular and ligand-binding characterization of the sigma-receptor in the Jurkat human T lymphocyte cell line.

¹⁶⁹ Bowen, W. D.; de Costa, B. R.; Hellewell, S. B.; Walker, M.; Rice, K. C. *Mol. Neuropharmacol.* **1993**, 3, 117-126. [³H](+)-pentazocine: a potent and highly selective benzomorphan-based probe for sigma₁ receptors.

IV. Tests comportementaux

Animaux et molécules

Des souris males Swiss pesant de 28 à 32g sont utilisées pour réaliser les expériences. La cocaïne provient de la société Cooper et l'antagoniste BD-1047 de Tocris. Les produits sont administrés de façon intrapéritonéale (i.p.) avec un volume de 100 μ L pour un poids équivalent à 20g.

1. Test de locomotion

Les animaux sont placés dans une cage acrylique transparente pendant 40min. Puis ils sont traités avec différentes doses de cocaïne et/ou de composés. La cage est insérée dans un appareil d'actimétrie (Opto-varimex, Columbus Inst.). L'activité locomotrice, calculée grâce au nombre de rayons infrarouges coupés, est mesurée toutes les 10min pendant 40min.

2. Test de conditionnement de préférence de place

2.1. Procédure du conditionnement de préférence de place

L'appareil est constitué d'une boîte en PVC divisée en 2 compartiments de même taille (15/15/35cm). Le premier compartiment possède les murs et le sol noirs, le deuxième blancs. Chaque compartiment présente un sol de différentes textures, lisse pour le noir et grillageux pour le blanc. Une lampe de 60W éclaire le compartiment blanc pendant toute l'expérience. Une porte guillotine sépare les 2 compartiments. La procédure comprend 3 phases différentes: le pré-conditionnement (jour 1), le conditionnement (jour 2 à 5) et le post-conditionnement (jour 6). Pour la phase de pré-conditionnement, chaque souris est placée dans le compartiment blanc pendant 5s, la porte guillotine est ouverte et l'animal est libre de parcourir l'appareil pendant 10min. La phase de pré-conditionnement est répétée après 6h. L'exploration est filmée et le temps passé dans chaque compartiment est déterminé dans le but d'obtenir la préférence de place spontanée. Les animaux montrant une forte préférence de place spontanée (>570s) sont écartés. Le conditionnement de préférence de place se réalise par une procédure impartiale. Dans chaque groupe d'expérience, la moitié des animaux reçoit la cocaïne et/ou le composé dans le compartiment de préférence spontanée et l'autre moitié dans l'autre compartiment. Immédiatement après l'injection, chaque souris est confinée dans le compartiment associé à la drogue. Après 6h, elle reçoit une solution saline et elle est

confinée dans l'autre compartiment pendant 30min. Pendant la phase de post-conditionnement, chaque souris est encore placée dans le compartiment blanc pendant 5s. La porte est ouverte et elle est libre de parcourir les 2 compartiments pendant 10min. L'expérience est filmée, le temps passé dans chaque compartiment est déterminé. Le score conditionné représente la différence de temps passé dans le compartiment associé à la drogue entre les séances de post et de pré-conditionnement.

2.2. Procédure d'extinction et de réactivation du CPP

Aux jours 8-11, chaque animal reçoit une dose de solution saline et il est confiné dans le compartiment associé à la drogue pendant 30min. Après 6h, il reçoit encore une dose de solution saline mais cette fois l'animal est confiné dans l'autre compartiment pendant 30min. Au jour 12, l'extinction est mesurée par une exploration libre de 10min, de la même manière que pour la session de post-conditionnement. Le score conditionné représente la différence de temps passé dans le compartiment associé à la drogue entre l'extinction et la session de pré-conditionnement. La réactivation du CPP est mesurée 3 jours après la session d'extinction, au jour 15. Les animaux reçoivent une dose soit une dose de cocaïne (15mg/kg) soit une dose de composé **10** (1, 3, 10mg/kg) et sont placés directement dans le compartiment blanc. Le BD-1047 (10mg/kg) est administré 10min avant la cocaïne ou le composé **10** ou avant le placement dans le compartiment blanc. Après 5s, la porte est ouverte et l'animal peut parcourir librement la boîte pendant 10min. Le score conditionné est représenté par la différence de temps passé dans le compartiment associé à la drogue entre la réactivation et la session de pré-conditionnement.

3. Test de l'évitement passif

L'appareil se compose d'une cage transparente (30x30x40cm) avec un sol grillageux. Une lampe de 15W éclaire la cage pendant l'expérience. Une plateforme en bois (4x4x4cm) est placée au centre du sol grillageux. Un choc électrique de 35V peut être délivré au niveau de ce sol.

La dépendance d'état est mesurée chez l'animal par des sessions d'entraînements répétitifs. L'animal reçoit une injection de produit en i.p. (cocaïne 0,1, 0,3mg/kg, composé **10** 0,3mg/kg ou cocaïne 0,1, 0,3mg/kg + composé **10** 0,3mg/kg) 15min avant le premier entraînement. Pendant la session d'entraînement chaque souris est placée sur la plateforme. Quand elle descend et place ses 4 pattes sur la grille, un choc électrique (35V) est délivré pendant 15s. Le temps de latence (temps passé sur la plateforme avant de descendre) est

mesuré. Les sessions d'entraînements se réalisent avec un intervalle de temps de 5min. Le nombre de session pour atteindre le critère (rester sur la plateforme plus de 60s) est déterminé. Ce nombre est considéré comme un index de qualité de l'acquisition de la mémoire. L'animal qui n'atteint pas le critère au bout de 10 sessions est écarté.

La session de rétention est réalisée 24h après, de la même manière que l'entraînement sauf qu'aucun choc électrique n'est délivré. Chaque souris reçoit, 15min avant, une injection de cocaïne, solution saline ou le composé **10** avec la même dose que précédemment. Elles sont ensuite placées sur la plateforme et le temps de latence est mesuré avec un temps maximal de 300s.

Deux mesures paramétriques sont mesurées lors de la rétention.

- Le temps de latence exprimé par la médiane et l'écart interquartile (25% et 75%).
- Le ratio de latence représenté par le temps de latence pendant la session de rétention sur le temps de latence lors de la dernière session avant d'atteindre le critère. Le ratio est transformé en logarithme.

Synthèse et évaluation de dérivés de tétrahydroisoquinoléine-hydantoïne comme ligands sélectifs sigma 1

Les récepteurs sigma ont été décrits par Martin *et al.* en 1976. Il existe deux sous-types : σ_1 et σ_2 . La protéine σ_1 est surtout concentrée dans le système nerveux central. Elle est décrite pour moduler la transmission des neurotransmetteurs comme la noradrénaline, la dopamine, la sérotonine, l'acétylcholine, le glutamate régulant le fonctionnement des récepteurs NMDA et des récepteurs aux opiacés. Par cette modulation, elle serait impliquée dans certaines fonctions ou troubles comme la nociception, la dépendance à la cocaïne, les troubles mnésiques, la schizophrénie, la dépression, l'anxiété, l'épilepsie et permettrait des effets neuroprotecteurs. De plus, la protéine σ_1 serait surexprimée dans les cellules tumorales, résultant une implication possible dans le traitement du cancer.

Des études, préalablement réalisées au laboratoire, ont mis en évidence l'affinité de composés à structure tétrahydroisoquinoléine-hydantoïne (Tic-hydantoïne) pour les récepteurs σ_1 . A partir de pharmacomodulations effectuées précédemment au laboratoire et basé sur le modèle d'Ablordeppey et Glennon, un composé présentant une bonne affinité pour σ_1 , une bonne sélectivité et une faible toxicité, avait été découvert.

L'objectif du projet a été de poursuivre cette pharmacomodulation autour de ce hit pour augmenter l'affinité et la sélectivité vis-à-vis de σ_1 et d'étudier les relations structure-activité. Des études ont été réalisées d'une part sur la structure Tic-hydantoïne tout en gardant la chaîne latérale intacte et d'autre part sur la chaîne latérale tout en gardant la structure Tic-hydantoïne. La stéréochimie du carbone asymétrique et le remplacement de l'hydantoïne par une thiohydantoïne ont d'abord été évalués. D'autres pharmacomodulations ont ensuite été réalisées autour du noyau Tic-hydantoïne. Notamment, en étudiant l'impact au niveau de l'affinité sur σ_1 , d'une ouverture du cycle quinoléine, d'un remplacement de ce noyau par une pyridine ou une tétraline, de la modification de la liaison entre l'hydantoïne et la quinoléine et de la fonctionnalisation de la quinoléine. Au niveau de la chaîne latérale, nous avons évalué l'importance d'une fonctionnalisation du noyau aromatique, du petit substituant aliphatique de l'atome d'azote protonable et enfin l'importance d'une rigidification de la chaîne latérale.

Enfin, les affinités envers σ_1 et parfois envers σ_2 de la plupart de nos composés ont été testées. Nous avons évalué l'action de nos molécules les plus affines sur les effets induits par la cocaïne, par des tests comportementaux : le test de locomotion, le test de conditionnement de préférence de place et le test de l'évitement passif. L'ensemble de ces résultats montre que deux composés testés présentent un profil de type agoniste σ_1 . Le plus efficace des deux facilite les effets psychostimulants et appétants de la cocaïne, sans avoir d'effet injecté seul. Il présente, chez la souris, un profil pharmacologique idéal pour être évalué dans une nouvelle thérapie agoniste. De plus, les tests ADME sur ce composé révèle des propriétés d'un futur candidat médicament.

Synthesis and evaluation of tetrahydroquinoline-hydantoin derivatives as sigma 1 receptor selective ligands.

The sigma receptors were described by Martin and co-workers in 1976. There are two subtypes : σ_1 and σ_2 . σ_1 proteins are concentrated in the central nervous system. It is well known that they modulate the transmission of neurotransmitters such as norepinephrine, dopamine, serotonin, acetylcholine, and glutamate as well as the activity of opiate receptors. Consequently, they are associated with some functions or disorders, the origin of which is a dysregulation of these neurotransmitters. Therefore, they affect certain functions such as nociception, cocaine addiction, mnesic disorder, schizophrenia, depression, anxiety, epilepsy and are implicated in neuroprotection. Furthermore, σ_1 proteins are overexpressed in tumoral cells, which makes them a possible target in cancer treatment.

Previous studies in our laboratory evidenced the affinity of compounds containing the tetrahydroisoquinoline-hydantoin structure (Tic-hydantoin) toward σ_1 receptors. Based on previous pharmacomodulations and the model of Ablordeppey and Glennon, a compound presenting a good affinity for σ_1 , a good selectivity and a weak toxicity, had been discovered.

The purpose of the project was to continue the pharmacomodulation studies around this hit, in order to increase the affinity and the selectivity towards σ_1 but also to study the structure-activity relationships of our hit compound. On the one hand, studies were carried out on the Tic-hydantoin structure while keeping the side chain intact. On the other hand modifications were applied to the side chain while retaining the native Tic-hydantoin structure. The stereochemistry of the asymmetric carbon and the replacement of the hydantoin by a thiohydantoin were evaluated at first. Other pharmacomodulations were then realized around the Tic-hydantoin core. Notably, by studying the impact on the affinity towards sigma 1, of an opening of the quinoline ring, of the substitution of this core by a pyridine or a tetraline, of the modification of the connection between the hydantoin and the quinoline and of a functionalisation of the quinoline. Regarding the side chain, we estimated the importance of a functionalisation of the aromatic ring, the small group on the nitrogen and finally the importance of a stiffening of the side chain.

Finally, most of our compounds were evaluated on σ_1 and σ_2 . We studied the action of the best-binding molecules on cocaine-induced effect on behavioural tests on mice. We evaluated the compounds on three characteristic tests in the study of drugs: the cocaine-induced locomotor stimulation and sensitization, the acquisition and reactivation of cocaine-induced conditioned place preference test (CPP) and the cocaine-induced memory state. The data collected showed that two compounds present the same effect but it is more pronounced for one compound. This compound displays a typical σ_1 receptor agonist profile. It facilitated cocaine-induced psychostimulant and appetitive effects, without inducing such effects when injected alone. In other words this compound presents, in mice, the ideal pharmacological profile to be tested as a new agonist therapy. Moreover, the ADME tests on this compound reveal property of a future candidate drug.