



HAL
open science

Synthèses et évaluations biologiques anti-cancéreuses d'analogues des alcaloïdes marins granulaticide et isogranulaticide, inhibiteurs potentiels du checkpoint G2

Sébastien Deslandes

► **To cite this version:**

Sébastien Deslandes. Synthèses et évaluations biologiques anti-cancéreuses d'analogues des alcaloïdes marins granulaticide et isogranulaticide, inhibiteurs potentiels du checkpoint G2. Autre. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2010. Français. NNT: . tel-00575953

HAL Id: tel-00575953

<https://theses.hal.science/tel-00575953v1>

Submitted on 11 Mar 2011

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III – Paul Sabatier*
Spécialité : *Chimie-Biologie-Santé*

Présentée et soutenue par *Sébastien DESLANDES*
Le 8 Octobre 2010

*Synthèses et évaluations biologiques anti-cancéreuses d'analogues des
alcaloïdes marins granulatimide et isogranulatimide, inhibiteurs
potentiels du checkpoint G2*

JURY

<i>P. Moreau</i>	<i>Professeur - Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>F. Suzenet</i>	<i>Maître de Conférence - Université d'Orléans</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>V. Thiery</i>	<i>Professeur - Université de La Rochelle</i>	<i>Examineur</i>
<i>R. Chauvin</i>	<i>Professeur - LCC Toulouse</i>	<i>Examineur</i>
<i>E. Delfourne</i>	<i>Chargée de Recherche CNRS - LSPCMIB Toulouse</i>	<i>Directeur de thèse</i>

Ecole doctorale : *Sciences de la Matière, UPS, Toulouse III*
Unité de Recherche : *Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique*
118 route de Narbonne 31062 Toulouse cedex
Directeur de Thèse : *Evelyne Delfourne*

Je souhaite remercier Evelyne Delfourne pour l'accueil qu'elle m'a réservé dans son groupe et pour m'avoir encadré au cours de ces trois années de thèse.

Merci aux rapporteurs et aux examinateurs de ce manuscrit qui ont eu la gentillesse de corriger et de juger ce dernier.

J'aimerais également remercier Michel Baltas, directeur du LSPCMIB pour l'accueil dans son laboratoire et la confiance qu'il m'a accordé.

Je souhaite remercier l'ensemble du laboratoire avec qui j'ai passé ces trois années. Merci pour votre bonne humeur et vos bons mots.

Parmi eux, je souhaite remercier tout particulièrement Claude Picard qui m'a permis d'intégrer le laboratoire. Cette expérience au sein de votre groupe fut décisive pour le reste de mes études.

Une pensée toute particulière pour Nadine. Tu m'as aidé dès mes premiers pas dans le laboratoire en tant que stagiaire M2R et m'a suivi pendant presque 4 ans. Merci pour tous ces bons souvenirs, ton soutien pendant les moments de doute (surtout ceux qui interviennent en fin de journée), ton calme et ta patience.

Stefan, tu as pris le train en route mais je ne suis pas sûr qu'il serait arrivé à destination sans toi. Merci pour tes conseils chimiques et les mots d'encouragement qui les ont accompagnés. Une page se tourne mais je suis sûr que tu seras présent pour le reste du bouquin (un best-seller certainement).

Il m'est impossible de ne pas citer les étudiants qui ont partagé ma route : Arnaud, Hélène, Rodrigue et Céline mais aussi les stagiaires dont le travail n'est pas forcément présent dans ce manuscrit : Louise, Coralie, Antoine, Yann, Charlotte, Magali et Henri.

Une pensée pour toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de cette thèse que ce soit dans le cadre de la SECO, de D-SMaRT ou du monitorat.

Enfin une dernière pensée pour toute ma famille, mes amis proches et ceux qui ont partagé mon quotidien. Merci pour votre soutien tout au long de cette belle expérience.

Liste des abréviations utilisées

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BOC	tert-butylcarboxylate
BOC ₂ O	di-tert-butyl dicarboxylate
DDQ	Dichlorodicyanoquinone
DMAP	Diméthylaminopyridine
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
IC ₅₀	Concentration nécessaire pour provoquer la mort de 50 % des cellules traitées
MOM	Méthoxyméthyle
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
Ra Ni	Nickel de Raney
Rdt	Rendement
TBAF	Tétrabutyl ammonium fluoride
TBDMS	<i>Tert</i> -butyldiméthylsilyl
TFA	Acide trifluoroacétique
THP	Tétrahydropyrane
UV	Ultra-Violet

SOMMAIRE

Introduction.....	9
Chapitre I : Mise au Point Bibliographique.....	13
I. <u>Situation mondiale vis-à-vis du cancer</u>	15
A. <u>Quelques chiffres</u>	15
B. <u>Relations cancer/cellule</u>	15
1. <i>Le cycle cellulaire</i>	16
2. <i>Régulation du cycle cellulaire</i>	17
C. <u>D'où vient le cancer ?</u>	20
1. <i>Mécanismes mis en jeu au cours du développement d'un cancer</i>	21
II. <u>Traitements en place</u>.....	23
A. <u>La chirurgie</u>	23
B. <u>La radiothérapie</u>	23
C. <u>L'hormonothérapie</u>	24
D. <u>L'immunothérapie</u>	24
E. <u>Les ultrasons</u>	24
F. <u>La Chimiothérapie</u>	25
1. <u>Les agents alkylants</u>	25
a) Les moutardes à l'azote.....	26
b) Les nitrosourées.....	26
c) Triazènes et hydrazines	27
d) Les sels de platine	27
2. <u>Les antimétabolites</u>	28
a) Les antipurines	28
b) Les antiprimidines	29
c) Les antifoliques	29
3. <u>Les agents induisant ou stabilisant des coupures de l'ADN</u>	30
a) Les inhibiteurs de topoisomérase I	30
b) Les inhibiteurs de topoisomérase II.....	31
c) Les poisons de l'ADN	32
4. <u>Molécules actives au niveau de la mitose</u>	32

a) Inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline	32
b) Inhibiteurs de la dépolymérisation de la tubuline	33
III. <u>Une nouvelle voie de recherche : les structures indolocarbazoles</u>	34
A. <u>Voies d'accès à ces composés</u>	35
B. <u>Analogues de type pyrrolocarbazoles inhibiteurs de la Chk1 - Relations Structure/Activité</u>	38
1. <u>Pyrrolocarbazoles analogues structuraux des produits naturels</u>	38
2. <u>Substitution du noyau imidazole par un noyau pyrrole ou maléimide</u>	39
3. <u>Substitution du noyau imidazole par un cycle non aromatique à cinq ou six chaînons</u>	41
4. <u>Modification ou absence des cycles D et E</u>	42
C. <u>Analogues de type pyrrolocarbazoles inhibiteurs d'autres kinases</u>	43
1. <u>Inhibiteurs de la PARP-1</u>	43
2. <u>Inhibiteurs du complexe D1/CDK4</u>	44
3. <u>Inhibiteurs de la GSK-3</u>	45
4. <u>Rebeccamycine, staurosporine et analogues</u>	46
Chapitre II : Synthèse Chimique de nouveaux analogues de la granulatinimide	47
Partie 1 : Synthèse d'analogues pentacycliques de la granulatinimide	51
I. <u>Synthèse des analogues pyrroles</u>	51
A. <u>Préparation des intermédiaires 1 : bromation régiosélective de noyaux indoliques</u>	52
B. <u>Préparation des unités indolopyrroles 2</u>	53
C. <u>Préparation des intermédiaires acycliques 3</u>	54
D. <u>Accès aux analogues pyrroles 4</u>	56
II. <u>Synthèse des analogues pyrazoles de type A</u>	59
A. <u>Première approche</u>	59
1. <u>Préparation des unités indolopyrazole 5</u>	60
2. <u>Préparation des intermédiaires acycliques 6</u>	61
3. <u>Accès aux analogues pyrazoles de type A 8 : cyclisation des intermédiaires 6</u>	63
B. <u>Seconde approche</u>	64
1. <u>Préparation des intermédiaires acycliques bromés 10 et 11</u>	65

2.	<i>Accès aux analogues pyrazoliques 8</i>	67
a)	Rappels théoriques sur la spectroscopie UV-Visible	69
b)	Passage de la théorie à la pratique.....	70
3.	<i>Déméthylation</i>	74
III.	<u>Synthèse d'analogues pyrazoles de type B</u>	75
A.	<u>Première approche</u>	75
1.	<i>Préparation des synthons 20 et 21</i>	76
a)	Synthèse du pyrazole acétamide 20	76
b)	Synthèse du synthon glyoxylate 21	77
2.	<i>Préparation des intermédiaires acycliques 22</i>	78
3.	<i>Préparation des analogues 27 : cyclisation photochimique des intermédiaires acycliques 26</i>	80
4.	<i>Déprotection</i>	82
B.	<u>Seconde approche</u>	83
1.	<i>Synthèse de l'ester boronique du pyrazole</i>	84
2.	<i>Synthèse du dérivé bromé</i>	85
3.	<i>Couplage de Suzuki</i>	85
4.	<i>Cyclisation photochimique</i>	86
5.	<i>Déprotection</i>	87
6.	<i>Vers la synthèse des analogues</i>	88
Partie 2 : Synthèse d'analogues tetracycliques de la granulatinide		89
I.	<u>Molécules symétriques, premier squelette X = Y = pyrrole</u>	89
II.	<u>Molécules disymétriques, deuxième squelette X = pyrrole, Y = pyrazole</u>	90
III.	<u>Molécules disymétriques, troisième squelette X = pyrrole, Y = 2^{ème} maléimide</u>	92
IV.	<u>Molécules disymétriques, quatrième squelette X = pyrrole, Y = cyclopentène</u>	94
A.	<u>Synthèse des diènes</u>	96

1. <u>Synthèse des diènes</u>	97
a) Cas du Pyrrole	97
b) Cas du pyrazole	99
c) Cas de l'imidazole	99
2. <u>Réaction de Diels-Alder</u>	99
a) Cas du diène pyrrole	99
b) Cas du diène pyrazole	100
3. <u>Aromatisation de l'adduit de Diels Alder</u>	102

Chapitre III : Evaluations Biologiques.....105

I. <u>Principe des tests</u>	107
A. <u>Test d'inhibition de la croissance globale de la population cellulaire</u>	107
B. <u>Test d'inhibition du checkpoint G2</u>	108
II. <u>Matériels et méthodes</u>	111
III. <u>Résultats</u>	111
A. <u>Test d'inhibition de la croissance de la population cellulaire</u>	111
B. <u>Inhibition du Checkpoint G2</u>	116
IV. <u>Discussion</u>	119
V. <u>Conclusion</u>	120

Chapitre IV : Vers une approche *in silico* de nouveaux inhibiteurs dérivés du produit naturel isogranulatimide.....121

I. <u>Contexte</u>	123
A. <u>Positionnement de l'étude in silico</u>	123
B. <u>Etude préliminaire de la Chk1 : rôle et analyse structurale</u>	123
1. <u>Rôle de la Chk1</u>	123
2. <u>Éléments d'analyse structurale</u>	124
II. <u>Prédiction <i>in silico</i> de l'affinité des analogues préparés pour la Chk1</u>	129

A. <u>Introduction</u>	129
B. <u>Analyses de structures protéiques et identification de résidus clés</u>	129
C. <u>Calculs d'arrimage moléculaire</u>	132
1. Résultats	134
2. Conclusion.....	136
III. <u>Vers un design rationnel de nouveaux inhibiteurs de la Chk1 dérivés de l'isogranulatimide</u>	137
A. <u>Introduction</u>	137
B. <u>Résultats & discussion</u>	139
IV. <u>Matériels & méthodes</u>	143
V. <u>Conclusion</u>	143
Conclusion Générale	147
Partie Expérimentale	151
Bibliographie	237
Molécules décrites	243
Annexes	249

INTRODUCTION

Malgré de nombreux progrès réalisés dans le domaine de la recherche contre le cancer au cours de ces dernières années, cette maladie reste encore une des premières causes de mortalité dans les pays développés et la première cause en France.

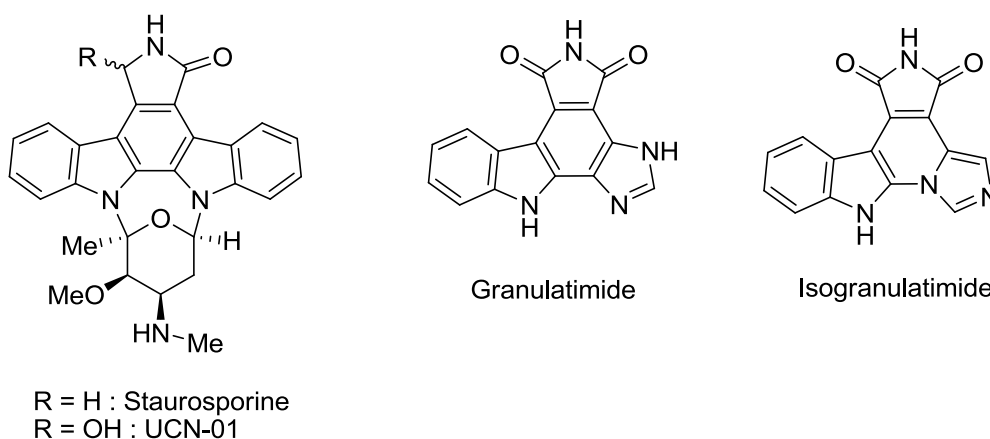
Même si la chimiothérapie et la radiothérapie constituent des traitements de choix, les nombreux effets secondaires qu'ils induisent rendent la recherche de nouvelles approches thérapeutiques toujours indispensable. Parmi ces nouvelles approches en développement, celle qui s'intéresse au contrôle du cycle cellulaire semble prometteuse.

Ainsi, il existe au niveau du cycle cellulaire deux checkpoints (ou points de contrôle) permettant à une cellule ayant un ADN défectueux d'arrêter la progression du cycle pour permettre la réparation de cet ADN. Le checkpoint G1 intervient avant la réplication en phase S et le checkpoint G2 avant la ségrégation des chromosomes en mitose.

Dans 70 % des cancers, il est clairement établi que le checkpoint G1 est inactif, cette inactivité résultant de la mutation de la protéine p53, une enzyme clé de ce checkpoint. Par conséquent, dans le cas d'une cellule cancéreuse ayant un ADN endommagé, la réparation de l'ADN ne pourra se faire que via le checkpoint G2, qui garde, quant à lui, une certaine fonctionnalité. D'où l'idée d'une combinaison thérapeutique qui associerait un génotoxique capable de perturber l'ADN des cellules cancéreuses et un inhibiteur de checkpoint G2 qui empêchera cette réparation pour conduire finalement à l'apoptose.

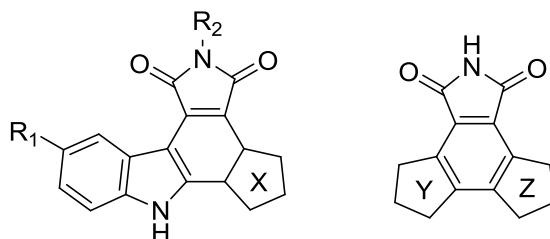
Parmi les inhibiteurs de checkpoint G2 connus on peut notamment citer la staurosporine isolée de *streptomyces staurosporus* et son analogue synthétique l'UCN-01.

En 1998, Roberge *et al.*, ont, suite au criblage de 1300 extraits marins pour isoler de nouvelles molécules capables d'inhiber le checkpoint G2, isolé de l'ascidie *Didemnum granulatum* deux alcaloïdes, la granulatumide et l'isogranulatumide. Ces composés inhibent le checkpoint G2 avec des IC₅₀ de l'ordre du micromolaire.



Des travaux ultérieurs ont montré qu'au niveau du checkpoint G2, tous ces composés agissaient en inhibant une enzyme, la Chk1. La staurosporine et l'UCN-01 inhibent efficacement l'enzyme avec des IC_{50} de 8 et 7 nM respectivement mais manquent de spécificité puisqu'ils inhibent aussi de nombreuses autres kinases. La granulatinimide et l'isogranulatinimide quant à elles inhibent l'enzyme avec moins d'efficacité ($IC_{50} = 0,25$ et $0,1$ μ M respectivement) mais sont par contre très spécifiques.

Dans ce contexte et dans l'optique de définir de nouveaux inhibiteurs potentiels du checkpoint G2 qui soient plus efficaces que les produits naturels tout en ayant au moins la même spécificité, nous avons étudié deux types d'analogues de la granulatinimide et de l'isogranulatinimide. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à des structures pentacycliques pour lesquelles le noyau imidazole des produits naturels a été remplacé par un cycle pyrrole ou pyrazole. Dans un deuxième temps, des structures tétracycliques consistant en un cycle benzénique entouré d'un cycle maléimide et de deux autres pentacycles (notés Y et Z) ont été investiguées.



Le premier chapitre de ce manuscrit va consister en une mise au point bibliographique au cours de laquelle, après avoir introduit les différentes voies thérapeutiques utilisées actuellement dans la lutte contre les maladies cancéreuses, nous ferons un bilan des différents analogues de la granulatinimide et de l'isogranulatinimide publiés à ce jour dans la littérature.

Dans le deuxième chapitre, nous présenterons et discuterons les résultats relatifs aux voies de synthèse suivies pour accéder aux différents inhibiteurs potentiels que nous avons ciblés et le troisième chapitre sera consacré à l'évaluation biologique des composés obtenus, travail faisant l'objet de différentes collaborations. Enfin, le dernier chapitre rendra compte des résultats d'une étude de modélisation que nous avons menée pour aller vers un design rationnel de ce type d'inhibiteurs.

CHAPITRE I

MISE AU POINT
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Situation mondiale vis-à-vis du cancer

A. Quelques chiffres

Le nombre de cas ne cesse d'augmenter chaque année et pourtant on meurt de moins en moins du cancer. En 2005, en France, selon l'Institut de Veille Sanitaire, 320 000 nouveaux cas ont été diagnostiqués : 180 000 cas chez l'homme, 140 000 cas chez la femme. Cela représente une multiplication par deux du nombre de cancers pour les hommes et une forte augmentation pour les femmes (+84 %) depuis 1980. Toujours en 2005, on estime à 146000 le nombre de décès dus au cancer soit une augmentation de 13% par rapport à 1980.

Alors que l'incidence a augmenté, le nombre de décès a diminué. Grâce à de grandes campagnes de dépistage (notamment, pour le cancer du sein ou de la prostate) on diagnostique plus tôt les cancers. Traités dès les premiers signes, ils ont de meilleures chances d'être guéris. En parallèle de cela, les cancers les plus agressifs (œsophage, estomac, voies aérodigestives supérieures) sont en forte régression.

L'augmentation du nombre de cas est liée au vieillissement de la population mais aussi à l'évolution de la société actuelle. Environ 70 % des cancers sont dus à des causes évitables, telles que le tabagisme ou l'exposition aux ultra-violets notamment. La modification des habitudes alimentaires et le manque d'activités physiques conduisent à des cancers colorectaux ou du pancréas, l'obésité favorisant quant à elle les cancers féminins (ovaires, col de l'utérus, sein).

De plus, l'environnement moderne dans lequel nous évoluons constitue une source supplémentaire de causes de cancer : la pollution de l'air, l'utilisation d'agents chimiques ou les médicaments (hormones, immunosuppresseurs,...). Il semble donc indispensable d'informer la population afin de réduire le nombre de cas. Ainsi, le nombre de cancers liés au tabagisme ou à l'alcool a diminué avec la baisse de la consommation observée ces deux dernières décennies.

B. Relations cancer/cellule

Le cancer touche les deux sexes, toutes les tranches d'âge et toute la population mondiale, cela parce qu'il concerne directement l'unité de base du vivant, la cellule et plus

particulièrement l'ADN, lors du processus vital pour l'organisme de la réplication cellulaire. Les caractéristiques principales d'une cellule cancéreuse sont l'anarchie et la vitesse avec laquelle elle prolifère sans se soucier des signaux envoyés par ses voisines en n'obéissant qu'à son propre programme de réplication. Elle échappe ainsi aux systèmes de régulation de l'organisme et se comporte un peu comme une cellule embryonnaire.

1. Le cycle cellulaire. ¹

Une cellule humaine se divise, dans des conditions normales en 24 h pour donner deux cellules filles identiques entre elles et à la cellule dont elles sont issues. Il faut pour cela s'assurer que chaque élément est parfaitement dupliqué, le moyen le plus simple pour cela étant de procéder étape par étape. Chez les mammifères, le cycle cellulaire est divisé en 5 phases : G₀, G₁, S, G₂ et M. (Figure 1) Une cellule ne se multipliera que si cela est nécessaire pour l'ensemble de l'organisme. Elle va pour cela sonder son environnement en prenant en compte les signaux mitogènes. Lorsque ces signaux ont atteint un certain seuil, la cellule commence le processus de division.

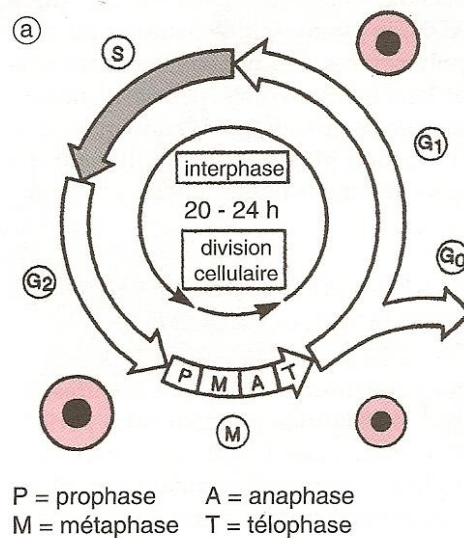


Figure 1 : Cycle cellulaire pour une cellule eucaryote.

Dans un premier temps, la cellule va quitter la phase G₀ (état de quiescence) pour entrer en phase G₁. Cette phase G₁ sert de préparation : la taille de la cellule est multipliée par deux et l'activité biosynthétique, qui était au ralenti, reprend. La principale activité de

cette phase correspond à la synthèse des enzymes intervenant dans la réplication de l'ADN. La phase S débute dès que l'ADN commence sa réplication et se termine lorsque chaque chromosome possède deux chromatides. On peut citer comme exemple d'enzymes intervenant dans la réplication : les topoisomérases qui servent à « désenrouler » l'ADN pour sa réplication par l'ADN polymérase après passage des hélicases qui dissocient les deux brins. Une fois l'ADN dupliqué, la cellule entre dans la dernière phase avant la mitose, la phase G2. L'activité synthétique s'intensifie à nouveau. Dans cette étape, les tubulines, protéines indispensables à la migration des chromatides lors de la mitose sont principalement synthétisées. Quand la cellule est prête, elle entre en mitose. Elle va passer par quatre phases qui conduiront à la naissance de deux cellules filles : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Ces quatre phases voient la disparition de la paroi du noyau de la cellule et la condensation de l'ADN, la disposition des chromosomes sur la plaque équatoriale, la migration aux deux pôles de la cellule et la séparation en deux cellules filles. Selon les besoins de l'organisme, les cellules filles vont pouvoir recommencer un cycle de division, tomber en quiescence ou se différencier.

2. Régulation du cycle cellulaire. ^{2,3,4}

Pour assurer le bon déroulement de ce cycle, plusieurs facteurs de régulation peuvent intervenir. D'une part, il existe au niveau de la phase G1 un point dit de restriction (R), défini comme le point de non retour de la cellule. Une fois ce point franchi, peu importe la disparition des signaux mitogènes ou l'apparition des signaux anti-mitogènes, la cellule met en place la machinerie qu'est la division cellulaire. Ce point R est gouverné par une protéine dite de rétinoblastone (pRb), gardienne du bon déroulement du cycle. L'inactivation fonctionnelle de pRb (par délétion, mutation ou encore inhibition transcriptionnelle) serait une étape obligatoire de la genèse de la tumeur. D'autre part, le déroulement correct des phases successives du cycle cellulaire est assuré par un complexe issu de l'association de deux protéines. La première est présente en concentration constante pendant que la deuxième est synthétisée, s'accumule puis disparaît brutalement à la fin de chaque phase du cycle. La première est appelée CDK (kinase dépendante de cycline) et est inactive si elle reste seule. La deuxième, présente à une concentration variable au cours du cycle, a donc été appelée cycline. Chaque type de cycline a un rôle particulier dans la régulation et peut donc être la source d'une dérivation cancéreuse.

A ce jour, ont été isolées, purifiées et caractérisées 13 CDKs différentes et 25 cyclines. Toutes les combinaisons sont envisageables mais n'ont pas été observées. Les CDKs sont des protéines de type kinase, capables de transférer un groupement « phosphoryle » à une molécule grâce à de l'ATP. Elles ne sont pas obligatoirement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire : CDK5 et CDK11 ont par exemple des fonctions neuronales tandis que CDK7, CDK8 et CDK9 jouent un rôle dans la transcription. Les CDKs 4 et 6 associées à des cyclines D régulent le déroulement de la phase G1 puis le complexe CDK2/E assure la transition G1/S. L'association de la CDK2 avec la cycline A permet ensuite la bonne marche de la phase S. C'est enfin la CDK1 et son co-enzyme la cycline A qui gouvernent la phase G2 et son association avec la cycline B qui permettent l'entrée en mitose (Figure 2).

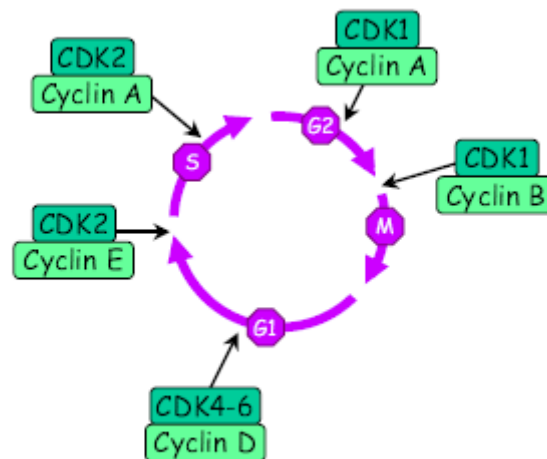


Figure 2 : Les complexes CDK/cycline contrôlent le cycle cellulaire

L'activité cyclique de ces complexes protéiques est contrôlée à quatre niveaux :

- La faible durée de vie des complexes : les cyclines sont synthétisées, interagissent avec les CDKs puis sont dégradées. Sans ces cyclines, les CDKs sont inactives.
- Les phosphatases de la famille cdc25 a, b et c sont capables de phosphoryler/déphosphoryler sur des résidus particuliers les CDKs pour activer/inactiver celles-ci.
- La présence d'inhibiteurs protéiques dont l'activité est dépendante de la CDK. Il en existe deux types, la famille INK4 qui interfère avec l'association CDK/cycline de type D et la famille CIP/KIP dont les membres régulent l'activité des complexes CDK/cycline. Par exemple sans fixation de p21^{CIP1} et p27^{KIP1} sur CDK4, son association avec la cycline D n'est pas possible par contre ces deux protéines sont des inhibiteurs de CDK2/cycline E.

- Les variations de localisation intracellulaire grâce à des phosphorylation/déphosphorylation. Ces différents mécanismes sont représentés en Figure 3.

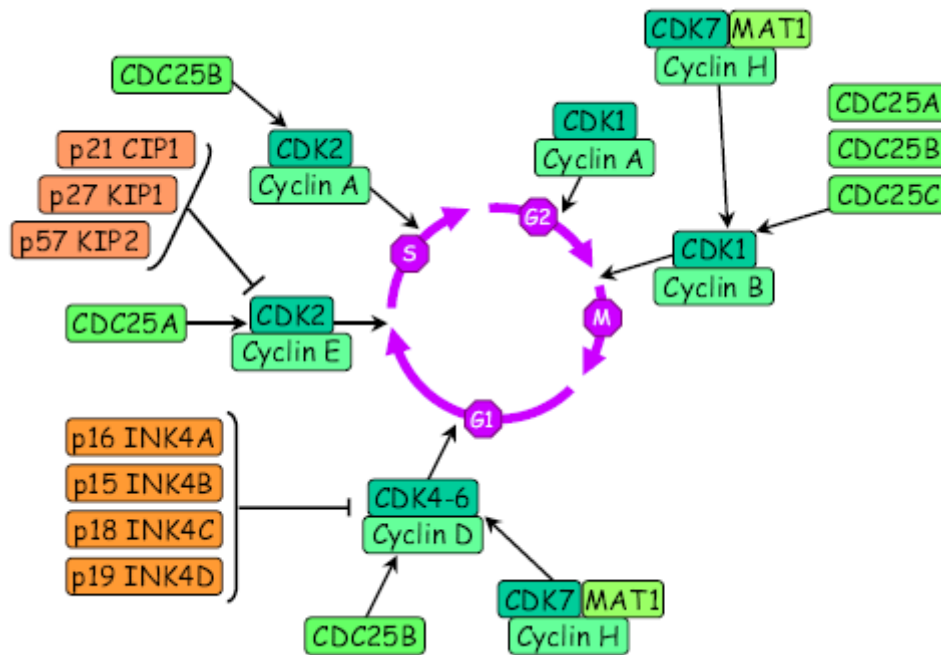


Figure 3 : CDK/cycline et leur système d'inhibition

Pour limiter l'activité du complexe kinase/cycline, il existe de petites protéines qui en s'y fixant inhibent celui-ci. C'est le cas de p53 et p27, toutes deux gardiennes de l'intégrité de la cellule. Leur action permet l'arrêt du cycle et la réparation éventuelle de l'ADN endommagé. p53 peut également être à l'origine de l'apoptose ou mort programmée de la cellule.

Chaque phase ne peut débuter que si la précédente est terminée. C'est l'état de l'ADN qui contrôle l'avancement du cycle. Ainsi, il existe des points de contrôle pour assurer sa bonne marche. Ces points de contrôle sont, dans des conditions idéales, peu utilisés. Par contre, pour des cellules qui présentent des anomalies au niveau de leur ADN, ces points de contrôles jouent un rôle clé, en permettant l'arrêt du cycle pour permettre la réparation de l'ADN ou la destruction de la cellule par apoptose.

Le premier point de contrôle appelé « checkpoint G1 » se situe avant l'entrée en phase S (blocage de CDK2) et le deuxième, le « checkpoint G2 » avant la mitose (blocage de CDK1). Ces deux checkpoints impliquent deux kinases appartenant à la famille des « phosphatidylinositol-3-kinase-like kinases » (PIKKs) : l'ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et l'ATR (ATM- and Rad3-related). Chacune est activée en conséquence d'un

dommage constaté sur l'ADN, l'ATM en réponse à des radiations ionisantes ou des coupures double-brin, l'ATR pour des erreurs de réplication ou des dommages dus aux UV.

L'ATM a deux effets. Le premier est l'activation de la voie p53-dépendante. L'ATR et l'ATM ont en commun la phosphorylation et l'activation des kinases Chk1 et Chk2, qui elles phosphorylent et inactivent CDC25a et CDC25c. CDK1 et CDK2 restent alors inactives et le cycle cellulaire est arrêté au cours des transitions G2/M ou G1/S (Figure 4).

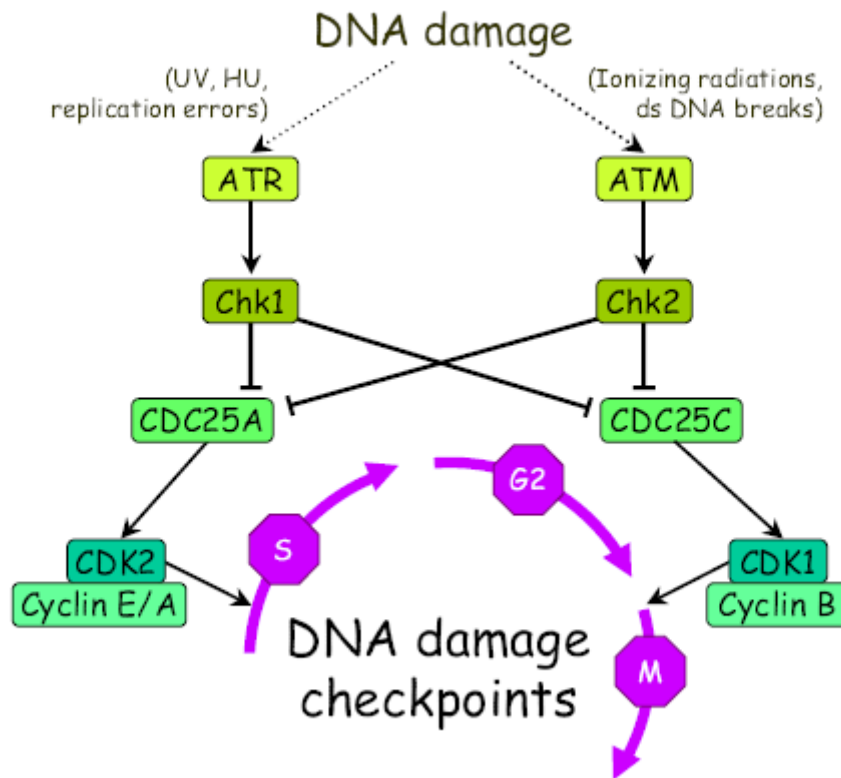


Figure 4 : Contrôle de l'état de l'ADN et blocage en G1 ou en G2

C. D'où vient le cancer ?

Une seule mutation ne suffit pas à créer le cancer. En effet, au cours de sa vie, le corps humain va connaître 10^{16} divisions cellulaires, donc autant de chance de connaître une mutation au niveau de l'ADN. Si une seule mutation était suffisante, alors l'espèce humaine ne devrait pas être viable. Un autre argument allant dans ce sens vient de la répartition des cancers en fonction de l'âge de la population. Les mutations se produisent avec une probabilité fixe par an, le risque de développement d'un cancer serait donc indépendant de l'âge s'il suffisait d'une seule mutation pour qu'il apparaisse. Il est estimé à dix, le nombre de

mutations nécessaires à une lignée cellulaire pour atteindre une cellule anormale pouvant donner lieu à un cancer.

Un cancer débute toujours par une cellule qui a su trouver un équilibre entre trop de mutations pour respecter les signaux envoyés par ses voisines pour respecter les besoins de l'ensemble de l'organisme mais pas assez pour être éliminée par mort cellulaire car défaillante. C'est pour cela que les cancers qui ont une cause extérieure connue ne deviennent apparents que longtemps après l'exposition à l'agent causal, par exemple après 10 à 20 ans de tabagisme important. De même, l'incidence des leucémies à Hiroshima et Nagasaki n'a pas présenté d'élévation marquée avant les 5 ans qui ont suivi l'explosion des bombes atomiques. Pendant cette période d'incubation, les cellules cancéreuses potentielles subissent une succession de modifications. La même chose s'applique lorsque la lésion génétique d'origine n'a pas de cause externe évidente.

Le plus souvent, les mutations qui vont toucher des cellules capables de devenir cancéreuses vont être des mutations qui touchent au contrôle de la mort ou de la différenciation. Beaucoup de cellules normales arrêtent de se diviser lorsqu'elles se différencient de façon terminale. Mais les cellules normales arrêtent aussi de se multiplier lorsqu'elles ressentent un stress ou une lésion dans leur ADN. De plus, les cellules normales ne peuvent se répliquer qu'un certain nombre de fois (25 à 50 fois pour les fibroblastes de l'homme par exemple). Les cellules cancéreuses ne répondent à aucun de ces signaux et continuent de se multiplier. On parle de cellules immortelles.

Une cellule cancéreuse présente donc six capacités que l'on peut lister comme indispensables pour sa « survie »: mépriser les signaux externes et internes qui régulent la prolifération cellulaire, éviter le suicide par apoptose, contourner les limites de prolifération, échapper à la sénescence et à la réplication, être génétiquement instable, s'échapper de son tissu d'origine et être capable de survivre ailleurs dans l'organisme.

Mécanismes mis en jeu au cours du développement d'un cancer^{5,6,7}

Le passage d'une cellule normale et différenciée à un amas cellulaire indifférencié et incontrôlé se fait par plusieurs étapes clés.

- *Phase d'hyperplasie* : il doit tout d'abord y avoir amorçage tumoral, étape qui consiste en la naissance d'une cellule qui se divise trop rapidement à cause de modifications génétiques.

- *Phase de dysplasie* : vient ensuite l'étape de progression tumorale. Les cellules filles issues de la première cellule cancéreuse vont elles aussi se multiplier et à cause de leur instabilité génétique subir de nouvelles altérations génétiques. Ces nouvelles mutations génétiques vont conduire à l'apparition d'un amas tumoral. On parle de cancer localisé.
- *Phase d'angiogénèse* : à partir de là, les cellules au centre de la tumeur se développent plus difficilement à cause du manque de ressources. La tumeur se crée un système d'irrigation qui lui permet de vivre, de s'alimenter en oxygène, en nutriment et de relarguer ses déchets.

Après mutations génétiques, les cellules tumorales diffusent dans le sang. Ce processus de dissémination ainsi que les tumeurs secondaires qui en résultent sont appelés métastases. Le cancer devient invasif. La Figure 5 montre comment une tumeur bénigne peut aboutir à la formation de métastases.

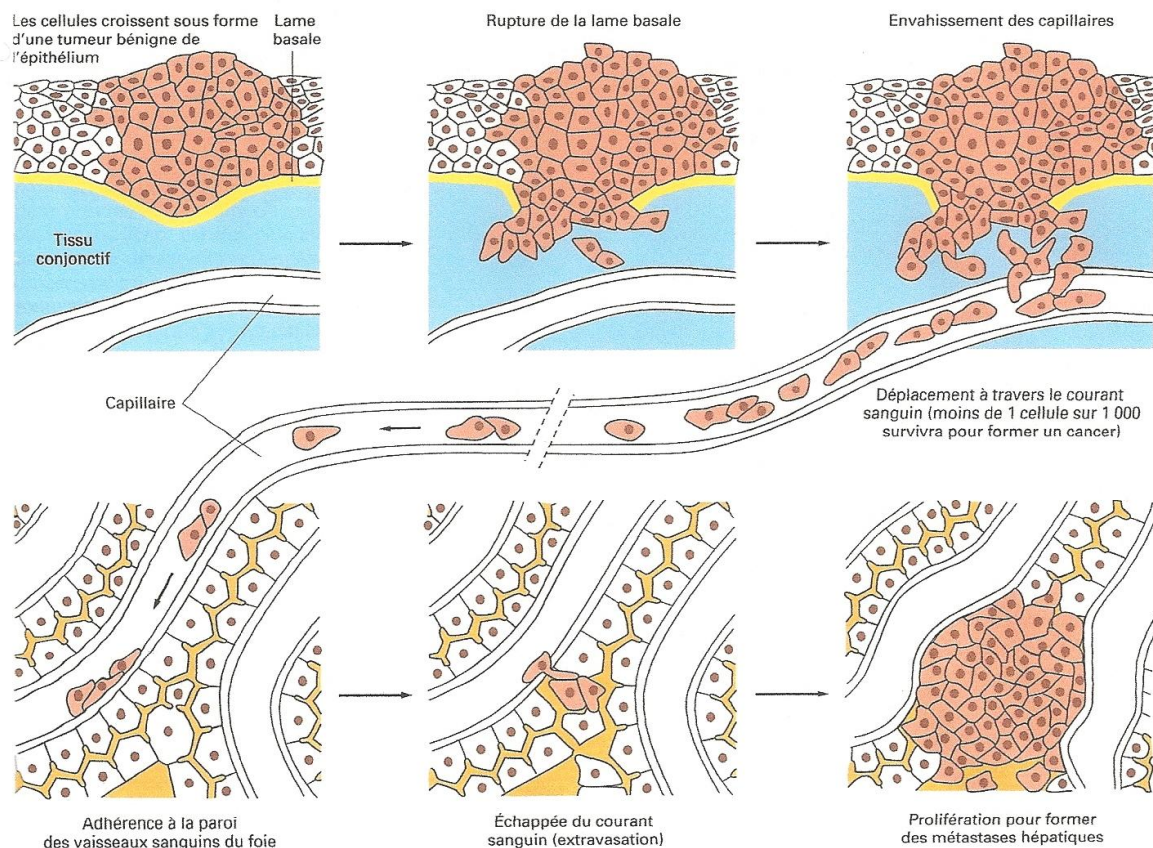


Figure 5 : Naissance de métastases

Une cellule qui échappe au contrôle cellulaire et qui se multiplie trop, trop vite et trop souvent suffit pour qu'il y ait cancer. C'est un processus lent et l'homme meurt parfois avant que ne se déclenche le processus. Toutefois, si celui-ci apparaît, il faut envisager un traitement, parfois lourd, pour atteindre une « rémission ».

II. Traitements en place

Chaque cancer est différent. Son traitement est donc unique, adapté à chaque patient, et décidé par une équipe de spécialistes issus de plusieurs disciplines. Il dépendra de plusieurs facteurs tels que la taille de la tumeur, sa localisation, la présence ou non de métastases, mais aussi l'âge du patient, ses antécédents et sa forme.

A. La chirurgie ^{8,9}

C'est la première technique utilisée, elle peut servir soit à poser un diagnostic soit à enlever les cellules cancéreuses présentes dans l'organe. Les progrès technologiques ont permis une miniaturisation des outils de travail des chirurgiens qui grâce à des caméras peuvent travailler avec une minutie accrue et donc sauver un maximum de tissus sains (dans plus de 50 % des cas, une femme traitée pour un cancer du sein n'est pas amputée). Cette technique ne peut donc être utilisée que pour des cancers localisés et avec une progression lente (cancer de la peau par exemple). La chirurgie n'a aucun effet sur les éventuelles métastases et donc doit être complétée par une technique dite « générale ».

B. La radiothérapie ^{6,9}

La radiothérapie est une technique qui consiste à détruire les cellules cancéreuses par irradiation. Elle peut être utilisée avant la chirurgie afin de diminuer la taille de la tumeur ou après, afin de détruire les éventuelles cellules cancéreuses ayant échappé aux bistouris afin d'éviter les récurrences. L'objectif est de déstabiliser l'ADN de la cellule cancéreuse, l'empêchant ainsi de se multiplier. On va irradier les organes cancéreux en dirigeant le faisceau de rayons. Les progrès techniques permettent de n'irradier que les organes malades et d'éviter les tissus sains. Cette technique indolore a néanmoins des effets secondaires, on observe parfois des brûlures au niveau de la peau.

Une variante de la radiothérapie, la curiéthérapie, réside dans l'utilisation d'une source interne, telle qu'un fil d'iridium, un disque ou des granulés d'iode 125, effectuant l'irradiation progressivement. Ces éléments radioactifs sont introduits en contact de l'organe atteint sous anesthésie générale.

C. L'hormonothérapie ^{6,9}

L'hormonothérapie est une branche particulière de la chimiothérapie. Elle s'intéresse aux cancers liés au fonctionnement hormonal normal du corps humain. Les hormones jouent un rôle important dans la multiplication des cellules et donc des cellules cancéreuses. On va cette fois-ci utiliser des agents qui vont s'attaquer à la synthèse d'hormones. Les cancers du sein et de la prostate sont de bons candidats pour de tels traitements. Les effets secondaires sont ceux associés à la disparition d'hormones: andropause et ménopause.

D. L'immunothérapie ^{6,9}

Tout le monde produit des cellules cancéreuses mais celles-ci sont naturellement éliminées par notre système immunitaire. Si un cancer a pu s'installer c'est que notre système immunitaire connaît une faille. L'immunothérapie met en place des réactions de défenses immunitaires en occasionnant toutefois, de nombreux effets secondaires indésirables. Son but principal est d'empêcher la progression d'un cancer en attendant de pouvoir le traiter.

E. Les ultrasons ¹⁰

Une étude récente réalisée sur des souris apporte des résultats encourageant pour ce type de traitement. L'exposition de tumeurs de souris à des ultrasons a permis de priver ces tumeurs d'apport sanguin via les vaisseaux nourriciers. Une tumeur développe son propre réseau sanguin qui est donc neuf et faible par rapport au réseau déjà en place. L'utilisation d'ultrasons à une puissance légèrement supérieure à celle utilisée pour l'observation d'images (échographie) mais inférieure à celle nécessaire au décollement des tissus, a permis de voir un effet profond sur l'apport de sang aux tumeurs et une diminution de celles-ci.

F. La Chimiothérapie ^{11,12,13}

Toutes les techniques précédemment citées ont un intérêt particulier et les oncologues les utilisent en fonction de l'état du cancer. Néanmoins, la chimiothérapie est la technique la plus couramment utilisée. En effet, elle peut, avant une opération chirurgicale diminuer la taille de la tumeur et après l'ablation éviter les récives. Elle va traiter l'organe atteint mais aussi l'ensemble de l'organisme. Elle est donc souvent utilisée en traitement de fond. Une ou plusieurs drogues anticancéreuses sont injectées au patient. L'oncologue décide, dose et adapte le traitement : aussi bien la nature de l'agent à utiliser, que sa quantité et la fréquence des injections.

La chimiothérapie est un traitement faisant intervenir des molécules chimiques cytotoxiques, cet effet relevant de différents modes d'action. Malheureusement, il n'y a pas de différences métaboliques entre une cellule cancéreuse (agent à éliminer) et une cellule saine (organisme hôte), la seule différence résidant dans l'intensité de l'activité mitotique. La difficulté réside dans le fait que le cancer naît et peut renaître d'une seule cellule. Il faut donc pour obtenir une guérison, éliminer toutes les cellules cancéreuses ce qui est quasi impossible : par exemple, une leucémie lymphocytaire évoluée comporte environ 10^{12} cellules cancéreuses (soit 1 kg). Un traitement extrêmement efficace, qui éliminerait 99,99 % des cellules malignes, en laisserait subsister 1/10 000, soit 100 mg ou 10^8 . On parle donc plutôt de rémission prolongée que de guérison.

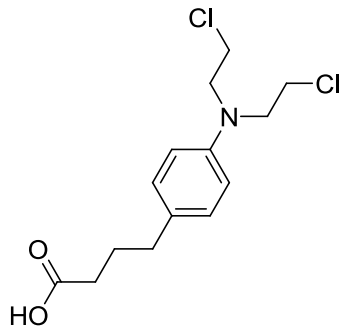
Pour compliquer le tout, au sein d'une même tumeur peuvent coexister différentes populations de cellules néoplasiques de caractéristiques différentes et de sensibilités différentes aux traitements. En réduisant la tumeur par chirurgie ou radiothérapie, on diminue la probabilité d'une tumeur polymorphe et atténue ainsi les phénomènes de résistance. Il va donc falloir utiliser les agents de chimiothérapie en combinaison avec d'autres techniques. Un large spectre de cancers pourra ainsi être traité grâce aux nombreuses molécules cytotoxiques actuellement sur le marché que l'on peut regrouper en quatre catégories principales.

1. Les agents alkylants

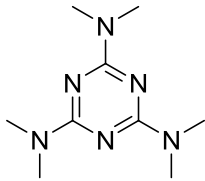
Cette famille de cytotoxiques est la plus ancienne utilisée. Elle est constituée de molécules bifonctionnelles électrophiles capables de réagir avec les bases de l'ADN. La formation de liaisons covalentes provoque des effets mutagènes et la mort cellulaire.

a) Les moutardes à l'azote

Historiquement, le terme « moutarde à l'azote » dérive du nom du gaz moutarde utilisé lors de la première guerre mondiale. Il s'agissait d'un dérivé soufré dont les effets vésicants immédiats mais surtout les effets myélotoxiques (la diminution, voire l'interruption, de la production de certaines ou de toutes les cellules sanguines) secondaires étaient redoutables. En voici quelques exemples :



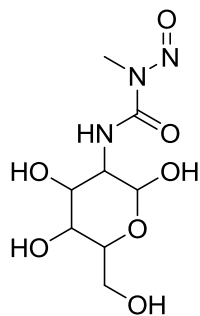
Le *Chlorambucil* est un agent alkylant qui possède les actions les plus lentes et les plus progressives. C'est donc le plus maniable, il peut être utilisé en cure prolongée avec des effets toxiques moindres.



L'*hexaméthylmélatamine* produit thérapeutique est un dérivé utilisé en 1960 pour lequel les oncologues ont un regain d'intérêt car il a montré une légère efficacité contre les cancers pulmonaires.

b) Les nitrosourées

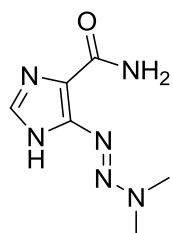
Les nitrosourées sont des agents à large spectre thérapeutique. Elles sont capables de former deux liaisons covalentes avec l'ADN. Leur intérêt vient de leur grande lipophilie permettant une grande pénétration dans le système nerveux central et leur conférant une efficacité particulière sur les atteintes méningées des leucémies et sur les tumeurs cérébrales.



La streptozocine initialement étudiée comme antibiotique, est une molécule qui possède une partie méthylnitrosurée (MNU) attachée à une molécule de glucose. Expérimentalement, elle est utilisée pour provoquer du diabète chez l'animal. En thérapeutique, elle est utilisée pour les traitements des cancers pancréatiques «insulaires». Elle exerce une activité myélosuppressive importante et retardée.

c) Triazènes et hydrazines

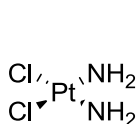
Les triazènes participent à l'alkylation après activation en espèce diazométhane ou ion méthyldiazonium. Ces espèces fortement actives méthylent en priorité les guanines. L'intérêt de ces substances est leur caractéristique de type prodrogue, du fait de leur activation au sein même de la cellule.



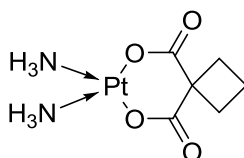
La dacarbazine après activation par le système du cytochrome P-450 et N-déméthylation, se fragmente en donnant un composé alkylant

d) Les sels de platine

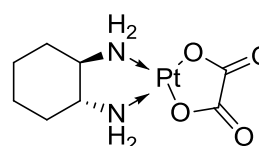
Les complexes de platine sont utilisés dans le traitement des cancers des ovaires et des testicules. Leur action est conditionnée par la substitution des chlores par des molécules d'eau. L'intermédiaire électrophile généré forme essentiellement des ponts intrabins entre deux guanines.



Cis-platine



Carboplatine



Oxaliplatine

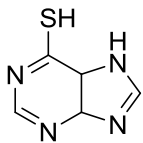
Le *cis*-platine est un complexe de coordination du platine de première génération qui dans sa forme *cis* possède des effets antinéoplasiques. Il peut réagir avec l'ADN, créant des liaisons entre les bases puriques de l'ADN (adénine et guanine) à l'intérieur d'un brin et d'un brin à l'autre. L'ADN ne peut donc plus être déroulé et lu. Le cisplatine intervient également au niveau de l'ARN et de la synthèse protéique. Le carboplatine, produit de deuxième génération présente la même activité que les dérivés de la précédente génération mais avec des risques de complication rénale réduits. Il existe aussi des composés de troisième génération : l'oxaliplatine et l'ormaplatine.

2. Les antimétabolites

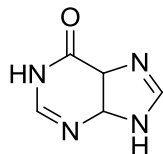
Les agents cytotoxiques de type antimétabolite agissent au niveau de la synthèse de l'ADN. Le plus souvent, ce sont des analogues de métabolites tels que les purines ou les pyrimidines, fondamentaux pour le fonctionnement de la cellule. Ils prennent la place de ces derniers mais ne peuvent s'incorporer à l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire, arrêtant ainsi le développement et la division cellulaire. Il existe trois groupes d'antimétabolites selon le type de cible qu'ils atteignent.

a) Les antipurines

L'altération de la voie d'accès aux purines est surtout utilisée pour le traitement des leucémies. L'objectif principal est de leurrer l'organisme en intégrant de « faux » substrats au niveau des étapes de synthèse métabolique. Les molécules utilisées sont des purines modifiées.



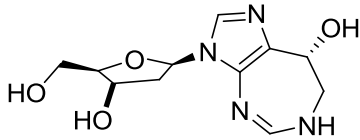
6-mercaptopurine



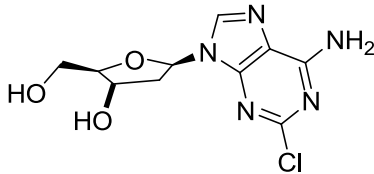
Hypoxanthine

La 6-mercaptopurine

C'est un analogue soufré de l'hypoxanthine (une base très rare des acides nucléiques)



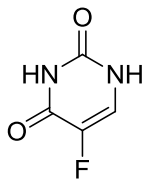
La *pentostatine* (ou *déoxyciformycine*) est un puissant inhibiteur de l'adénosine déaminase (enzyme intervenant dans le métabolisme des purines)



La *cladribine* est un autre analogue purique qui a l'avantage d'être actif sur les cellules quiescentes.

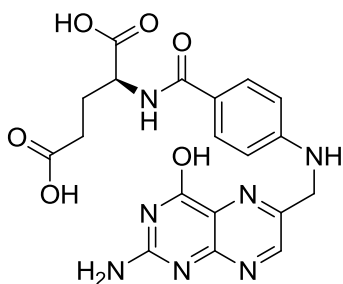
b) Les antiprimidines

La voie de synthèse des bases de l'ADN est complexe et fait intervenir de nombreuses enzymes. Leur inhibition va entraîner la rupture de la synthèse.

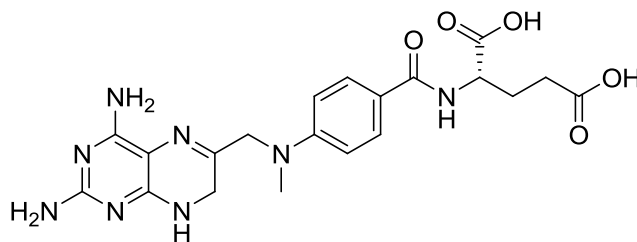


Le *5-fluoro-uracile* (*5FU*) est un inhibiteur suicide de la synthèse de la thymidilate synthase, enzyme entrant en jeu dans la synthèse de la thymidine triphosphate, élément de l'ADN. La mort cellulaire est provoquée par carence de thymine. Le 5-fluoro-uracile est utilisé pour le traitement des carcinomes, des cancers du sein et gastrointestinal.

c) Les antifoliques



L'acide folique est un composé essentiel dans la croissance et la multiplication des cellules. Il intervient notamment en tant qu'auxiliaire oxydant dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques, constituant des acides nucléiques.



Le Méthotrexate est un inhibiteur de la déhydro-folate réductase (DHFR) qui catalyse la transformation de l'acide folique en acide folinique (*citrovorum factor*).

Il est utilisé dans le traitement des lymphomes, leucémies, ostéosarcomes, cancers du sein, du poumon, des testicules.

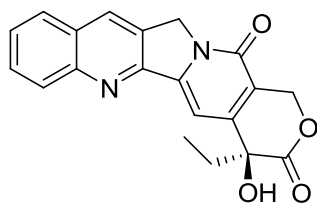
3. Les agents induisant ou stabilisant des coupures de l'ADN

Ces agents interagissent avec des enzymes intervenant dans le cycle de transformation et de duplication de l'ADN (agents anti-topoisomérase) ou peuvent également induire des ruptures de l'ADN (poisons de l'ADN).

Avant toute utilisation, l'ADN est condensé sous forme de « pelote » pour former les chromosomes. Lors de la duplication, de la transcription ou lors de mutations, il faut désenrouler l'ADN. Les topoisomérase sont des enzymes capables après formation d'un complexe enzyme-ADN de couper un ou deux brins d'ADN, de faire passer un brin ou un segment à travers la coupure et de refermer la brèche. On distingue deux types de topoisomérase. Les topoisomérase I (monomériques) induisent des cassures monobrins permettant au brin intact de se désenrouler, tandis que les topoisomérase II (dimériques) induisent la coupure de deux brins pour permettre le passage d'un double brin intact à travers le pont ouvert.

a) Les inhibiteurs de topoisomérase I

Certaines tumeurs présentent une concentration cellulaire en topoisomérase I plus élevée que celle observée dans les cellules saines. Cette enzyme constitue donc une cible sélective des cellules cancéreuses.



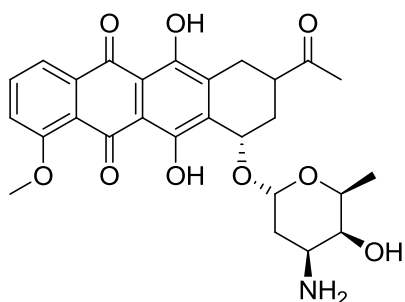
Les camptothécines constituent la famille principale d'agents anti-topoisomérase I. Il semblerait (le mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé) qu'elles soient capables d'interagir avec le complexe ADN-topoisomérase I pour former un complexe ternaire stable dit « complexe clivable ».

La formation de ce complexe empêcherait de relier les brins coupés (religation) entraînant ainsi l'endommagement de l'information génétique.

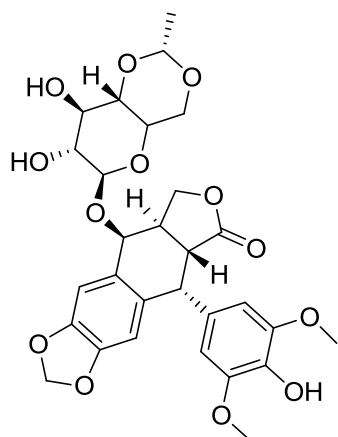
b) Les inhibiteurs de topoisomérases II

Peu d'agents actuellement sur le marché sont uniquement des inhibiteurs de topoisomérases II. En effet, c'est souvent le cumul de plusieurs facteurs qui entraîne la destruction de la cellule cancéreuse. Cependant deux catégories peuvent être globalement définies :

Les intercalants sont des espèces présentant un système plan capables de se lier à l'ADN en s'intercalant entre deux bases de nucléotides adjacents et en les empêchant de se séparer. Souvent, l'adduit formé interfère avec le complexe ADN-topoisomérase II impliquant des effets délétères directs sur l'ADN. Cette famille de molécules est largement utilisée contre un large spectre de tumeurs.



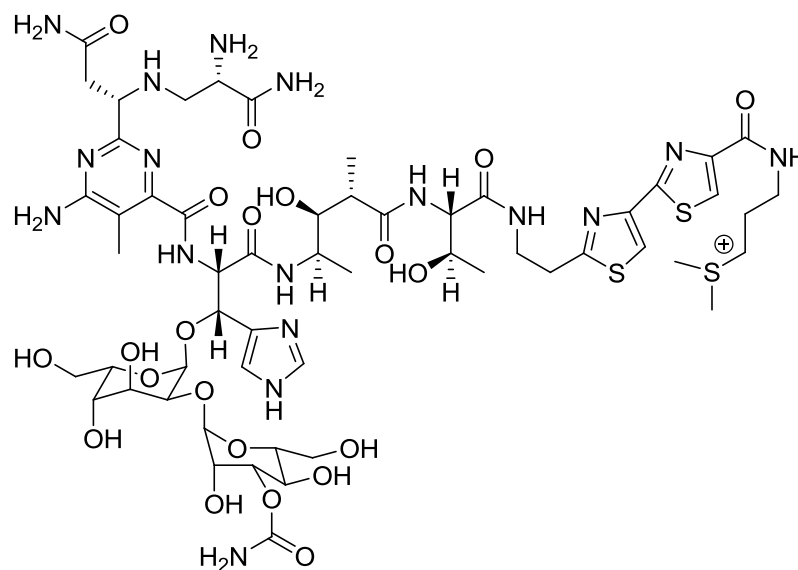
La daunorubicine extraite de *Streptomyces pencetius* possède une structure anthracycline. Son mode d'action est complexe puisque intercalant, elle est capable de former des radicaux libres et altère le fonctionnement de la membrane cellulaire.



Les analogues de podophyllotoxine, extraite des racines et rizomes des espèces podophylles sont des inhibiteurs non intercalants des topoisomérases II. L'étoposide est capable ainsi d'inhiber l'entrée en mitose de la cellule. Son mécanisme d'action fait encore l'objet d'hypothèse. La formation de liaisons covalentes avec l'ADN et la topoisomérase II créerait un complexe ternaire stable empêchant le rétablissement de la liaison phosphodiester au niveau de l'ADN.

c) Les poisons de l'ADN

Il existe quelques molécules capables de dégrader directement l'ADN par complexation. C'est le cas des bléomycines, composés glycopeptidiques isolés de la culture de bactéries. La dégradation de l'ADN s'opère quand les bléomycines se complexent avec Fe^{2+} en présence d'oxygène moléculaire et d'un agent réducteur comme cofacteur. Les radicaux générés lors de cette complexation sont à l'origine de coupures double brin entraînant la mort de la cellule.

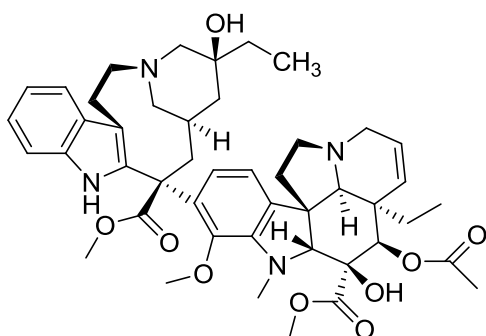


4. Molécules actives au niveau de la mitose

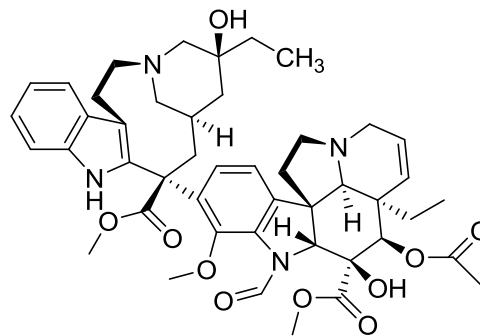
Les agents antimitotiques bloquent la division cellulaire en empêchant la synthèse des microtubules et la formation du fuseau mitotique. Ce fuseau est vital pour la division cellulaire, qui ne peut alors plus s'effectuer.

a) Inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline

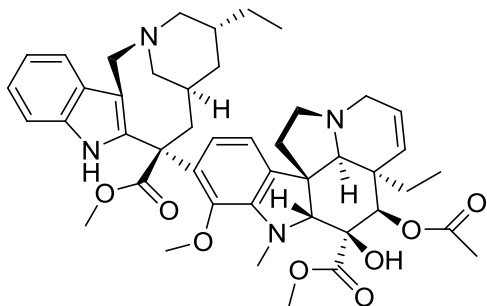
A partir de la pervenche de Madagascar, ont été isolés les alcaloïdes indoliques doubles, vincristine et vinblastine



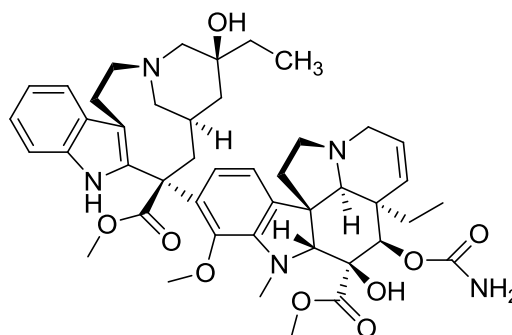
Vincristine



Vinblastine



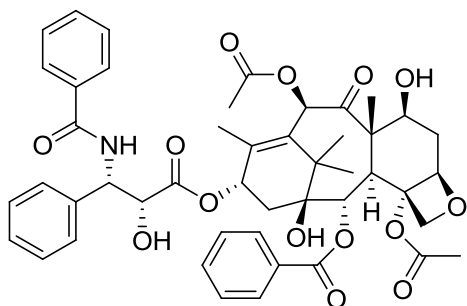
Vinorelbine



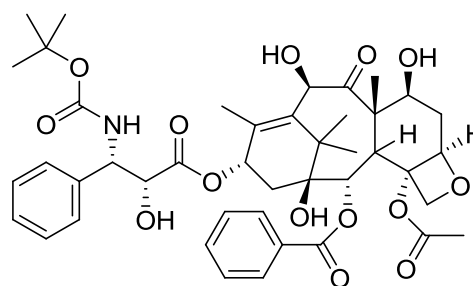
Vindésine

b) Inhibiteurs de la dépolymérisation de la tubuline

Les taxoïdes sont la famille la plus représentative de ce type d'inhibiteurs. Ils complexent la tubuline et se comportent comme des stabilisateurs du fuseau qui perd ainsi sa dynamique et ses fonctionnalités. La mort de la cellule survient par désorganisation du réseau mitotique. Le paclitaxel et le docétaxel sont largement utilisés pour soigner les cancers du sein et de l'ovaire.



Paclitaxel



Docetaxel

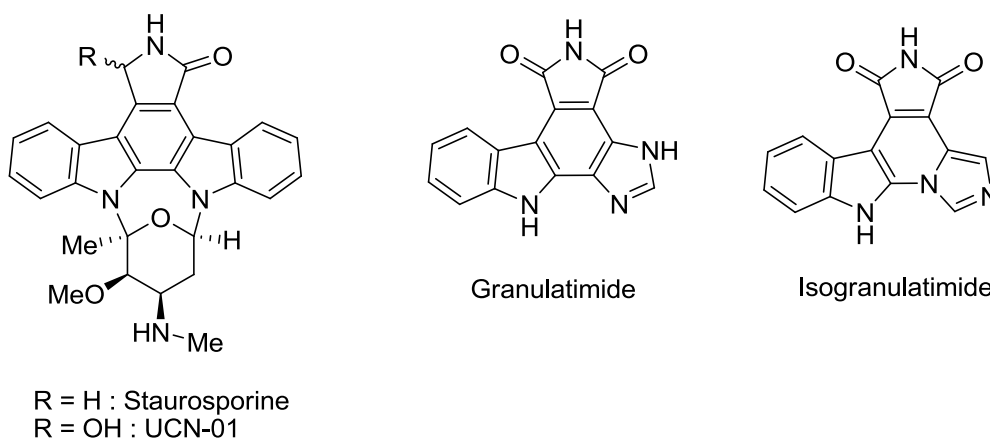
III. Une nouvelle voie de recherche : les structures

indolocarbazoles

La majorité des substances utilisées en thérapie anticancéreuse affectent à un certain point la mitose ou la synthèse et la fonction de l'ADN. Les problèmes majeurs de toute chimiothérapie restent la résistance aux agents anticancéreux et les effets secondaires qu'ils induisent, d'où la nécessité de mettre à jour de nouvelles voies de recherche pour cibler plus efficacement et plus sélectivement les cellules malignes.

Parmi ces nouveaux axes de recherche, certains s'intéressent au contrôle du cycle cellulaire, notamment à l'inhibition des kinases intervenant dans sa régulation.¹⁴ Ainsi un nouveau concept se développe depuis quelques années ayant trait à l'inhibition du checkpoint G2. En effet, comme décrit plus haut, les checkpoints G1 et G2 sont des points de contrôle permettant à une cellule ayant un ADN altéré de stopper la progression du cycle cellulaire pour réparer ce dernier. 70 % des cellules cancéreuses ayant un p53 muté, ne peuvent pas réparer leur ADN au niveau du G1, leur seule possibilité reste de procéder à la réparation au niveau du G2. D'où l'idée d'une combinaison thérapeutique qui associerait un agent actif sur l'ADN (capable de détériorer l'ADN des cellules cancéreuses) et un inhibiteur de checkpoint G2 (qui les empêcherait de réparer leur ADN).

Parmi les composés décrits pour inhiber le checkpoint G2, on répertorie deux alcaloïdes marins, la granulatomide et l'isogranulatomide issus de l'ascidie *Didemnum granulatum*¹⁵ ou la staurosporine isolée de *streptomyces staurosporus* et son analogue synthétique l'UCN-01.¹⁶



Il faudra attendre 2004 et la publication par Andersen d'une structure résolue par diffraction des rayons X du co-cristal Chk1/isogranulatimide (Figure 6) pour connaître la cible de cette nouvelle famille d'alcaloïdes.¹⁷

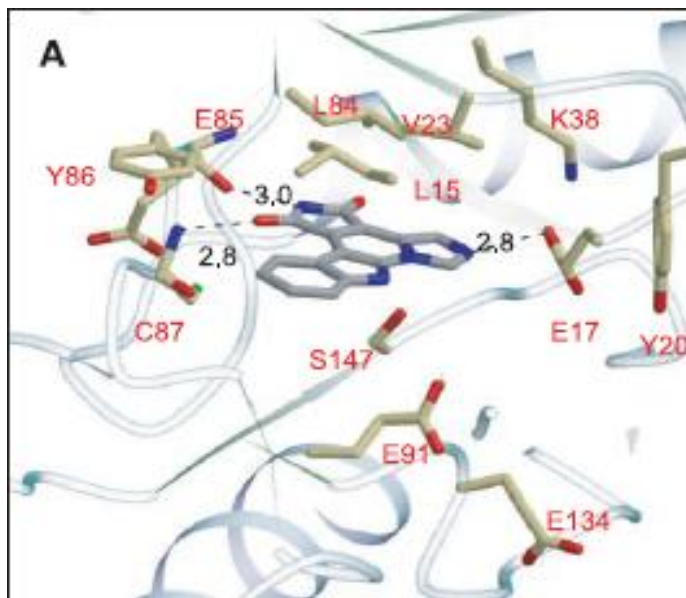


Figure 6 : Co-cristal Chk1/Isogranulatimide résolu par diffraction des rayons X

D'un point de vue structural, la granulatinimide comporte un noyau carbazole (A, B, C), fusionné au niveau du cycle benzénique C à un noyau pyrrole (D) et à un cycle imidazole (E).

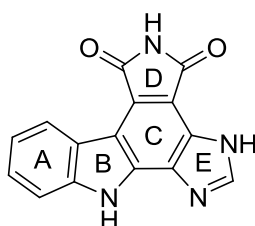


Figure 7 : structure de la granulatinimide

Dans le but de mettre à jour des analogues plus efficace des produits naturels, nous nous sommes intéressés aux voies d'accès décrites dans la littérature ainsi que les relations structures activités.

A. Voies d'accès à ces composés

Il existe trois voies principales d'accès aux dérivés pyrrolocarbazoles. Deux d'entre elles ont été appliquées en premier lieu à la synthèse du produit naturel.

La première, décrite par Piers *et al.*¹⁸, et présentée Schéma 1, est basée sur la méthodologie mise au point par Faul *et al.*¹⁹ pour obtenir des bis-indolocarbazoles. Elle met en jeu la condensation d'un amide et d'un glyoxylate. La formation du maléimide donne un intermédiaire analogue du didemnimide **1** alcaloïde présent dans *didemnum granulatum*. Cet intermédiaire est ensuite cyclisé photochimiquement. Les proportions dans lesquelles la granulatumide et l'isogranulatumide sont obtenues au cours de cette dernière étape sont variables. L'isogranulatumide y est largement sous représentée (moins de 10 %) et parfois même totalement absente. Cette observation a conduit Piers *et al.* à considérer que la conversion de **1** en isogranulatumide est peut-être thermique. Après vérification de cette hypothèse et optimisation de la réaction, l'isogranulatumide est préparée avec un rendement de 75 % en chauffant 20 h à 200°C, dans le nitrobenzène.

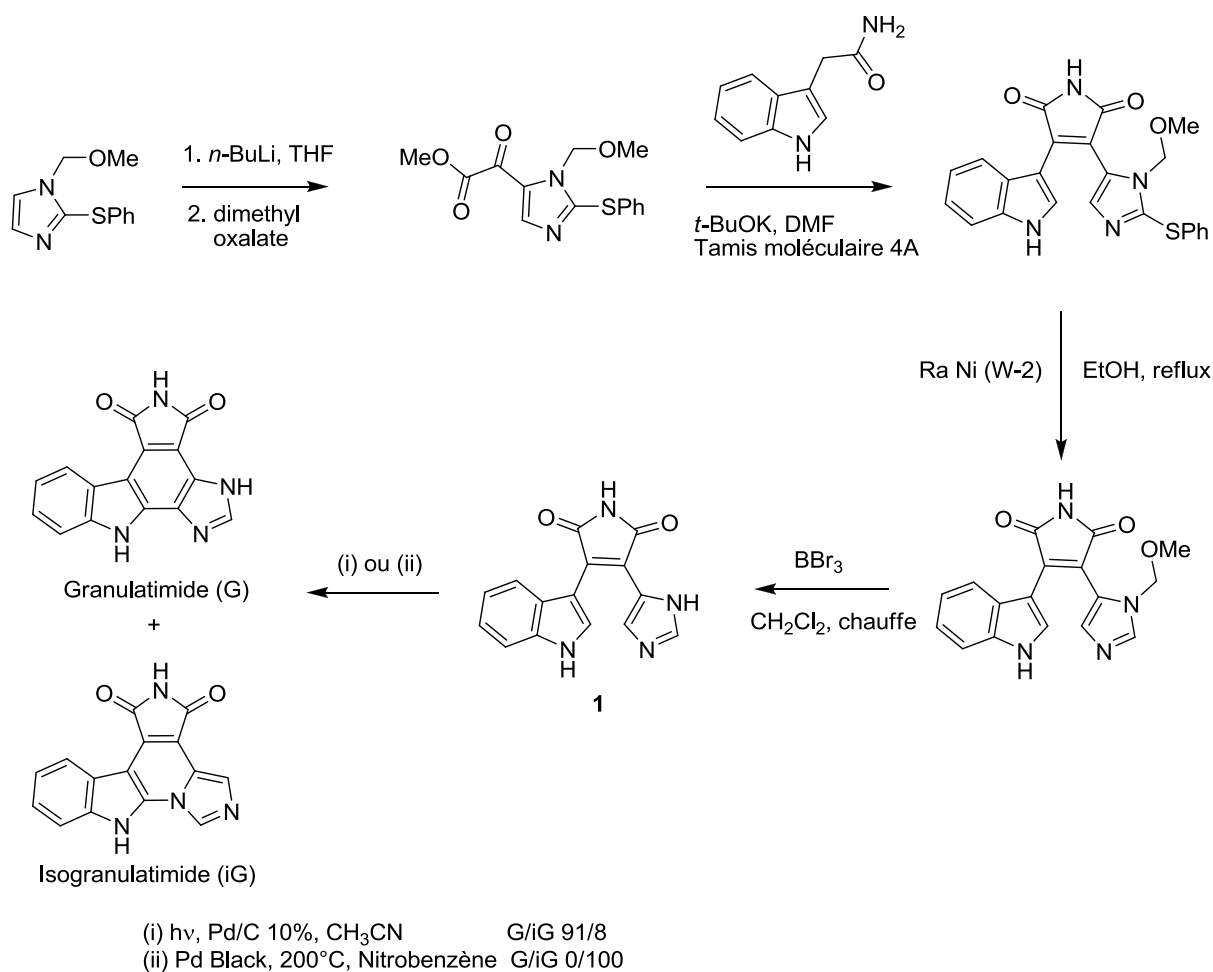


Schéma 1 : Synthèse des produits naturels par Piers et al.

La deuxième voie de synthèse, plus récente, a été mise au point par Yoshida *et al.*²⁰ Cette fois-ci, un couplage de Stille fournit le synthon **2** de base sur lequel on additionne le dibromomaléimide afin d'obtenir l'intermédiaire à cycliser **3** (Schéma 2). Contrairement à la synthèse développée par Piers *et al.* cette méthode n'est pas applicable à la synthèse de la granulaticimide

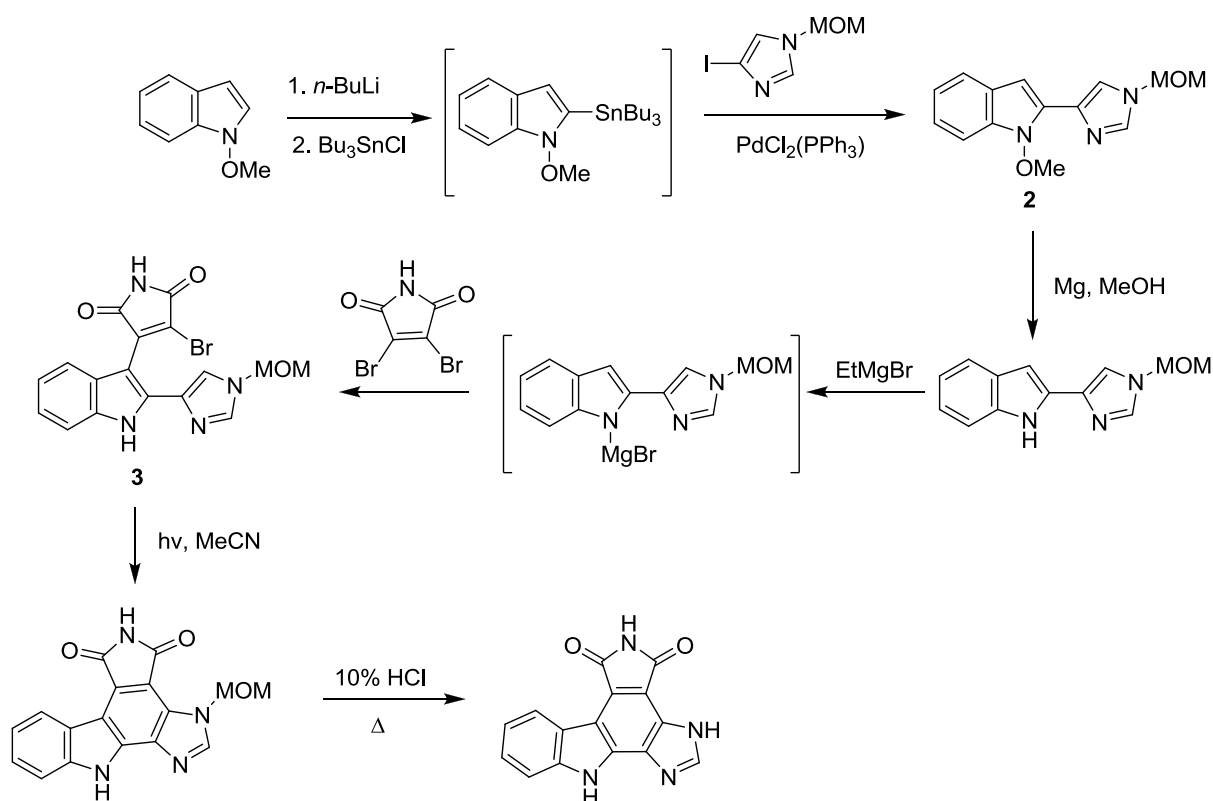


Schéma 2 : Synthèse du produit naturel par Yoshida et al.

La dernière voie de synthèse pour accéder à des composés analogues des produits naturels, mise au point par l'équipe de Prudhomme (Schéma 3)²¹, fait intervenir le même type de synthon que la méthode de Yoshida mais obtenu cette fois par condensation du pyrrole sur le 3-bromoindole. Cette réaction est calquée des travaux de Bocchi et Palla^{22,23} pour préparer des composés de type biindolyls et indolylpyrroles. Le synthon **4** est couplé au maléimide en présence de SnCl₂, dans le toluène à reflux. La cyclisation finale est réalisée avec du Pd black dans le nitrobenzène à reflux.

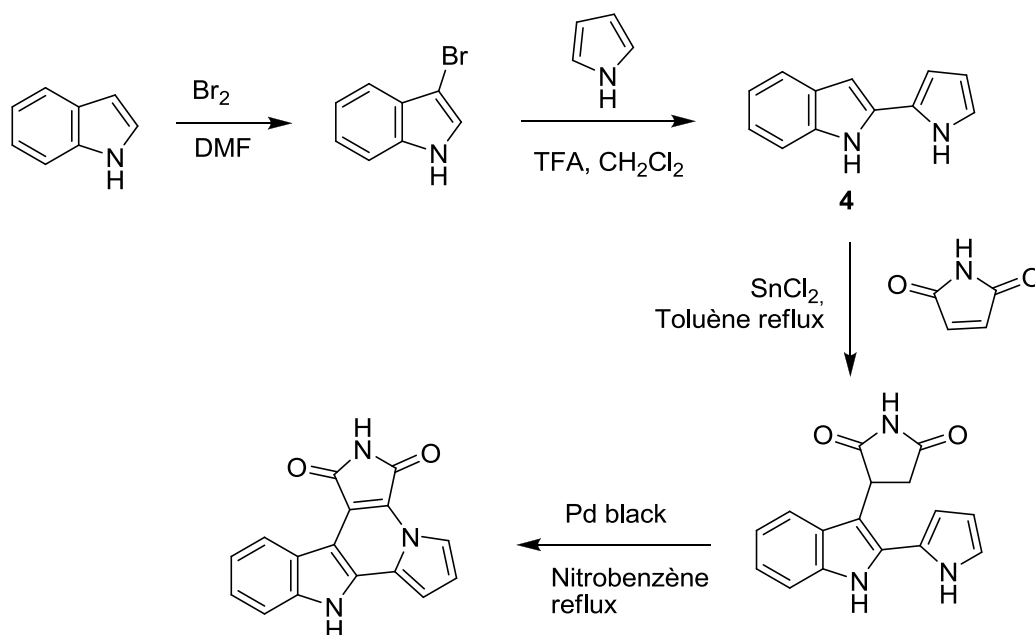


Schéma 3 : Voie de synthèse mise au point par l'équipe Prudhomme

B. Analogues de type pyrolocarbazoles inhibiteurs de la Chk1 - Relations Structure/Activité

Dans le but de conduire une étude des relations structure/activité vis-à-vis de la Chk1, ces voies de synthèse ont été utilisées par différentes équipes pour accéder à des analogues des produits naturels.

1. Pyrolocarbazoles analogues structuraux des produits naturels

Les premiers analogues **5-14** de la granulatimide ou de l'isogranulatimide, représentés Figure 8, ont été proposés par Piers et Yoshida.^{20,24,25,26} Aucune de ces molécules n'a montré d'amélioration significative de l'inhibition du checkpoint G2 par rapport aux produits naturels. Les composés **13** et **14** se sont même montrés bien moins puissants.

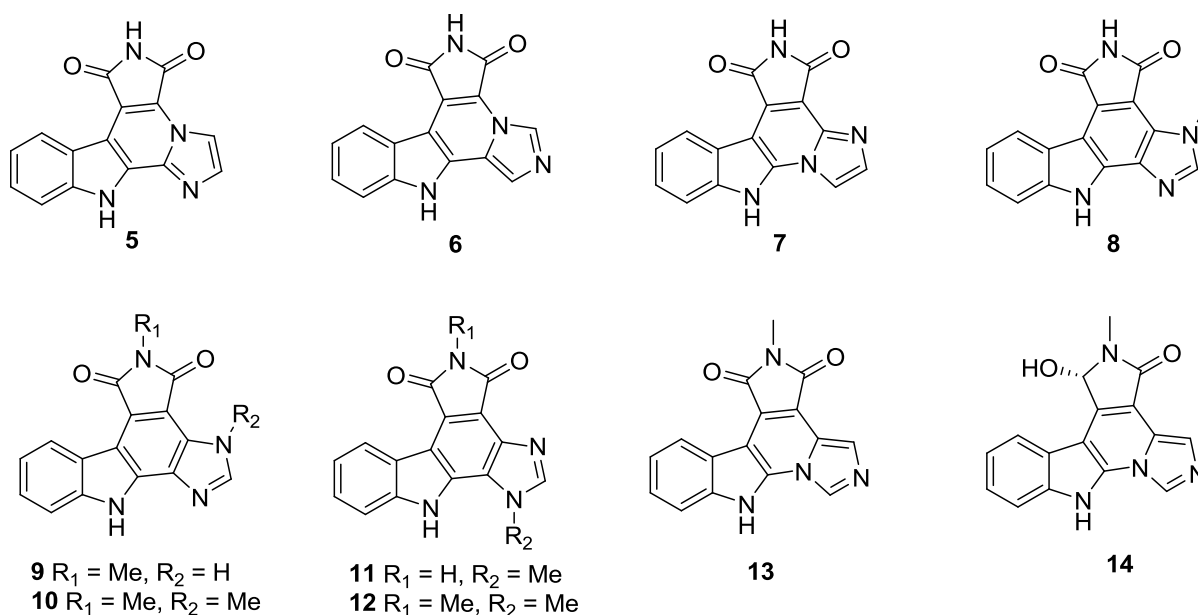


Figure 8 : Analogues structuraux de l'isogranulatimide

2. Substitution du noyau imidazole par un noyau pyrrole ou maléimide

De nombreux analogues dont le noyau imidazole a été substitué par un noyau pyrrole ont été synthétisés. Parmi les plus efficaces, nous pouvons citer le travail de Prudhomme *et coll.* qui se sont intéressés aux molécules représentées Figure 9.

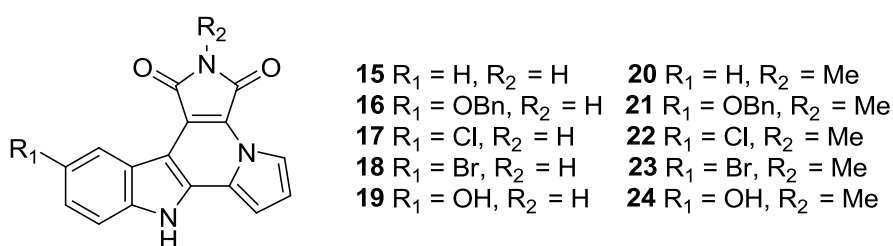
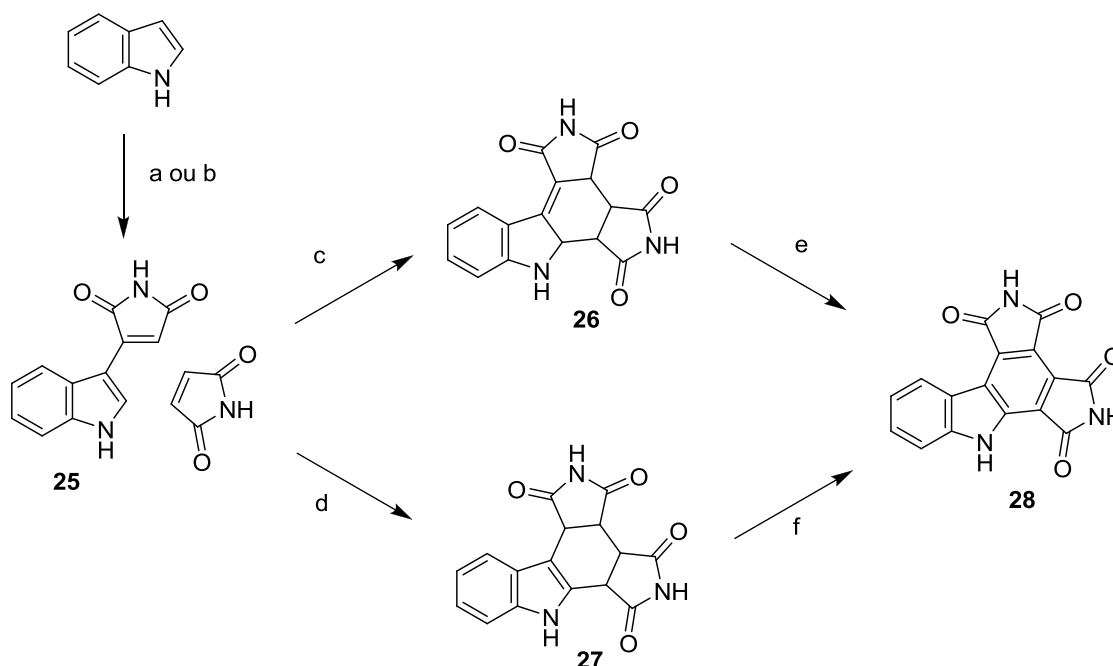


Figure 9 : Analogues pyrroles synthétisés par l'équipe Prudhomme

La même équipe a aussi étudié une série de composés, obtenus selon le schéma réactionnel suivant dans laquelle le motif imidazole a été remplacé par un deuxième noyau maléimide (Schéma 4).²⁷ Dans la voie de synthèse utilisée, décrite plus tôt par Bergman *et al.*²⁸, le premier synthon **25** peut être obtenu soit par addition du bromomaléimide sur l'indole, via le dérivé Grignard ou après oxydation de l'adduit de Michael résultant de l'addition du

maléimide sur l'indole dans l'acide acétique glacial. Les composés **26** et **27** sont issus de la cycloaddition d'un noyau maléimide sur le synthon **25** dans le xylène à reflux. L'obtention de l'un ou de l'autre dépend de la méthode de purification. Enfin, l'oxydation des composés **26**, avec du TFA, et **27**, avec du DDQ donne le produit **28**.



a. EtMgBr puis 3-bromomaléimide b. maléimide, CH₃COOH puis DDQ, dioxane c. reflux de xylène puis filtration d. reflux de xylène puis chromatographie sur gel de silice e. TFA dioxane f. DDQ, dioxane.

Schéma 4 : Synthèse des dérivés maléimides

Les analyses d'activité biologique ont donné des résultats encourageants en ce qui concerne les molécules **15**, **17**, **18** et **19** pour la série pyrrole. Ces molécules se révèlent être de meilleurs inhibiteurs de la Chk1 que les produits naturels. De plus les molécules **17** et **18** montrent aussi une meilleure sélectivité vis-à-vis de l'enzyme.²⁹ Pour la série maléimide, les composés les plus puissants en terme d'inhibition de la Chk1 sont représentés Figure 10. Les molécules **29** et **30** ont une IC₅₀ de 2 et 8 nM, les rendant plus efficaces que les produits naturels, seul le composé **29** montrant une faible cytotoxicité.³⁰

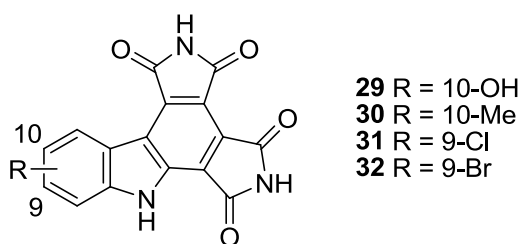
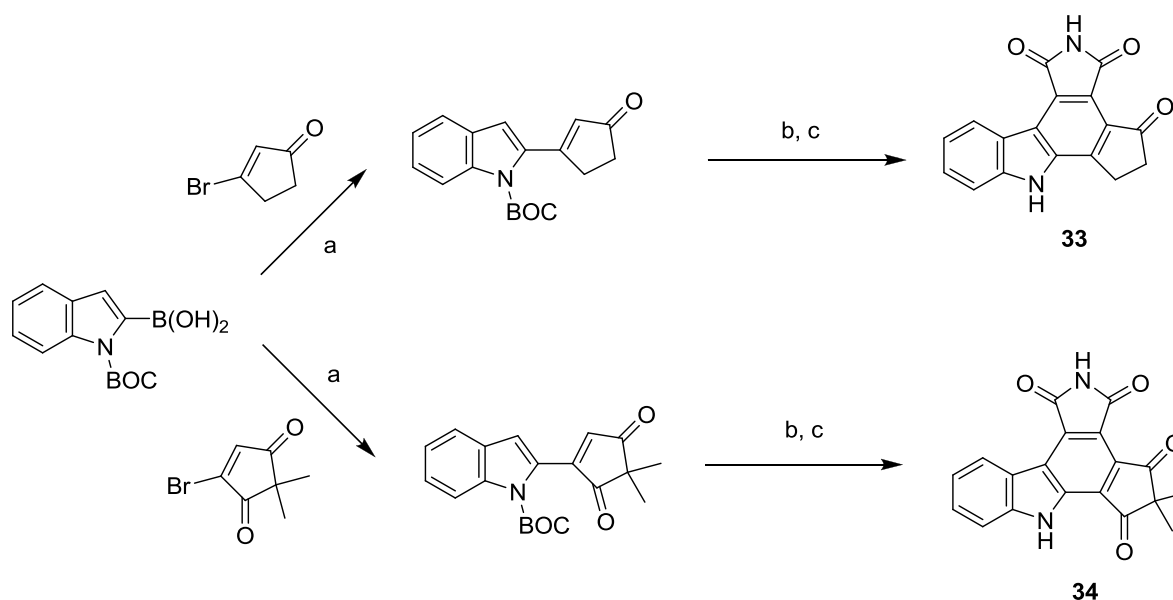


Figure 10 : Dérivés maléimide.

3. Substitution du noyau imidazole par un cycle non aromatique à cinq ou six chaînons

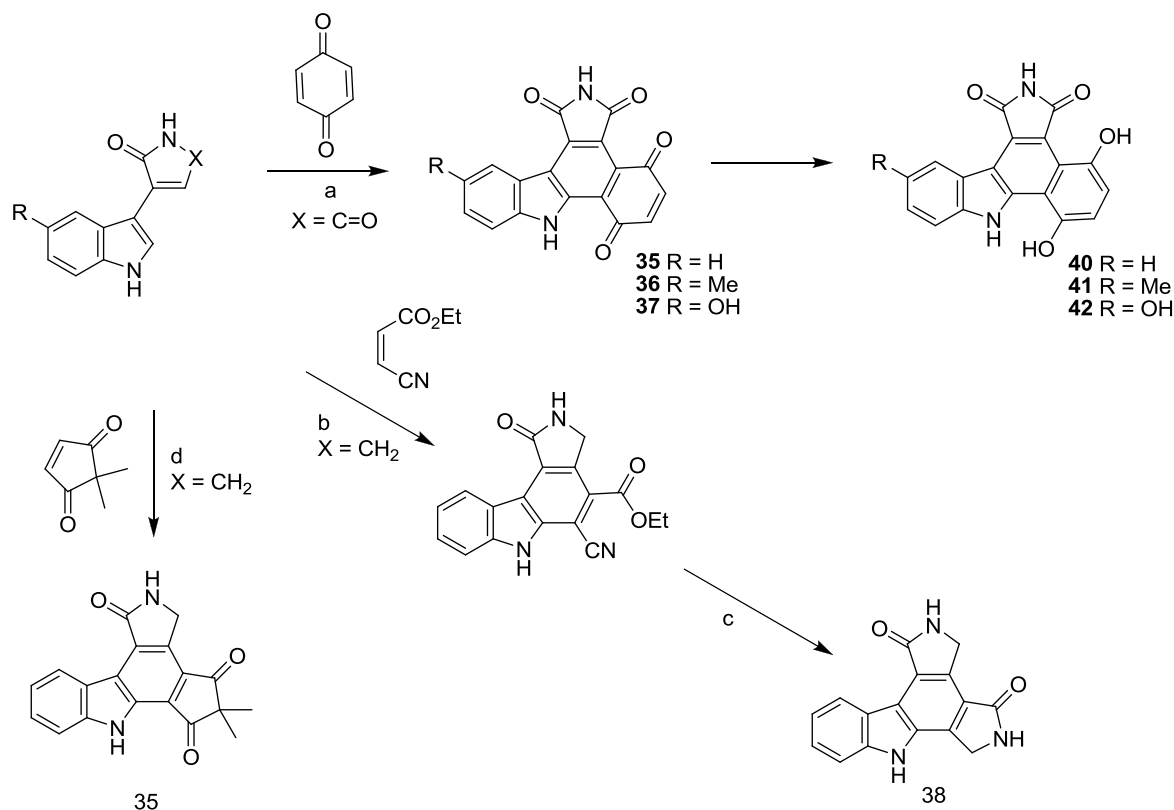
Les composés **33** et **34** ont été synthétisés par Conchon *et al.* via une réaction de Suzuki entre un dérivé boronique et un cycle bromé, suivie d'une réaction de Diels-Alder, (Schéma 5).



a. Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, benzene, EtOH, TA b. maléimide, toluène, tube scellé, 3 jours c. DDQ, dioxane, TA, 48h.

Schéma 5 : Synthèse de dérivés portant un cycle non aromatique à cinq centres

Les composés **35** à **39** ont été obtenus eux, via une réaction de Diels-Alder entre un indolylmaléimide et différents diénophiles. La réduction de la quinone des composés **35** à **37** a abouti à la synthèse de trois nouveaux composés, **40** à **42** (Schéma 6). Ces modifications ont permis d'obtenir dix nouveaux analogues dont les plus actifs, les composés **37** et **38**, présentent une IC₅₀ de 27 et 24 nM respectivement. On peut en conclure que le cycle D peut être remplacé par un carbonyle sans qu'il n'y ait de perte d'activité vis-à-vis de la Chk1.^{31,32}



a. toluène, tube scellé, 140°C, 12h b. (1) toluène, reflux, 5 jours, (2) DDQ, dioxane, 20h c. (1) NaH, THF, TBDMSCl, (2), H₂, DMF, nickel de Raney, 7 jours d. toluène, 140°C, tube scellé, 7 jours.

Schéma 6 : Analogues obtenus par réaction de Diels-Alder

4. Modification ou absence des cycles D et E

Deux autres séries de molécules représentées Figure 11 ont été synthétisées. Les composés de la première série ont été obtenus à partir de la réaction de l'éthyl-3-oxo-(1H-indol-3-yl)propionate et du N-BOM-dibromomaléimide alors que la deuxième série est préparée par réaction de Diels-Alder entre l'indolylmaléimide et l'acrylate d'éthyle.³³

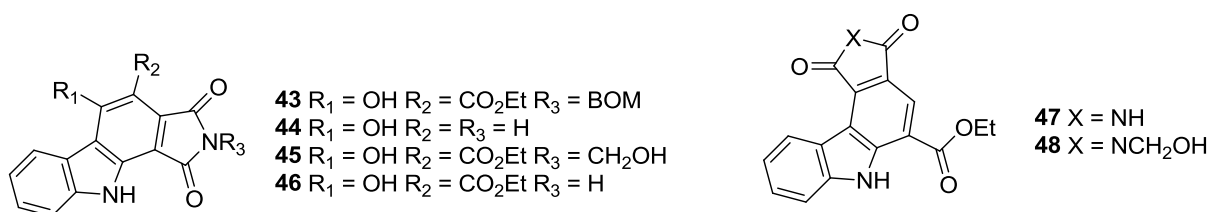


Figure 11 : Dérivés dont le cycle D ou E est modifié ou absent

Les composés dont le cycle D est manquant se sont révélés être de mauvais inhibiteurs de la Chk1, prouvant ainsi la nécessité de ce cycle. Pour les molécules dont le cycle E est absent, il n'est pas observé de grande modification de l'inhibition de la Chk1, l'introduction d'un substituant portant un groupement hydroxyle sur l'azote de l'imide ne perturbant pas non plus l'inhibition.

C. Analogues de type pyrrolocarbazoles inhibiteurs d'autres kinases

D'autres analogues de type pyrrolocarbazoles ont aussi été étudiés qui se sont révélés de bons, voire d'excellents inhibiteurs d'autres kinases.

1. Inhibiteurs de la PARP-1

La poly (ADP Ribose) polymérase 1 (PARP-1) est une protéine senseur, capable de repérer les ruptures sur un brin d'ADN. Elle détecte donc les atteintes génétiques. Récemment, une série de molécules inhibitrices de la PARP-1 a été décrite dont la structure est présentée Figure 12.

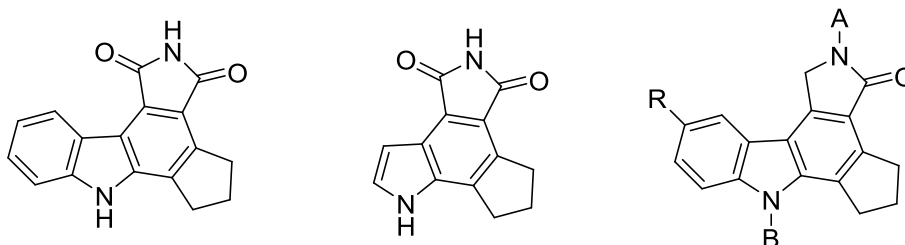


Figure 12 : Pyrrolocarbazoles inhibiteurs de la PARP-1

Tableau 1 : Pyrrolocarbazoles inhibiteurs de PARP-1

Composé	A	B	R	IC ₅₀ PARP-1 (nM)
45	-	-		36
46	-	-		40
47	H	H	H	56
48	H	H	Cl	120
49	H	H	Br	30
50	H	H	CN	18
51	H	H	CO ₂ H	80
52	H	H	CO ₂ Me	59
53	H	H	CONH-(CH ₂) ₂ -NMe ₂	165
54	H	H	CON(Me)-CH ₂ -pyrid-4-yl	65
55	H	H	CON(Me)-CH ₂ -pyrid-2-yl	237
56	H	H	CH ₂ NHCOCH-(NHBOC)[((CH ₂) ₄ NHBOC)]	670
57	H	Me	H	800
58	Me	Me	H	10 000
59	CHO	H	H	3 000

Ce sont 24 molécules qui ont été décrites avec des combinaisons de substituants ou A peut être H, Me, CHO, X : H ou Me et R, H, Halogène, Me, COOH, COOMe, ou plus complexe dont certaines sont représentées dans le tableau 1.

L'IC₅₀ des molécules décrites varie entre 18 et 10 000 nM. Les relations structure-activité montrent qu'il faut que A soit un hydrogène pour observer une inhibition. Le même raisonnement est aussi valable pour B mais à une moindre mesure.^{34,35}

2. *Inhibiteurs du complexe D1/CDK4*

L'association de CDK4 avec des cyclines forme un complexe important pour la progression du cycle cellulaire. Son inhibition peut conduire à son arrêt. Les laboratoires Lilly Research ont réalisé la synthèse de composés pyrrolocarbazoles portant un deuxième cycle

aryle ou hétéroaryle. Leur méthode de synthèse pour accéder à ces composés est adaptée du travail de Faul et leur permet l'obtention de 25 composés dont la structure générale est donnée Figure 13.

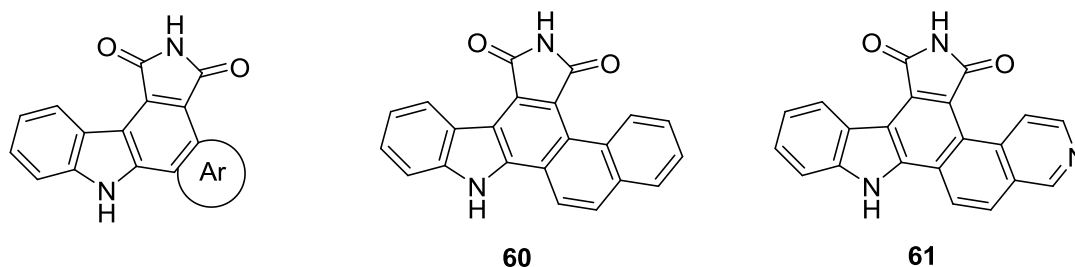


Figure 13 : Inhibiteurs de D1/CDK4 synthétisés par Lilly Research

Les composés les plus actifs sont ceux comportant un résidu naphtyl avec des IC_{50} de 45 nM (**60**) ou une quinoline, (**61**, $IC_{50} = 69$ nM).^{19,36,37,38}

3. Inhibiteurs de la GSK-3

En 2004, dans le but de développer des complexes du ruthénium ciblant le site ATP de diverses kinases, Meggers *et al.* se sont intéressés à des analogues de la granulatimide dans lesquels le noyau imidazole est remplacé par une pyridine. Ils ont ensuite complexé le squelette obtenu à du ruthénium afin d'en bloquer la configuration et d'empêcher deux liaisons hydrogènes. Leurs complexes sandwichs de ruthénium ont été engagés vis-à-vis d'un panel de 57 kinases. Une forte inhibition a été observée avec la Glycogen Synthetase Kinase 3, ou GSK-3. Il est important de préciser que cette enzyme joue un rôle clé dans la régulation de la glycémie, son dérèglement pouvant engendrer des cancers.³⁹

La structure générale de ces complexes est donnée Figure 14. En jouant sur la nature des substituants sur le cyclopentadienyle ou sur les ligands du ruthénium, ce groupe a pu atteindre une inhibition inférieure à 0,04 nM.^{40, 41, 42, 43, 44}

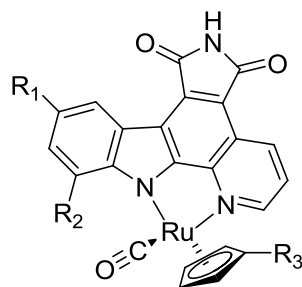
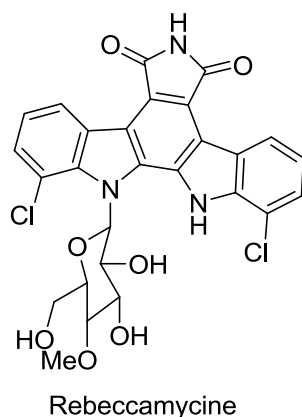


Figure 14 : Structure générale des complexes de ruthénium synthétisés par Meggers

4. Rebeccamycine, staurosporine et analogues

La rebeccamycine, alcaloïde issu de *Saccharotrix aerocoligines*, et la staurosporine peuvent être considérées comme des analogues de la granulatimide pour lesquels le noyau imidazole serait remplacé par un deuxième noyau indole.



Un grand nombre d'analogues de la rebeccamycine a été étudié notamment pour affiner les relations structure/activité vis-à-vis des topoisomérases dont l'inhibition explique les propriétés anticancéreuses de ces composés. La staurosporine est elle, un inhibiteur non-sélectif de kinases. Certains de ces composés se sont révélés capables d'inhiber les topoisomérases ou le complexe D1/CDK4 ou la phosphorylation de Rb ou d'arrêter le cycle en G1. De plus, ils sont généralement cytotoxiques. Nous ne détaillerons pas ces travaux qui ont fait l'objet de plusieurs mises-au-point.^{45, 46, 47}

Cette variété de structures et d'activités prouve une certaine maniabilité du spectre d'action de ces produits mais une certaine imprévisibilité quant à la cible de ces squelettes.

CHAPITRE II

SYNTHESE CHIMIQUE
DE NOUVEAUX
ANALOGUES DE LA
GRANULATIMIDE

Au cours de ce travail visant à définir des analogues de la granulatinimide, nous nous sommes intéressés à deux types de cœurs hétérocycliques, à savoir (Figure 15):

- (i) des analogues pentacycliques, pour lesquels la diversification a été envisagée via la substitution du noyau imidazole E par un noyau pyrrole ou pyrazole (X) et l'introduction de divers substituants (R_1 et R_2).
- (ii) des analogues tétracycliques, pour lesquels le cycle A a été supprimé et les cycles B et E ont été substitués par deux hétérocycles à cinq chaînons pouvant être un noyau pyrrole, pyrazole, imidazole ou un deuxième maléimide (Y et Z).

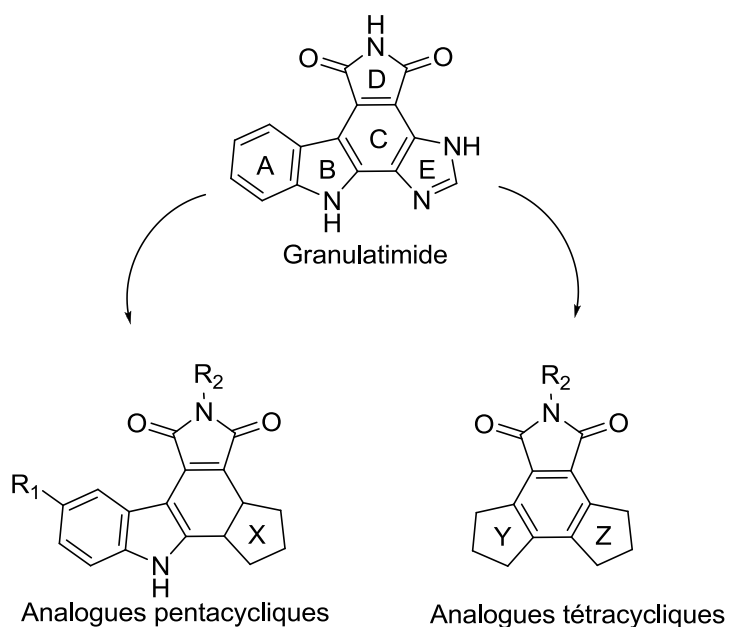


Figure 15 : Structure des dérivés de la granulatinimide ciblés

Partie 1 : SYNTHÈSE D'ANALOGUES PENTACYCLIQUES DE LA GRANULATIMIDE

Dans cette première partie, nous avons choisi de nous intéresser à deux séries d'analogues pentacycliques des composés naturels granulatinimide et isogranulatinimide, à savoir une série pyrrole et une série pyrazole (Figure 16). Dans la « série pyrrole », le cycle imidazole a été remplacé par un cycle pyrrole, tandis que dans la « série pyrazole », ce même cycle imidazole a été remplacé par un cycle pyrazole. Dans cette dernière série, deux types de structures régioisomères A et B ont été envisagées selon la position des deux atomes d'azote de l'unité pyrazole introduite.

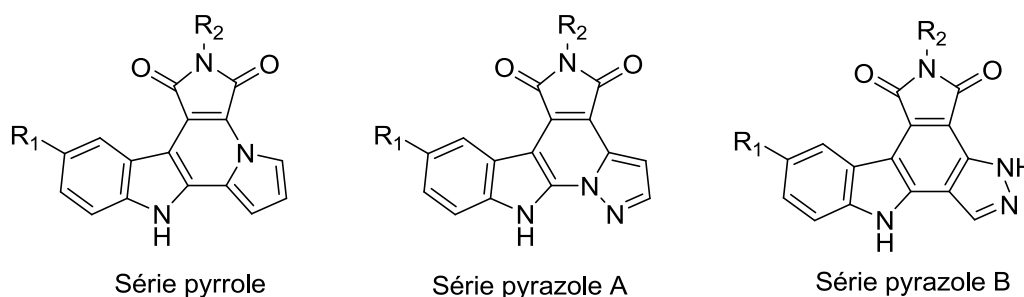


Figure 16 : Structure des séries pentacycliques envisagées

Le « design » de ces trois séries a été guidé à la fois par les données relatives aux relations protéines/ligand montrant le rôle crucial du motif maléimide pour l'ancrage du substrat dans le site catalytique de la Chk1 ainsi que par les relations structure/activité disponibles dans la littérature.^{48,49,47}

Quatre substituants différents ($R_1 = \text{H}, \text{OH}, \text{Me}$ et OMe) en position para de l'azote de l'indole ont été étudiés. Le choix des substituants OH et Me s'est fait par analogie avec une autre série développée par Prudhomme dans laquelle le cycle imidazole a été remplacé par un deuxième motif maléimide.⁵⁰ Ces composés sont les analogues de la granulatinimide qui, à notre connaissance, inhibent la Chk1 avec le plus d'efficacité ($\text{IC}_{50} = 2$ et 8 nM) (Figure 17).

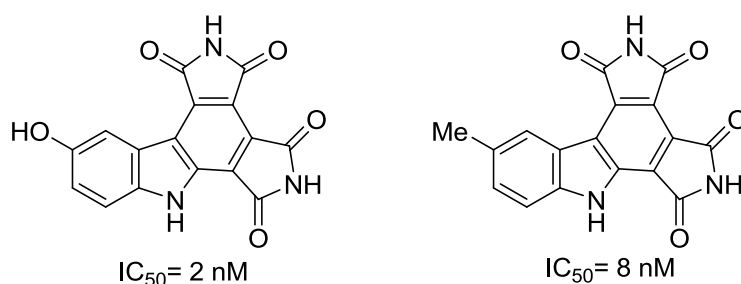


Figure 17 : Meilleurs inhibiteurs de la Chk1 synthétisés par l'équipe de Prudhomme

I. Synthèse des analogues pyrroles

Une série de composés de la famille « pyrrole » a déjà été proposée par le groupe de Prudhomme.²¹ En nous appuyant sur ce travail, nous souhaitons d'une part nous familiariser avec les différentes voies de synthèse proposées pour accéder à ce type de composés mais aussi proposer des analogues originaux.

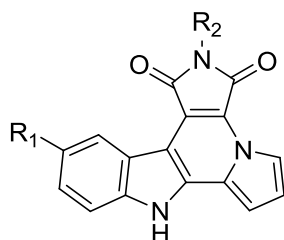


Figure 18 : Structure de la série pyrrole

Parmi les composés envisagés, deux ont déjà été décrits ($R_1 = H$ et OH , $R_2 = H$), les trois autres ($R_1 = OMe$ et Me , $R_2 = H$, $R_1 = OMe$, $R_2 = Me$) étant originaux. Le dernier composé ($R_1 = OMe$, $R_2 = Me$) dans lequel l'azote du maléimide porte un groupement méthyle a été étudié pour servir d'élément « négatif » aux tests. En effet, ce composé ne devrait pas présenter d'activité vis-à-vis de la Chk1, le NH du maléimide jouant un rôle crucial dans l'ancrage de la molécule au site actif de l'enzyme.⁴⁸

Pour accéder à ce type de composés, Prudhomme *et al.* ont envisagé le schéma de rétrosynthèse suivant : le squelette **4** de cette série pyrrole est construit sur la base d'une

réaction de couplage d'un noyau indole avec le pyrrole, l'adduit **2** obtenu étant ensuite couplé au maléimide pour fournir **3** qui est finalement cyclisé en **4**.

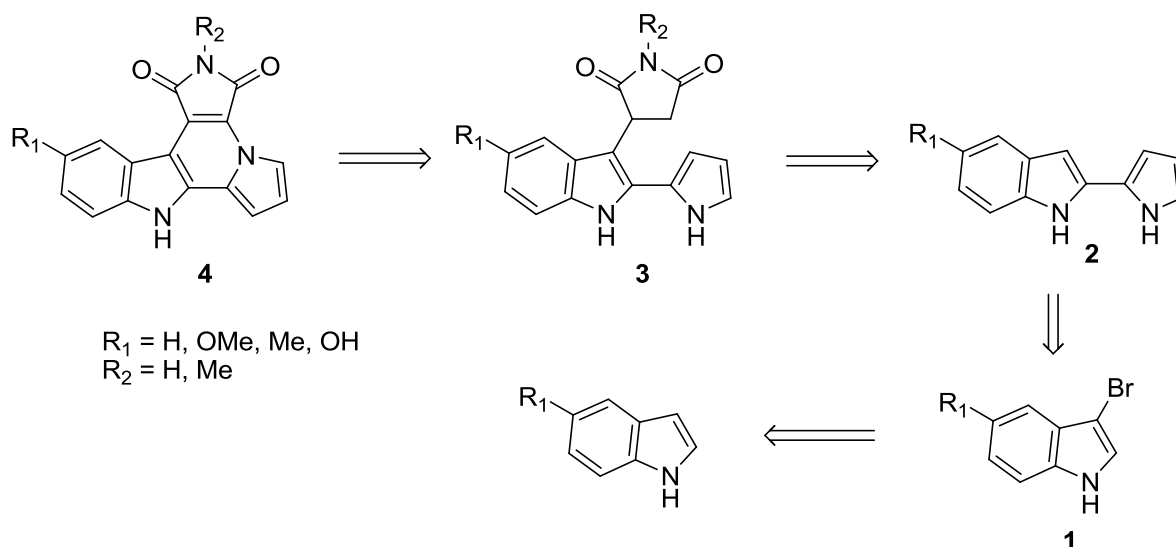


Schéma 7 : Schéma rétrosynthétique décrit par Prudhomme et al.²¹

A. Préparation des intermédiaires **1** : bromation régiosélective de noyaux indoliques (Schéma 7)

La bromation de la position 3 de l'indole a été décrite à plusieurs reprises avec divers systèmes de bromation : $\text{KBr-H}_5\text{IO}_6$,⁵¹ bromosuccinimide,⁵² dioxane dibromé⁵³ ou $\text{DMSO-Me}_3\text{SiBr}$.⁵⁴

La méthode la plus facile à mettre en œuvre a été celle décrite par Bocchi et ses collaborateurs, les conditions décrites consistant en l'addition de Br_2 goutte à goutte sur une solution d'indole substitué dans le DMF jusqu'à ce que persiste la couleur, la réaction est alors considérée comme totale (Schéma 8).²² Il est à noter que la régiosélectivité de la bromation respecte les règles de substitution électrophile aromatique d'un noyau indole, l'introduction du brome se faisant en position 3.

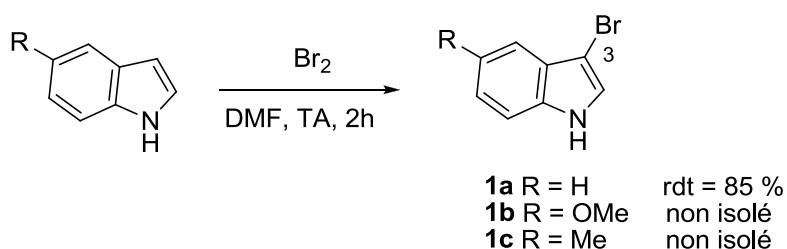


Schéma 8 : Réaction de bromation des indoles substitués

Grâce à cette méthode, nous avons préparé les 3-bromoindoles **1a-c** diversement substitués :

- **1a** a été obtenu à l'état solide avec un bon rendement de 85 % après traitement du milieu réactionnel par de l'ammoniaque puis isolement du produit par simple filtration.
- la précipitation de **1b** et **1c** n'ayant malheureusement pas été observée, une étape d'extraction au CH₂Cl₂ s'est avérée nécessaire. Après évaporation des phases organiques, **1b** et **1c** ont été isolés en présence de traces de DMF et engagés tels quels dans l'étape suivante. En effet, leur faible stabilité sous l'effet de la chaleur et/ou de la lumière ne nous a pas permis d'évaporer le DMF sans les détruire. En 2007, Prudhomme *et al.* ont aussi utilisé cette méthode en soulignant déjà la faible stabilité de ce type de dérivés.⁵⁵

B. Préparation des unités indolopyrroles **2** (Schéma 7)

Les unités 2-indolopyrroles **2a-c** ont été préparées par condensation acido-catalysée des **1a-c** avec le pyrrole dans les conditions décrites par Bocchi *et al.*, à savoir dans le dichlorométhane catalysé par le TFA à température ambiante (Schéma 9).⁵⁶ Si le mélange de réactifs est équimolaire, les auteurs ont observé la formation du produit de bicondensation **2'**. Ce problème est facilement contournable via l'utilisation d'un large excès de pyrrole, à savoir 2 équivalents de pyrrole pour un équivalent d'indole bromé **1**.

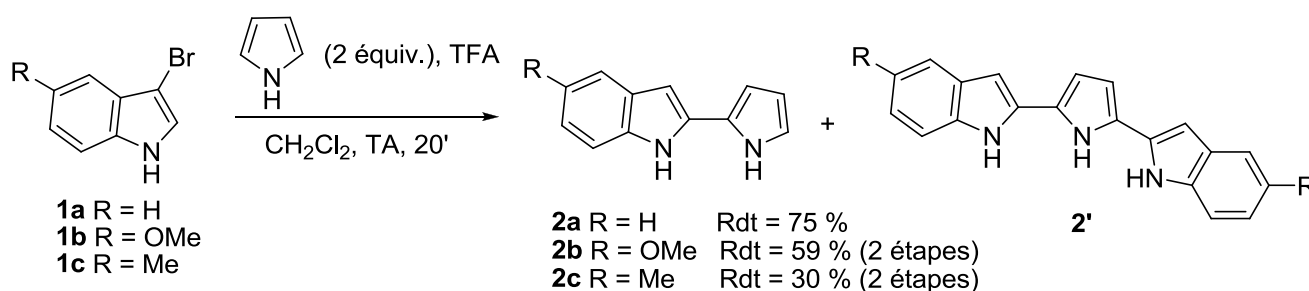


Schéma 9 : Préparation des indolo-pyrroles substitués

Dans ces conditions, nous avons pu préparer les trois unités indolopyrrole **2a-c**, **2a** ayant été obtenu à partir de **1a** avec un bon rendement de 75 % alors que **2b** et **2c** ont été obtenus avec des rendements plus modestes, de respectivement 59 % et 30 % (rendements calculés sur deux étapes à partir de l'indole commercial) (schéma 9). Il est à noter que la faible stabilité des bromoindoles **1a-c** conjuguée à la forte réactivité du pyrrole ont fait de cette réaction une étape délicate. En effet, en seulement 20 minutes, nous avons observé une disparition totale

des précurseurs **1a-c** pour donner les adduits **2a-c** mais aussi un produit de dégradation du pyrrole par polymérisation en milieu acide.

D'un point de vue mécanistique, cette condensation consiste formellement en une substitution électrophile aromatique du noyau pyrrole par l'électrophile **1a'** issu de la protonation régiosélective du motif 3-bromoindole **1a** (Schéma 10). Une fois la liaison C-C formée, l'élimination de HBr permet de réaromatiser le squelette indole et de fournir l'unité 2-pyrroloindole **2a** désirée. Il est à noter que la régiosélectivité de la transformation respecte les règles de substitution électrophile aromatique propre au noyau pyrrole, l'addition de l'indole se faisant en position 2.

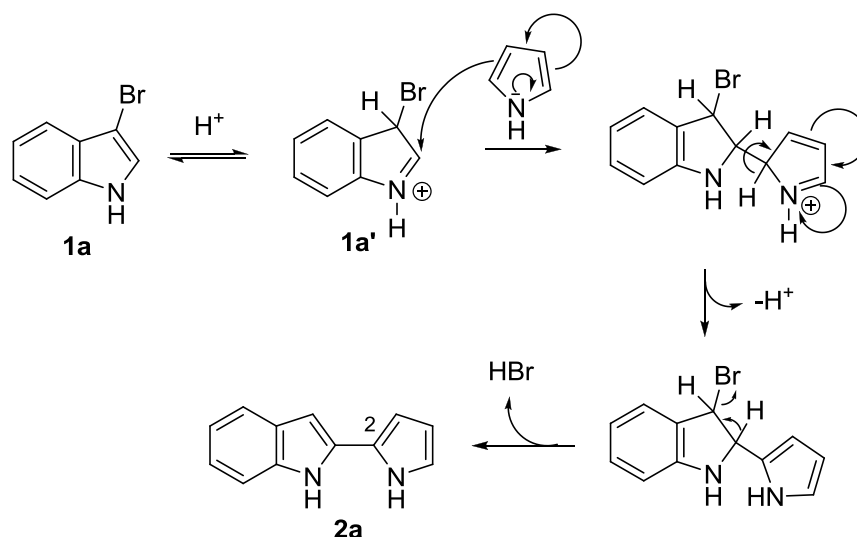


Schéma 10 : Mécanisme de formation de l'indolo-pyrrole **2a**

C. Préparation des intermédiaires acycliques **3** (schéma 7)

Initialement, la stratégie envisagée faisait intervenir une cycloaddition de type Diels-Alder, entre le diène **2** et le maléimide jouant le rôle de diénophile (Schéma 11). Ainsi, à l'instar de Barry *et al*⁵⁷, nous avons tenté de synthétiser le cycloadduit **3'** via la réaction de **2** avec le maléimide. Malheureusement, même en présence d'un large excès de diénophile dans le toluène à 140 °C sous pression, la formation du cycloadduit **3'** n'a pas été observée. Dans ces conditions, le seul produit détecté a été l'adduit acyclique **3a** issu de l'addition de Michael de **2a** sur le motif maléimide.

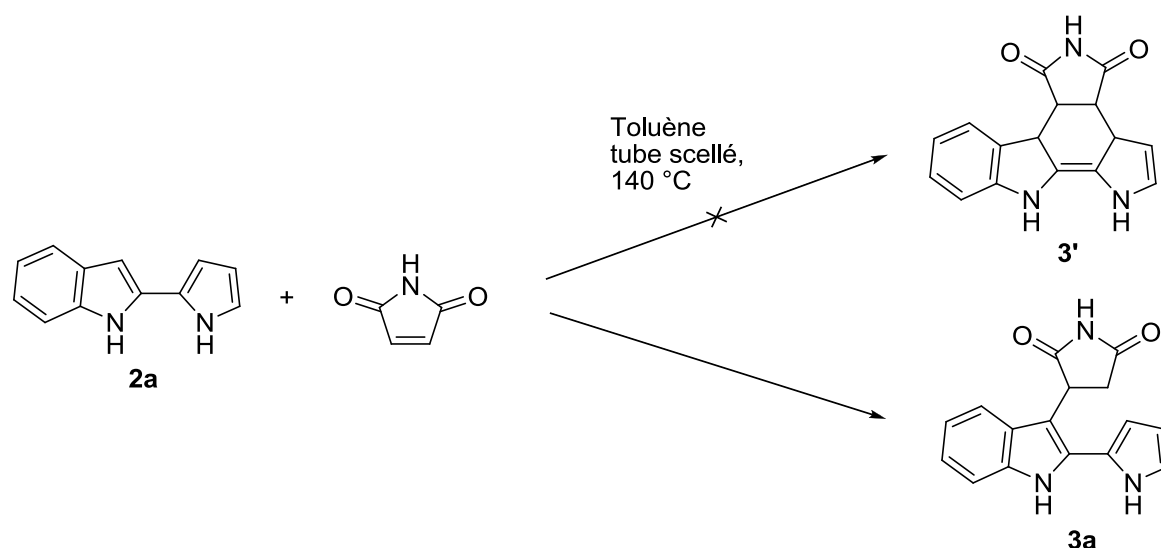


Schéma 11 : Obtention de l'intermédiaire 3

Suite à ce résultat, nous avons décidé d'adopter la stratégie de Prudhomme *et al.* en faisant justement intervenir ce type d'intermédiaires acycliques **3**.⁵⁸ Par conséquent, en appliquant les conditions décrites par Prudhomme (réaction dans le toluène à reflux en présence d'une quantité catalytique de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), les intermédiaires acycliques **3a-d** constitués des trois unités pyrrole-indole-succinimide, ont été préparés avec des rendements moyens (28 – 59 %) (Schéma 12).

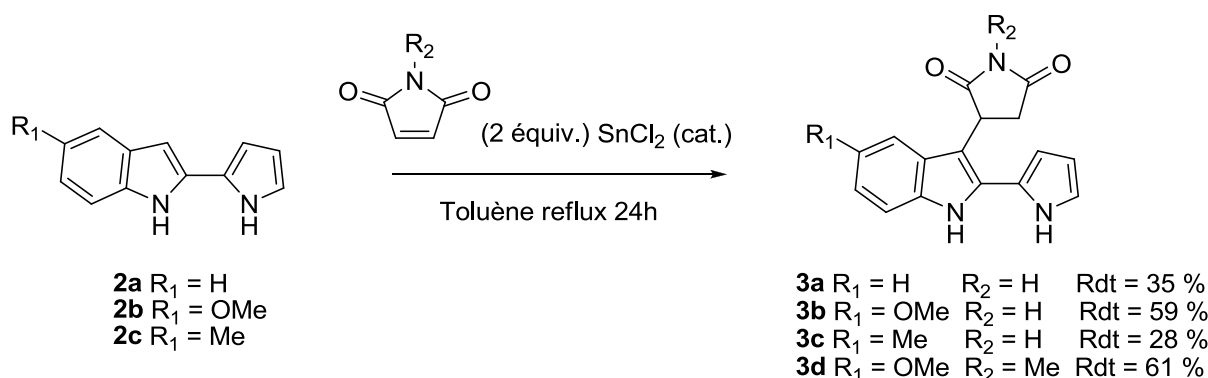
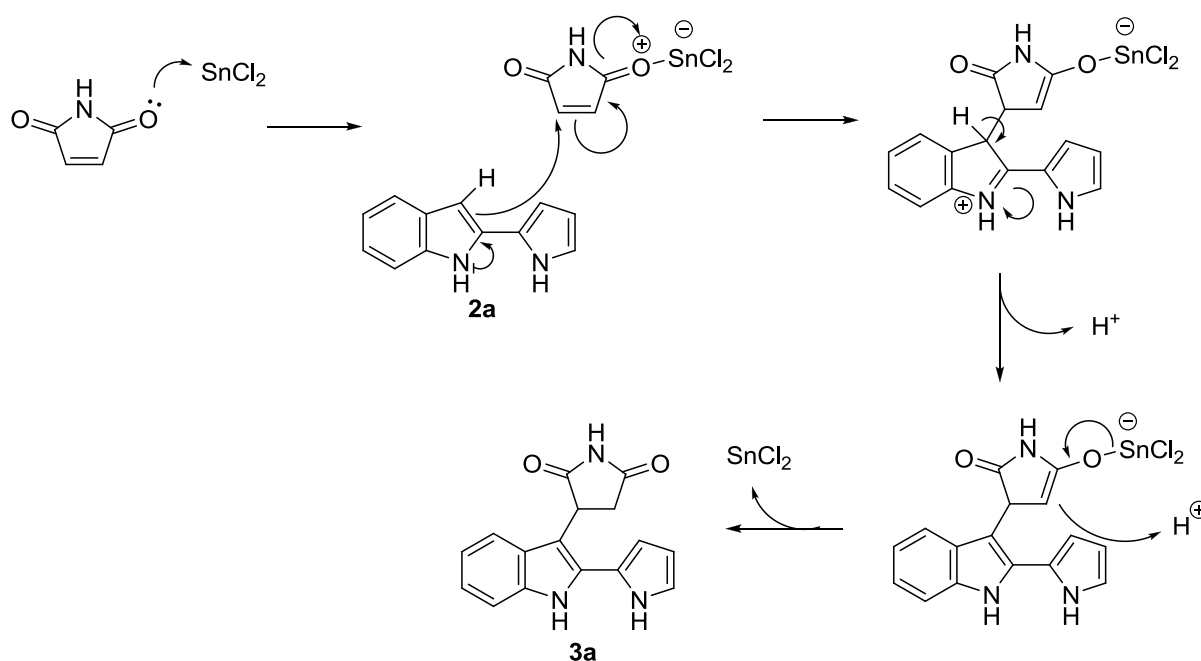


Schéma 12 : Préparation des intermédiaires acycliques

Le mécanisme associé à cette réaction consiste à faire réagir l'unité indole de **2a** en tant que nucléophile et le maléimide préalablement activé par le SnCl_2 en tant qu'électrophile (Schéma 13). Une fois la liaison C-C formée, le résidu indole est réaromatisé après déprotonation et le résidu succinimide est « régénéré » pour conduire à l'intermédiaire **3a**.

Schéma 13 : Mécanisme proposé pour la synthèse de l'intermédiaire **3a**

D. Accès aux analogues pyrroles **4** (schéma 7)

La dernière étape pour obtenir les analogues de la série pyrrole est une étape de cyclisation. Là encore, nous nous sommes inspirés d'un travail de M. Prudhomme qui a décrit en 2003 une étude méthodologique autour de cette étape de cyclisation.²¹

Dans les conditions optimales décrites par Prudhomme *et al.*, à savoir dans le nitrobenzène à 200 °C en présence d'une quantité stoechiométrique de Pd black, nous avons effectivement obtenu les analogues cycliques **4a-d** mais avec de faibles rendement de 15 à 30 %.

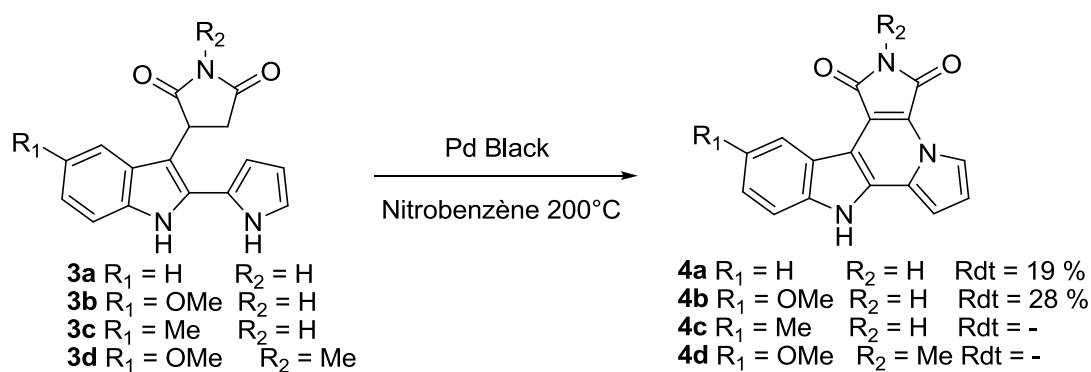


Schéma 14 : Préparation par voie thermique des analogues cyclisés

En effet, dans ces conditions, bien que la conversion soit totale, les faibles rendements sont expliqués d'une part, par l'apparition de nombreux produits de dégradation et d'autre part, par la purification rendue fastidieuse par la présence du nitrobenzène. Il est à noter que le palladium black est introduit dans des quantités stoechiométriques ce qui nous laisse penser que ce sont ses propriétés d'absorption d'hydrogène qui sont exploitées ici.

Dans l'optique d'améliorer l'efficacité de cette transformation, nous avons décidé d'étudier l'effet des micro-ondes pour cette cyclisation (Tableau 2). De plus, de manière à faciliter la purification, nous avons tenté la cyclisation dans divers solvants plus volatils que le nitrobenzène.

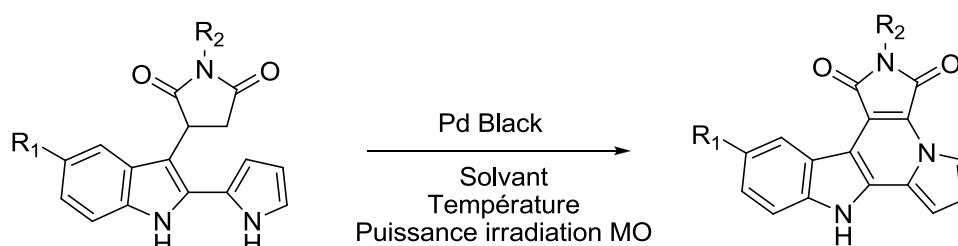


Schéma 15 : Préparation des analogues cyclisés assistée par micro-ondes

Tableau 2 : Travail de méthodologie réalisé pour l'étape de cyclisation assistée par micro-onde des intermédiaires **3**

Entrée	R ₁	R ₂	Solvant	Température (°C)	Puissance MO ^a (W)	Conversion	Rendement ^b
1	OMe	H	Toluène	65	300	Aucune	-
2	OMe	H	Toluène	130	300	Aucune	-
3	OMe	H	AcOEt	70	30	Aucune	-
4	OMe	H	DMF	110	130	Aucune	-
5	OMe	H	Nitrobenzène	190	300	Totale	41
6	OMe	Me	Nitrobenzène	190	300	Totale	59
7	H	H	Nitrobenzène	190	300	Totale	44
8	Me	H	Nitrobenzène	190	300	Totale	49

^a appareil de la marque CEM modèle Discover ; ^b après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice

Alors qu'aucune conversion n'a été observée dans les différents solvants testés (entrées 1 à 4), la conversion a été complète dans le nitrobenzène au bout de 15 minutes d'irradiation sous une puissance de 300 W à une température de 190 °C (entrée 5). En plus du gain de temps évident, l'irradiation micro-ondes a également eu un effet positif sur l'efficacité de la cyclisation, le produit **4b** ayant isolé avec un rendement de 41 % contre seulement 28 % en version thermique. Au vu de ces résultats, la combinaison micro-ondes – haute température s'est avérée être un bon compromis pour cette transformation, les quatre analogues cycliques souhaités (**4a-d**) ayant été obtenus avec de bien meilleurs rendements qu'en version thermique (entrées 5-8).

1) Etape de déméthylation

Afin d'obtenir le dérivé hydroxyle **4e** qui est le substituant le plus intéressant selon la littérature, nous avons déméthylé le dérivé méthoxylé **4b** en utilisant un très large excès de BBr₃ (environ 40 équivalents). Le produit a dans ce cas été obtenu quantitativement.

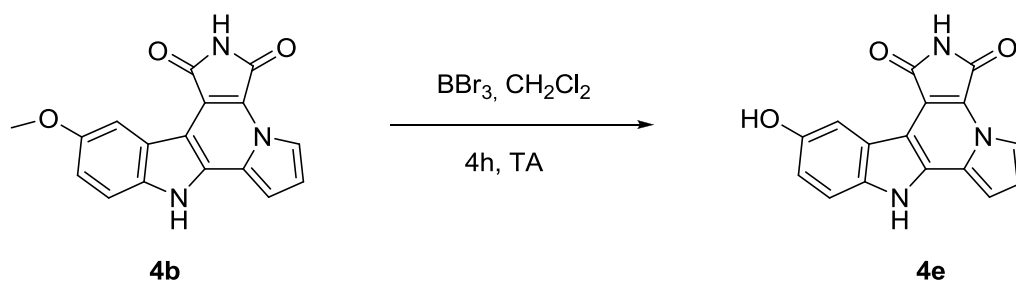


Schéma 16 Déméthylation du composé 4e

II. Synthèse des analogues pyrazoles de type A (Figure 16)

A. Première approche

Dans un premier temps, nous avons envisagé la même voie de synthèse que celle qui nous a permis d'obtenir les analogues pyrroles (Schéma 17).

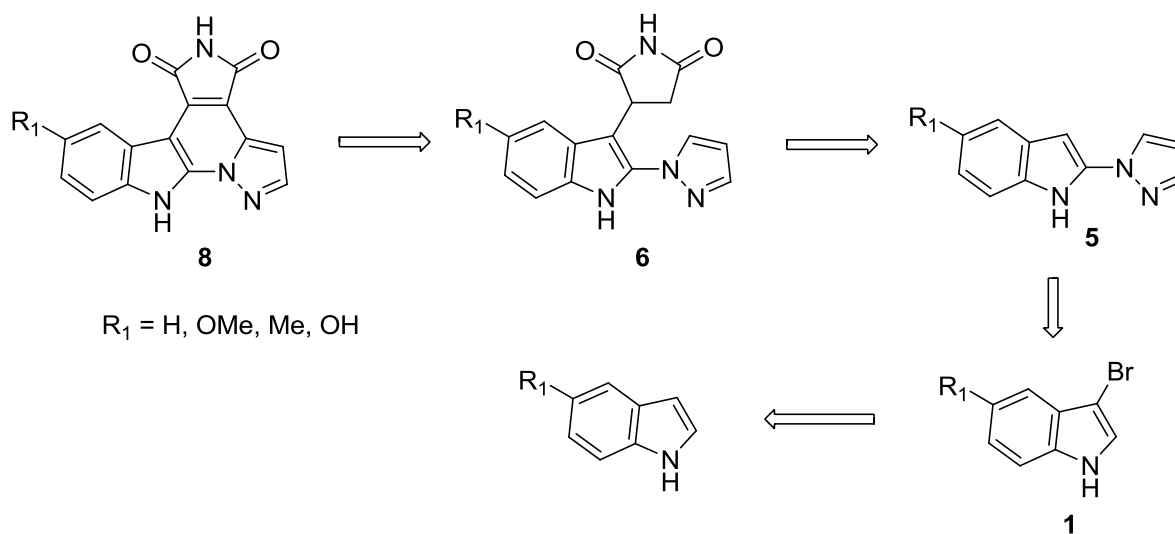


Schéma 17 : schéma retrosynthétique permettant l'accès aux analogues pyrazoles A

1. Préparation des unités indolopyrazole 5

De la même manière que précédemment pour la série pyrrole, nous avons généré les 3-bromoindoles **1a-c** que nous avons ensuite fait réagir sur le pyrazole toujours en présence de TFA. Dans ces conditions, les unités indolo-pyrazoles **5a-c** ont été formées, ces produits étant le résultat d'une réaction de N-alkylation du pyrazole alors qu'une réaction de C-alkylation se déroule dans le cas du pyrrole.

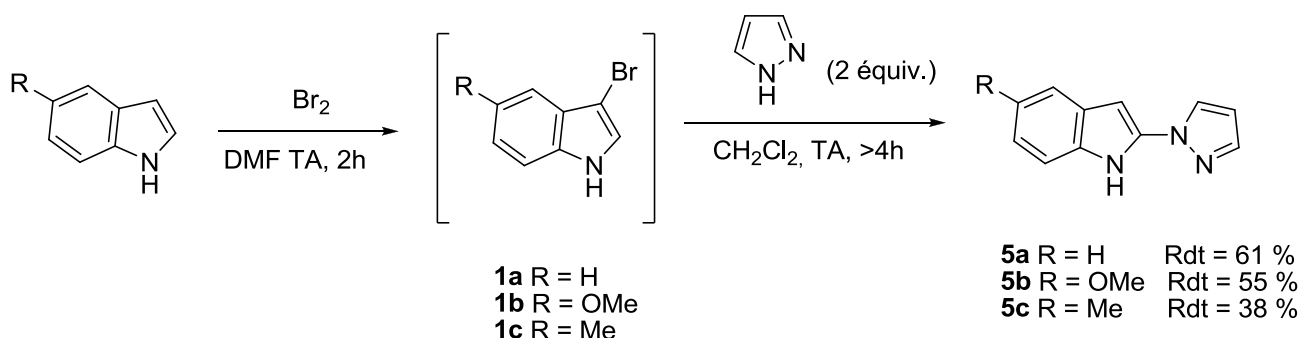


Schéma 18 : Préparation des indolo-pyrazoles 5

Il est à noter que la différence de réactivité entre le pyrrole et le pyrazole est également reflétée par la différence notable du temps de réaction : la conversion est totale en seulement 20 minutes dans le cas du pyrrole alors qu'elle nécessite environ 4 h dans le cas du pyrazole.

Comme pour la série pyrrole, nous avons travaillé avec un léger excès de pyrazole mais cela n'a pas été suffisant. En effet, lors des premiers essais de couplage, nous avons utilisé les conditions décrites dans la publication. Les faibles rendements en produit **5** sont dus à la synthèse d'un sous-produit, issu du couplage de deux molécules de dérivés bromés sur un pyrazole dont la structure supposée est la suivante, par analogie avec le produit **2'** observé dans le cas du pyrrole :

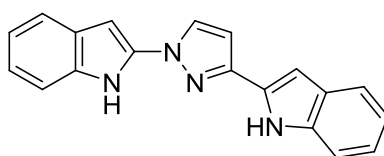


Figure 19 : Structure supposée du produit issu de l'addition de bromo-indole sur un noyau pyrazole

En modifiant la stoechiométrie, nous avons pu orienter la réaction vers le produit de mono ou di-addition. En travaillant avec deux équivalents de pyrazole, plutôt qu'un, nous avons pu obtenir les squelettes **5a-c** avec des rendements calculés pour deux étapes allant de 50 à 61 % selon le substituant.

On peut tout de même penser que le mécanisme reste similaire à la version pyrrole à la différence que la réaction est initiée par une addition nucléophile de l'atome d'azote du pyrazole qui s'additionne sur le cation indolique **1a'** avant le départ d'un proton puis d'une molécule d'HBr pour restaurer l'aromaticité et former ainsi l'unité **3a** (schéma 19).

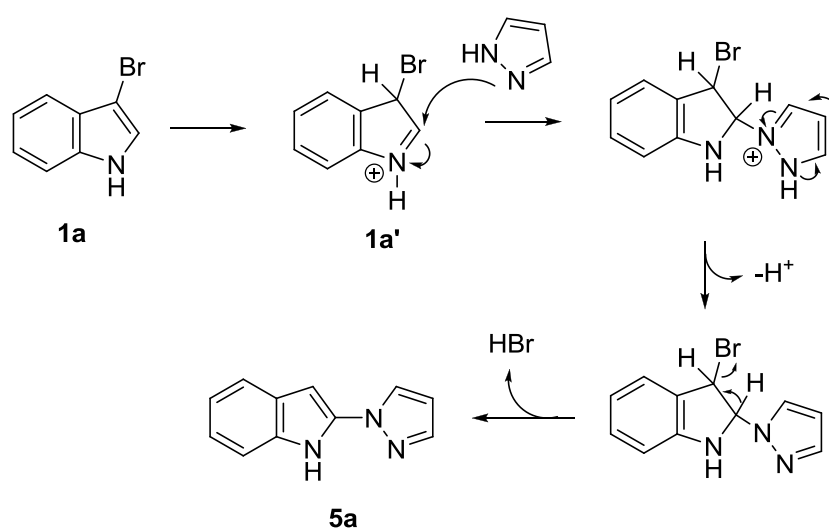


Schéma 19 : Mécanisme de l'addition du pyrazole sur le bromo-indole

2. Préparation des intermédiaires acycliques 6

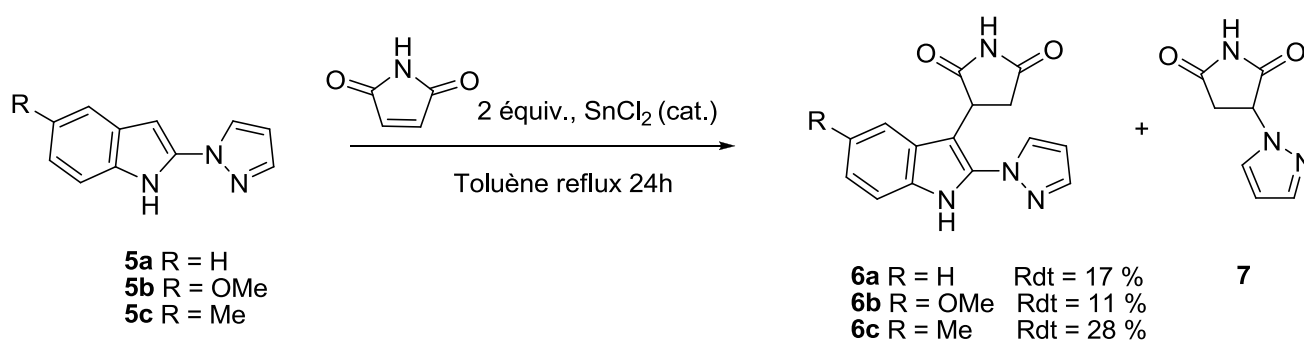


Schéma 20 : Addition des intermédiaires 5 sur le maléimide

L'étape d'addition de Michael entre **5a-c** et le maléimide a été réalisée dans les mêmes conditions pour cette série pyrazole que pour la série pyrrole, à savoir dans le toluène à reflux pendant 24 h en présence d'une quantité catalytique de SnCl_2 .

Les premiers essais réalisés à partir de l'unité **5a** ne nous ont pas permis d'isoler le produit **6a** pur mais uniquement un mélange dans lequel **6a** est associé au produit secondaire **7** et à des traces de maléimide.

Afin d'optimiser la formation du produit **6a**, nous avons alors tenté, mais sans succès, de diminuer la quantité de maléimide et/ou le temps. Dans les conditions initiales, les intermédiaires acycliques **6a-c** n'ont pu être obtenus qu'avec des faibles rendements de 15 à 30 %.

La formation du produit **7** résulte formellement du couplage d'une molécule de pyrazole avec une molécule de maléimide et peut donc être rationalisée de deux manières différentes, les 2 hypothèses suggérant la rupture de la liaison C-N entre les noyaux indole et pyrazole du réactif **5** :

- i) les conditions expérimentales conduisent à la libération de pyrazole capable de s'additionner sur le maléimide (Schéma 21). Cette hypothèse a été rejetée après que nous ayons testé la stabilité de **5a**. En effet, dans les conditions expérimentales, en l'absence de maléimide, nous n'avons observé aucune dégradation après 48 h de reflux.

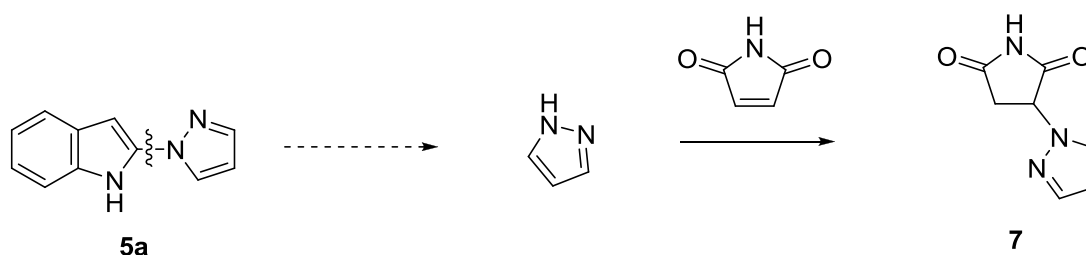


Schéma 21 : Mécanisme pour la formation de **7** via la rupture de la liaison C-N de **5a**

- ii) à la différence de l'unité indolo-pyrrole **3a**, l'unité indolo-pyrazole **5** possède une position nucléophile supplémentaire qui est l'atome d'azote du résidu pyrazole. Ainsi, si la réaction est initiée par l'addition nucléophile de cet atome d'azote, il est possible d'interpréter la formation du produit **7** via le mécanisme proposé ci-dessous (Schéma 22)

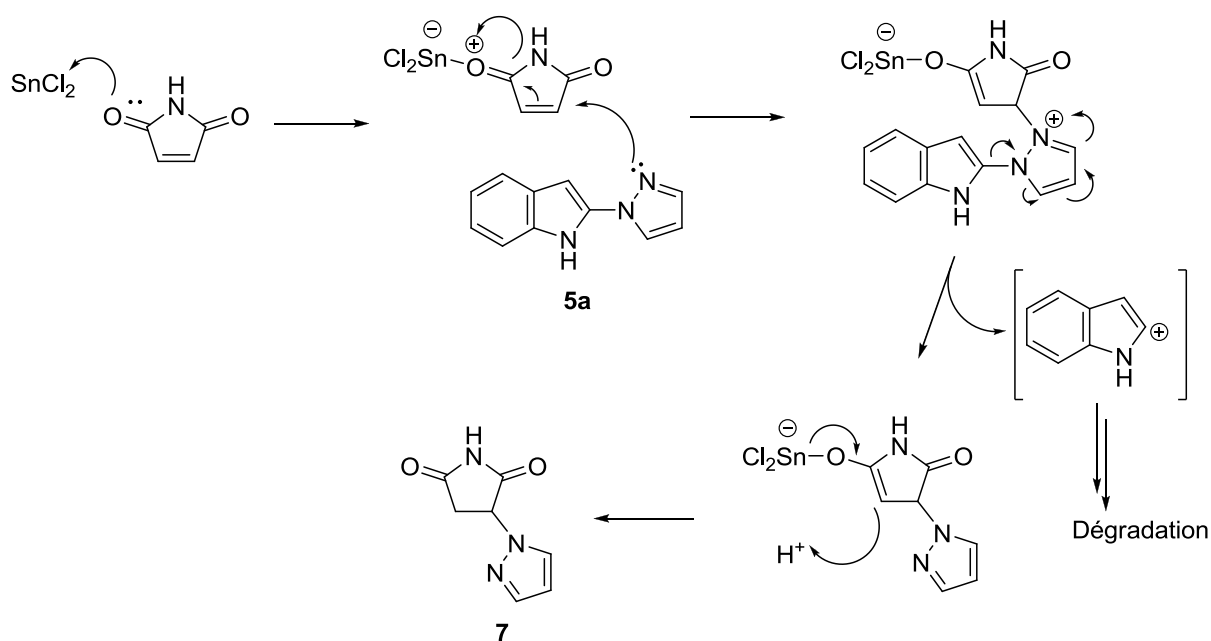
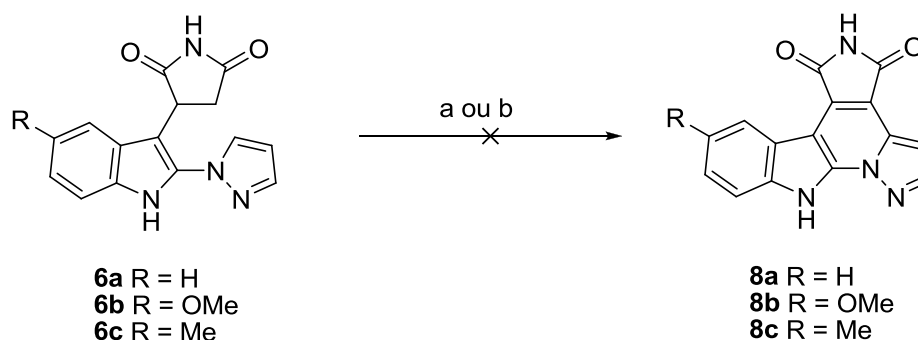


Schéma 22 : Mécanisme de formation de **7** grâce au deuxième site nucléophile de **5a**

3. Accès aux analogues pyrazoles de type A **8** : cyclisation des intermédiaires **6**

La cyclisation des composés **6a-c** en **8a-c** a été envisagée via l'utilisation des mêmes conditions que pour la série pyrrole. Malheureusement, aucune conversion des précurseurs **6a-c** n'a été observée quelles que soient les conditions testées, que ce soit sous irradiation micro-onde ou sous contrainte purement thermique.



a : Pd Black, Nitrobenzène, 200°C, 5h; b : Pd black, Nitrobenzène, 180°C, 300W

Schéma 23 : Echec de la cyclisation des analogues pyrazole A à partir de **6**

En 2001, Hudkins *et al.* ont réalisé la cyclisation de structures similaires aux nôtres comportant un noyau indole lié à un noyau succinimide et un cycle benzofurane ou benzothiophène en présence d'*o*-chloranil et de palladium diacétate (Schéma 24).⁵⁹

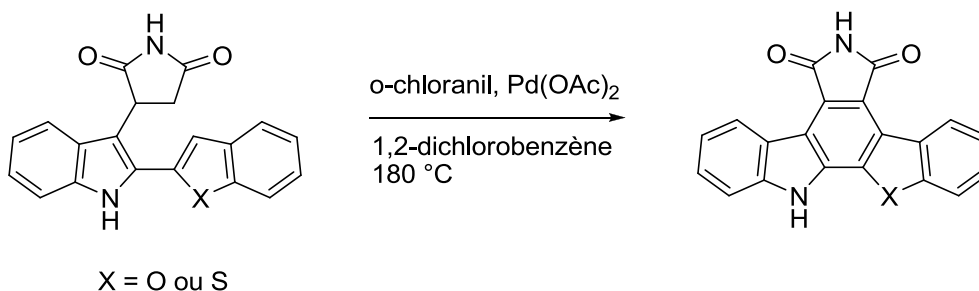


Schéma 24 : Cyclisation pallado-catalysée mise au point par Hudkins

L'utilisation de ces conditions pour obtenir les composés **8** ne nous a pas permis d'observer la conversion de **6** que l'on récupère malgré un temps de chauffe prolongé par rapport aux conditions décrites par les auteurs (8 h au lieu de 3 h).

Après avoir tenté de cycliser ces analogues pyrazoles sans succès nous avons dû réorienter leur synthèse.

B. Seconde approche :

Le produit **6** n'a pas pu être converti en **8** mais ne s'est pas dégradé malgré les conditions de température élevée testées. Devant la stabilité de cette structure, nous avons envisagé d'introduire un élément réactif sur celle-ci afin de faciliter la cyclisation.

Nous nous sommes donc inspirés de la méthode mise au point par Yoshida pour la synthèse du produit naturel qui passe par l'utilisation d'un intermédiaire bromé :²⁰

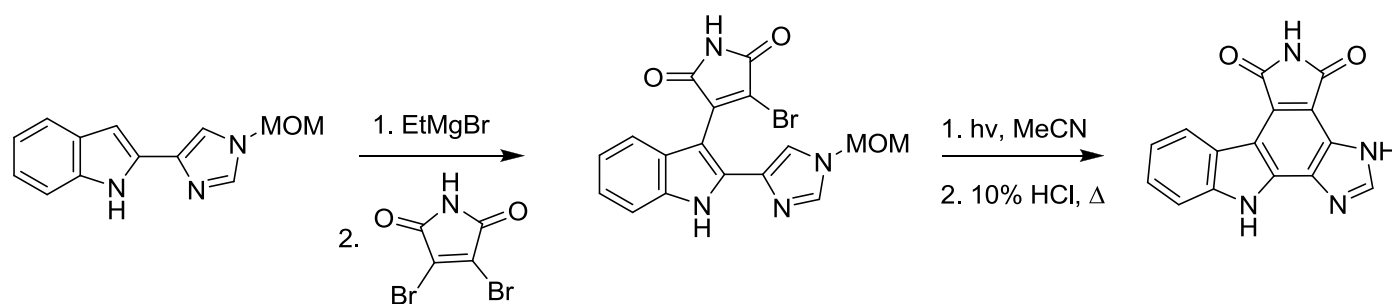


Schéma 25 : Dernières étapes de la synthèse de la granulatinide par Yoshida

Cette méthode de synthèse présentait l'avantage d'utiliser le synthon **5** déjà préparé pour la première approche. Le schéma de rétrosynthèse pour cette deuxième approche est représenté Schéma 26.

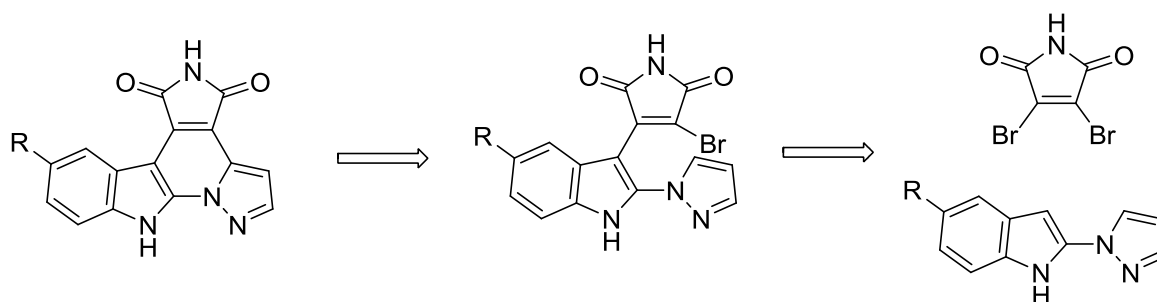


Schéma 26 : Rétrosynthèse de la série A des analogues pyrazole selon la seconde approche

1. Préparation des intermédiaires acycliques bromés **10** et **11**

L'addition du dibromomaléimide sur la position 3 de l'indole a été décrite par Yoshida *et al.* pour la synthèse de l'isogranulatinide²⁰ mais aussi par Routier *et al.*⁶⁰ et l'équipe de Meggers⁶¹. La première équipe passe par un réactif de Grignard (EtMgBr) pour activer le noyau indolo-imidazole alors que les deux dernières utilisent une base silylée (LiHMDS) pour déprotoner l'indole.

Les méthodes diffèrent mais Yoshida et Routier tous les deux rapportent un meilleur rendement lorsque l'azote du dibromomaléimide est substitué. En effet, l'utilisation de N-méthyl-dibromomaléimide donne, dans les mêmes conditions, un rendement quatre fois supérieur pour Yoshida et trois fois supérieur pour Routier par rapport au NH-maléimide (Schéma 27).

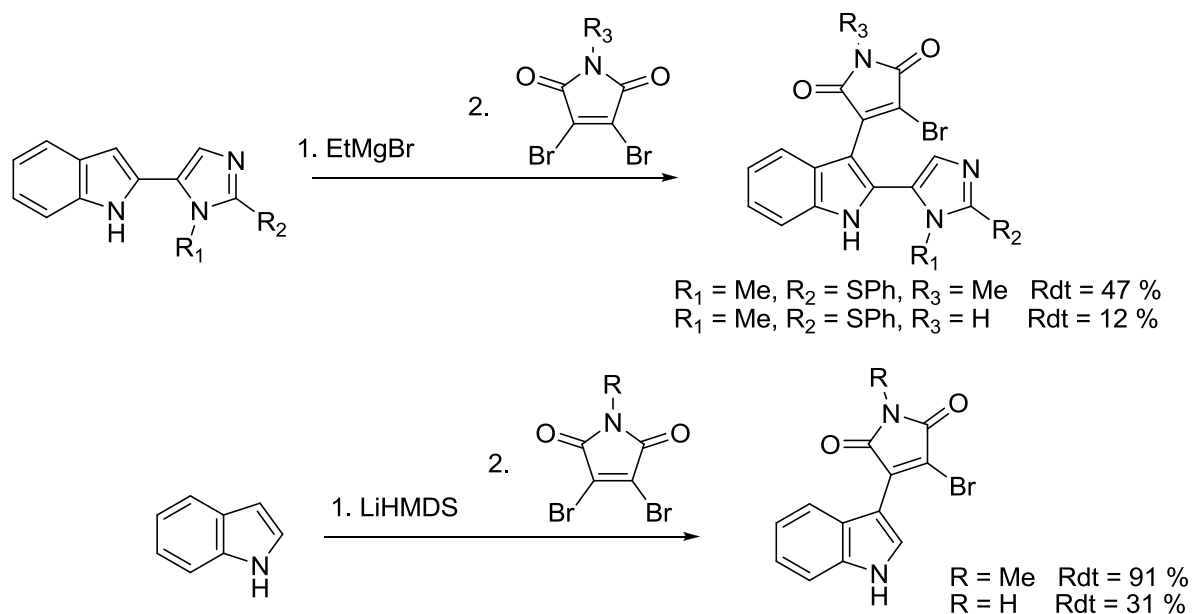
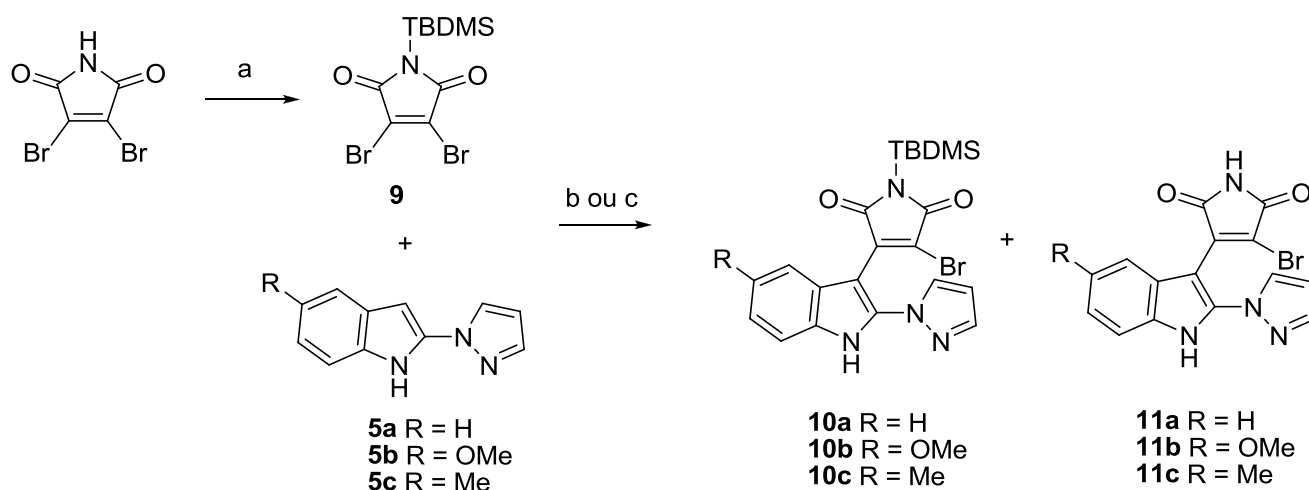


Schéma 27 : Addition du noyau maléimide substitué par Yoshida et Routier

Dans notre cas, il faut, pour l'ancrage des molécules dans le site actif de l'enzyme, que cet atome d'azote soit libre. Nous avons donc, suite à ces observations décidé de protéger l'azote du dibromomaléimide afin de pouvoir augmenter le rendement de cette étape, et à l'instar de Meggers, nous avons choisi le groupement TBDMS facilement clivable en présence de TBAF.

Après la mise en place de la protection sur le noyau maléimide, son addition sur le composé **5** a été réalisée selon les deux protocoles cités plus haut (Schéma 28).



a: TBDMSCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 1 nuit; b: EtMgBr.THF, TA, 12h; c: LiHMDS, Toluène / THF, -15°C 1h puis TA 2,5h

Schéma 28 : Préparation des intermédiaires acycliques bromés **10** et **11**

L'utilisation du réactif de Grignard ou du LiHMDS nous ont permis d'obtenir les deux intermédiaires acycliques **10** et **11**. La formation du composé **11** s'explique par le fait que dans les deux cas, le traitement du brut se fait par un lavage légèrement acide qui clive partiellement la protection au TBDMS. Les produits **10** et **11** sont séparés par chromatographie. Des deux méthodes, nous avons cependant préféré utiliser le LiHMDS car dans le cas de la série sans substituant, le brut réactionnel, plus propre, donnait un meilleur rendement en produit attendu après purification.

Dans tous les cas, la conversion du réactif **5** n'est jamais totale mais la purification nous permet de récupérer celui qui n'a pas réagi pour le réutiliser ensuite.

2. Accès aux analogues pyrazoliques 8

Dans l'optique de préparer les analogues pyrazoliques de type A (Schéma 17), l'étape-clé de notre approche repose sur la cyclisation, par voie photochimique, des intermédiaires acycliques bromés **11**. Une telle approche de cyclisation a déjà été réalisée avec succès sur des architectures comparables par deux équipes :

- Pour réaliser la synthèse totale du produit naturel granulatinimide (schéma 2 du chapitre Mise au point bibliographique), l'équipe de Yoshida a cyclisé de manière efficace un tel intermédiaire acyclique bromé qui, après déprotection du groupement MOM, a permis

l'accès au produit naturel.²⁰ Pour cycliser ce type de motifs, il est à noter que la réaction a été effectuée dans l'acétonitrile sous irradiation par une lampe au mercure basse pression.

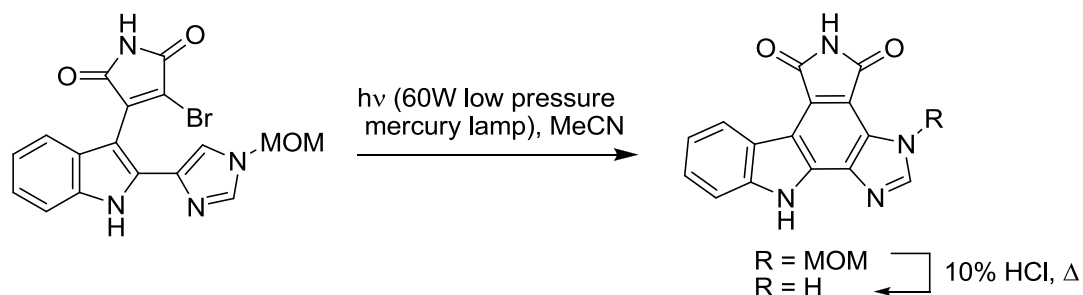


Schéma 29 : Photocyclisation par Yoshida

- L'équipe de Meggers a, quant à elle, cyclisé des intermédiaires acycliques bromés possédant un résidu pyridine pour accéder aux architectures cycliques, qui après déprotection, a permis l'accès à des composés utilisés comme ligand bidentate du ruthénium (Figure 15).⁶¹ Dans ce cas, les auteurs ont également irradié à la longueur d'onde de 350 nm mais ont préféré utiliser le toluène comme solvant.

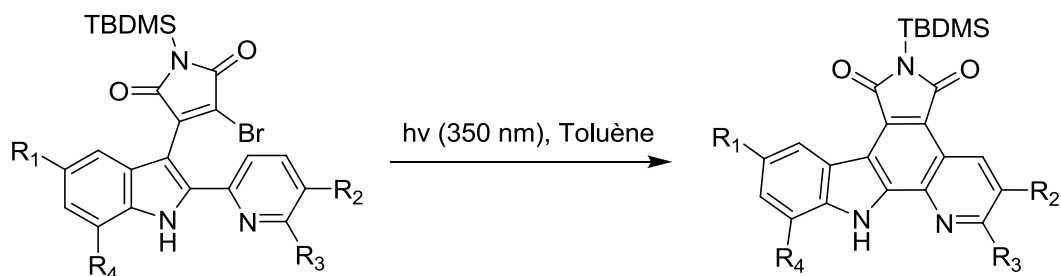


Schéma 30 : Photocyclisation par Meggers

A la différence des cas de Yoshida et Meggers où l'étape de photocyclisation conduit à la formation d'un cycle central carboné, la cyclisation de nos motifs bromés **10** repose sur la formation d'un hétérocycle central de type pyridine, cette différence structurale notable pouvant entraîner une réactivité chimique différente (Schéma 31).

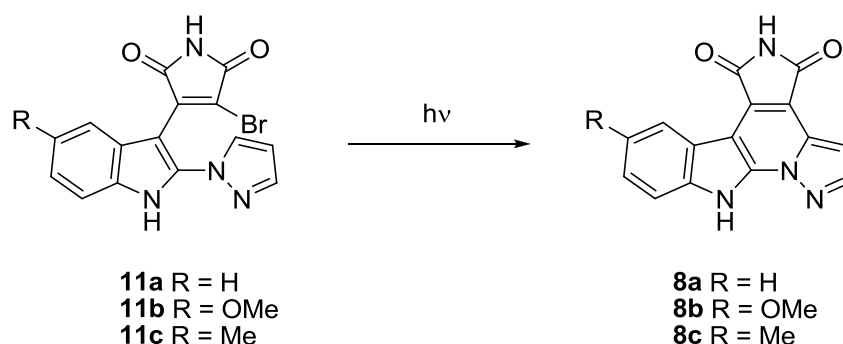


Schéma 31 : Obtention des analogues pyrazoles par photocyclisation

Avant de présenter la démarche expérimentale que nous avons adoptée et les résultats obtenus, nous allons rappeler brièvement quelques notions importantes de spectroscopie d'absorption UV-visible.

a) Rappels théoriques sur la spectroscopie UV-Visible⁶²

Le phénomène d'absorption peut être représenté par le schéma suivant :

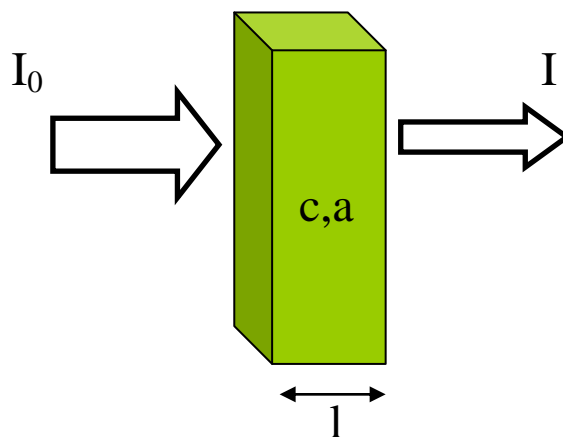


Figure 20 : Illustration du phénomène d'absorption

L'absorption d'énergie lumineuse par un échantillon quelconque se traduit par la diminution de l'intensité lumineuse d'un rayon incident (I_0) après son passage à travers l'échantillon considéré. L'intensité lumineuse transmise est alors notée I et l'absorption est alors quantifiable grâce à la relation $A = \log_{10} (I/I_0)$, où A est une grandeur adimensionnelle appelée absorbance.

Pour $A = 1$, on a $\log_{10}(I/I_0) = 1$ d'où $I/I_0 = 10$. Ce qui veut dire que 90 % des photons sont absorbés par le milieu traversé,

Si $A = 2$ alors $\log_{10}(I/I_0) = 2$ d'où $I/I_0 = 100$. Dans ce cas là, 99 % des photons sont absorbés par le milieu traversé.

Une relation importante de la spectroscopie UV-Visible est la loi de Beer-Lambert qui est une relation empirique reliant justement l'absorbance A aux propriétés de l'échantillon traversé par la lumière. Dans le cas d'un faisceau lumineux monochromatique traversant une solution de concentration c en soluté (= espèce absorbante) et de longueur l , la loi de Beer-Lambert s'écrit sous la forme:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \times l \times c$$

A : absorbance (sans unité)
 ε : coefficient d'extinction molaire du soluté ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
 l : longueur du trajet optique dans la solution (cm)
 c : concentration molaire de soluté ($mol \cdot L^{-1}$)

Une réaction photochimique est basée sur l'absorption d'énergie des photons. Il faut pour cela que le réactif puisse absorber cette énergie ce qui se traduit par un compromis au niveau du choix de la longueur d'onde pour la synthèse réalisée : le composé doit avoir un coefficient d'extinction molaire permettant l'absorption mais qui ne doit pas être trop élevé puisque cela entraînera une diminution de la longueur du trajet optique conduisant à l'absorption de la totalité des photons ($A = 2$), limitant ainsi le volume réactionnel irradié.

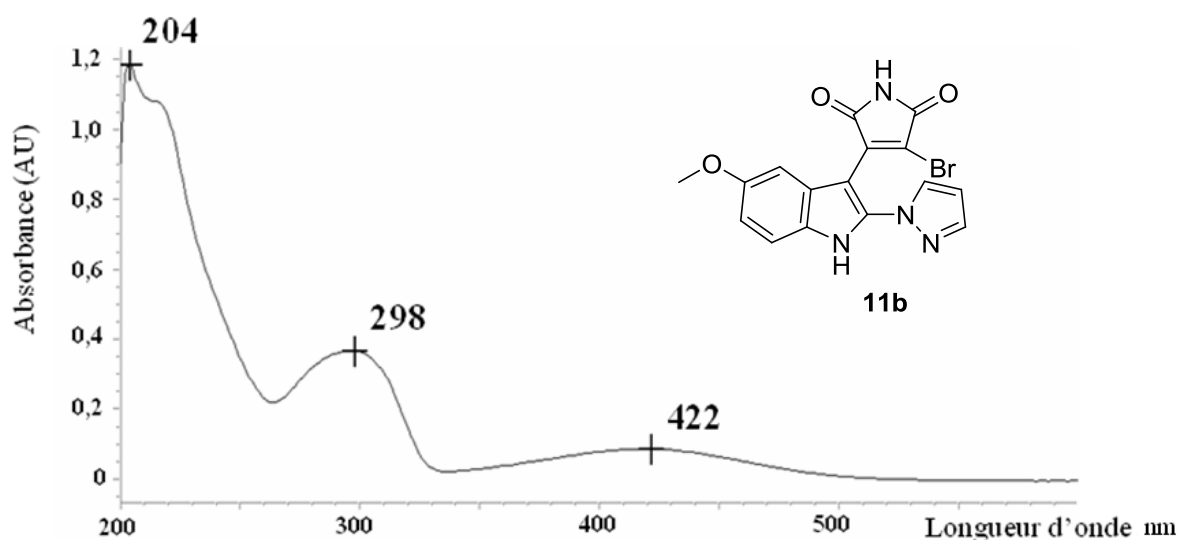
b) Passage de la théorie à la pratique

Afin de réaliser la photocyclisation souhaitée, nous avons adopté la démarche suivante consistant en deux étapes:

- (i) enregistrement du spectre UV-Visible du précurseur acyclique dans un solvant transparent aux UV, à savoir l'éthanol. Cet enregistrement de spectres est nécessaire car il nous a permis d'appréhender les propriétés d'absorption de l'espèce à irradier et repérer ainsi la longueur d'onde d'irradiation optimale pour la réaction.

- (ii) irradiation du précurseur acyclique à la longueur d'onde choisie jusqu'à sa conversion complète. Les réactions de cyclisation ont été effectuées au laboratoire dans un réacteur photochimique de marque Southern New England Ultraviolet Company, type « rayonnet ». Cet appareil consiste en une cuve équipée de seize lampes UV d'une puissance de 8 W chacune et interchangeables, le laboratoire disposant de trois jeux de lampes monochromatiques (250, 300 et 350 nm).

Pour illustrer cette démarche, considérons les résultats associés à la cyclisation du précurseur **11b** dont le spectre UV-Visible est donné ci-dessous (Figure 21). Il est à noter que l'ensemble des précurseurs acycliques **11a-c** présente un même profil de spectre d'absorption.



A partir du spectre UV-visible, nous avons déterminé les coefficients d'extinction molaires associées aux longueurs d'ondes des trois lampes d'irradiation dont nous disposons :

$$\epsilon_{250} = 18000 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{300} = 17500 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{350} = 1950 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Pour la cyclisation, nous avons choisi d'irradier une solution de concentration c de 5 mM qui est la concentration généralement utilisée pour ce type de réaction. Dans ces conditions, nous avons alors pu évaluer grâce à la loi de Beer-Lambert la longueur maximale parcourue par le faisceau lumineux au sein du milieu réactionnel avant d'être complètement absorbé (absorbance $A = 2$), à savoir : (i) de l'ordre de 0,2 mm (!) pour des longueurs d'onde de 250 et 300 nm, (ii) de l'ordre de 2 mm pour une longueur d'onde de 350 nm.

D'après ces valeurs, il apparaît clairement que la longueur d'onde la plus adaptée à notre situation est $\lambda = 350$ nm. Malgré cela, le volume de milieu réactionnel irradié est très faible puisqu'il correspond à un film sur la paroi du ballon de 2 mm d'épaisseur. Travailler à plus forte dilution serait envisageable mais plus la dilution est élevée, plus la taille du ballon doit être grande et donc le cœur du milieu réactionnel reste tout de même inaccessible. De plus, l'utilisation d'un milieu suffisamment concentré est intéressante car cela conduit à la précipitation progressive du produit de cyclisation au cours de l'irradiation. Par conséquent, afin d'assurer un renouvellement continu du « film réactionnel » irradié, nous avons aménagé l'appareillage à notre disposition en introduisant une agitation vigoureuse par l'intermédiaire d'un agitateur magnétique.

Enfin, toujours d'un point de vue pratique, un flux d'argon continu a été imposé au milieu réactionnel de manière à éliminer le bromure d'hydrogène qui est progressivement formé au cours de la cyclisation, la présence de cet acide dans le milieu pouvant entraîner soit la formation de sous-produits indésirables soit la dégradation du produit de cyclisation souhaité.

En appliquant ces conditions expérimentales, nous avons cyclisé avec succès l'ensemble des précurseurs acycliques **11a-c**

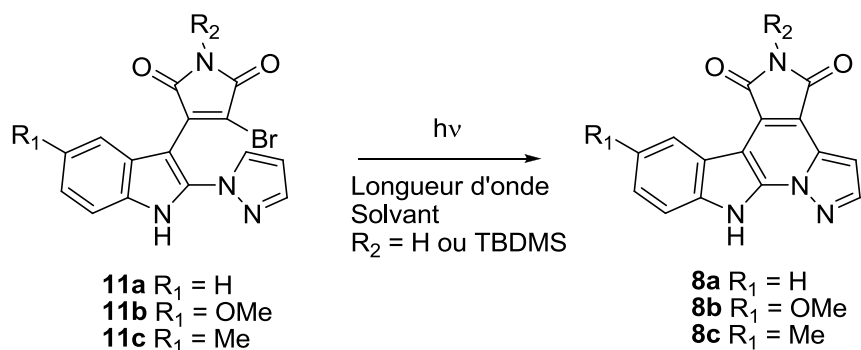


Tableau 3 : Résultats concernant la photocyclisation des intermédiaires **11a-c**

Entrée	R ₁	R ₂	Quantité (μmol)	Solvant	Temps de réaction (h)	Longueur d'onde (nm)	Rendement %
1	OMe	TBDMS	25	Toluène	3	350	90
2	OMe	TBDMS	50	Toluène	3	300	-
3	OMe	H	50	Toluène	8	300	-
4	OMe	H	50	Toluène	5	350	78
5	OMe	TBDMS	200	CH ₃ CN	8	350	76
6	OMe	H	1100	CH ₃ CN	16	350	50
7	H	H	50	CH ₃ CN	16	350	58
8	Me	H	54	CH ₃ CN	3	350	67

Alors que la cyclisation des produits dont l'azote du maléimide est substitué est décrite comme plus favorable, nous n'avons pas observé ce phénomène (entrées 1 et 4). Nous avons aussi voulu vérifier qu'une irradiation à 350 nm est le meilleur choix étant donné notre montage. On peut voir sur les entrées 2 et 3 que le passage à une irradiation à 300 nm ne permet pas la conversion de **11**. Enfin, le choix du solvant semble n'avoir qu'une faible importance puisque l'utilisation de l'acétonitrile à la place du toluène ne fait baisser le rendement que d'environ 10 %. Le facteur le plus important à prendre en compte est la quantité de matière mise en réaction. On peut voir en comparant les entrées 1, 4 et 6 que plus la quantité augmente plus le rendement de cette étape de photochimie diminue ce qui rejoint l'idée que le matériel dont nous disposons au laboratoire n'est probablement pas le plus adapté pour un travail sur grosse quantité. Selon la nature du substituant R, le temps d'irradiation varie de 3 à 16 h (entrée 4, 7 et 8) avec un moins bon résultat pour la série sans substituant (temps le plus long et rendement le plus faible). Dans tous les cas, le produit de cyclisation s'est avéré très peu soluble dans l'acétonitrile, les produits **8a-c** ayant ainsi été récupérés par simple filtration puis lavage avec de l'acétonitrile.

D'un point de vue mécanistique, on peut supposer que cette réaction de cyclisation se déroule selon un processus de type radicalaire et non de type péricyclique (électrocyclisation 6π), la présence de l'azote endocyclique empêchant l'existence d'un système adapté à l'électrocyclisation (Schéma 32). Il est ainsi suggéré que l'énergie lumineuse irradiante

entraîne la rupture homolytique des liaisons C-Br et C-H du précurseur pour, d'une part, libérer de l'HBr et, d'autre part, générer un intermédiaire biradicalaire adapté à la formation du cycle via l'appariement des deux électrons célibataires.

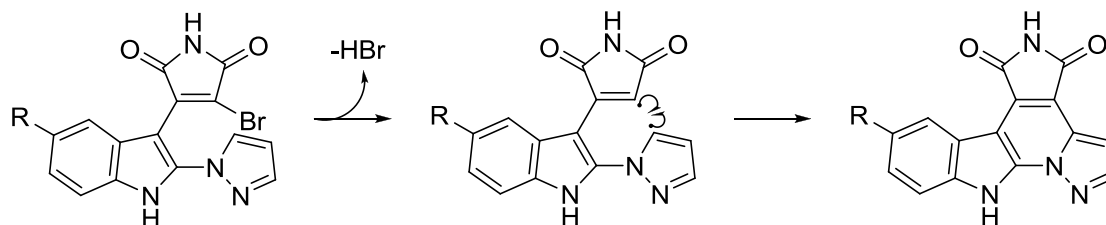


Schéma 32 : Mécanisme de la réaction de photocyclisation

3. Déméthylation

Afin d'obtenir le dernier analogue **8d** de cette première série pyrazole à partir du composé **8b**, il faut encore réaliser la déméthylation. Comme pour la série pyrroles, celle-ci est réalisée avec un bon rendement par l'action de BBr_3 en large excès dans le CH_2Cl_2 .

Il est à noter que l'utilisation du composé **12b** comme produit de départ est envisageable. Cependant les étapes de déprotection et déméthylation ne peuvent pas être mises en œuvre dans n'importe quel ordre puisque le clivage du TBDMS ne peut pas se faire en présence de la fonction alcool malgré l'utilisation de conditions drastiques telles que le TFA pur à température ambiante, à $50\text{ }^\circ\text{C}$, le TBAF dans le THF ou l'acide fluorhydrique.

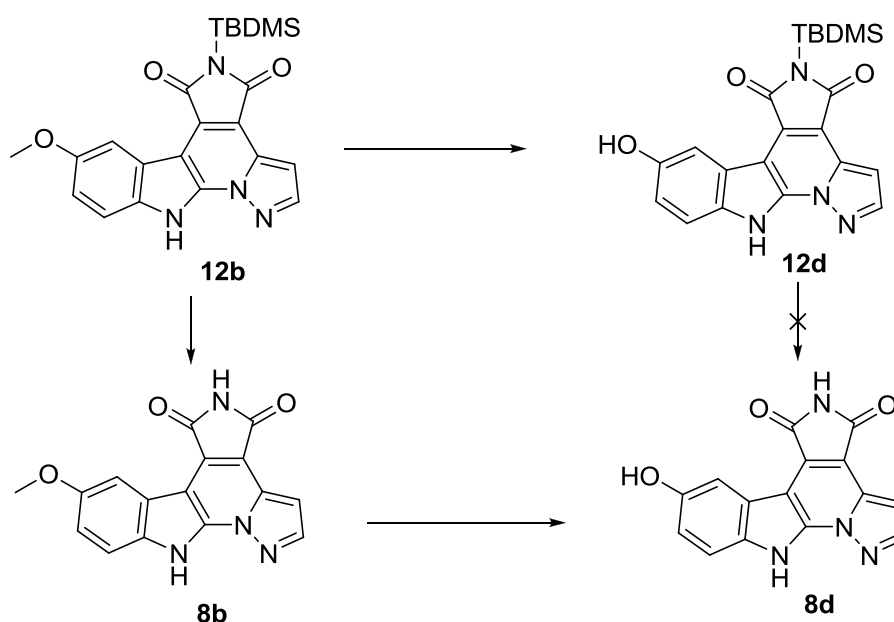
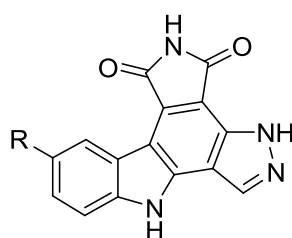


Schéma 33 : Synthèse du composé **8d**

III. Synthèse d'analogues pyrazoles de type B (Figure 17)

Nous avons également entrepris la synthèse d'une seconde série d'analogues pyrazole de type B pour lesquels le cycle central est entièrement carboné, comme c'est le cas du produit naturel granulatinide.



Analogue série B

Deux approches synthétiques ont été considérées pour atteindre ce type d'analogues.

A. Première approche

La première approche a été inspirée par l'équipe de Faul qui, pour préparer des analogues de la rébeccamycine de type bis-indolyl maléimide, a mis au point une méthode de formation de maléimide disubstitué via la condensation en milieu basique d'un glyoxylate et d'un acétamide.⁶³

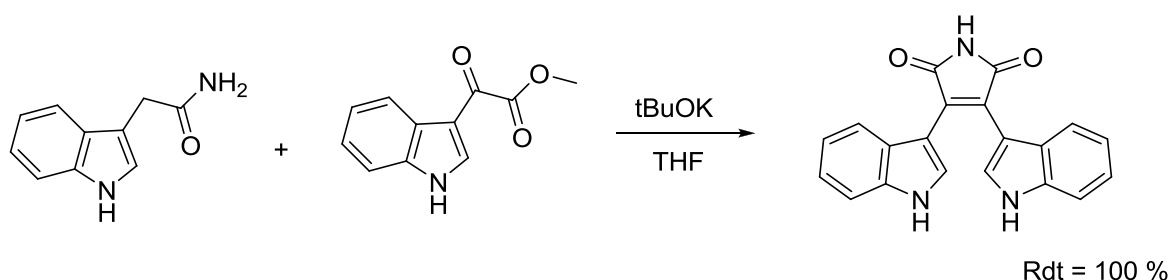


Schéma 34 : Préparation du noyau bis-indolyl maléimide par Faul et al.

Nous avons adopté le schéma rétrosynthétique suivant, faisant intervenir deux étapes-clé (Schéma 35): (i) une étape de condensation utilisant justement la méthode de Faul entre

l'indole glyoxylate **21** et le pyrazole acétamide **20**; (ii) une étape de cyclisation par voie photochimique de l'intermédiaire ainsi obtenu.

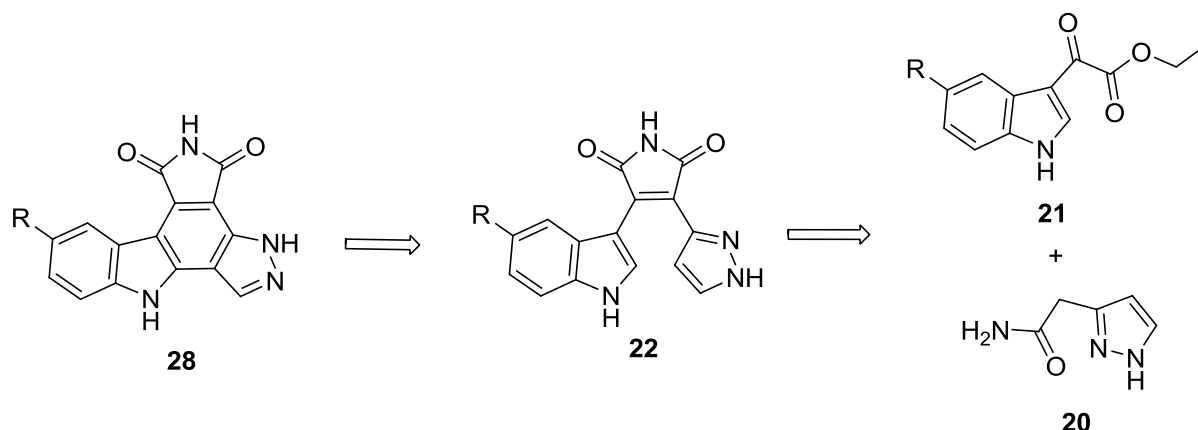


Schéma 35 : Rétrosynthèse envisagée pour la série pyrazole B

1. Préparation des synthons 20 et 21

a) Synthèse du pyrazole acétamide 20

La suite réactionnelle permettant la synthèse du pyrazole acétamide **20** a été décrite par la même équipe au cours de différentes publications^{64,65,66} à partir du produit commercial le 3-méthyl pyrazole. Nous avons choisi la route décrite dans les années 1950 par Reuben G. Jones consistant en une succession de 8 étapes à partir du 3-méthylpyrazole (Schéma 36).

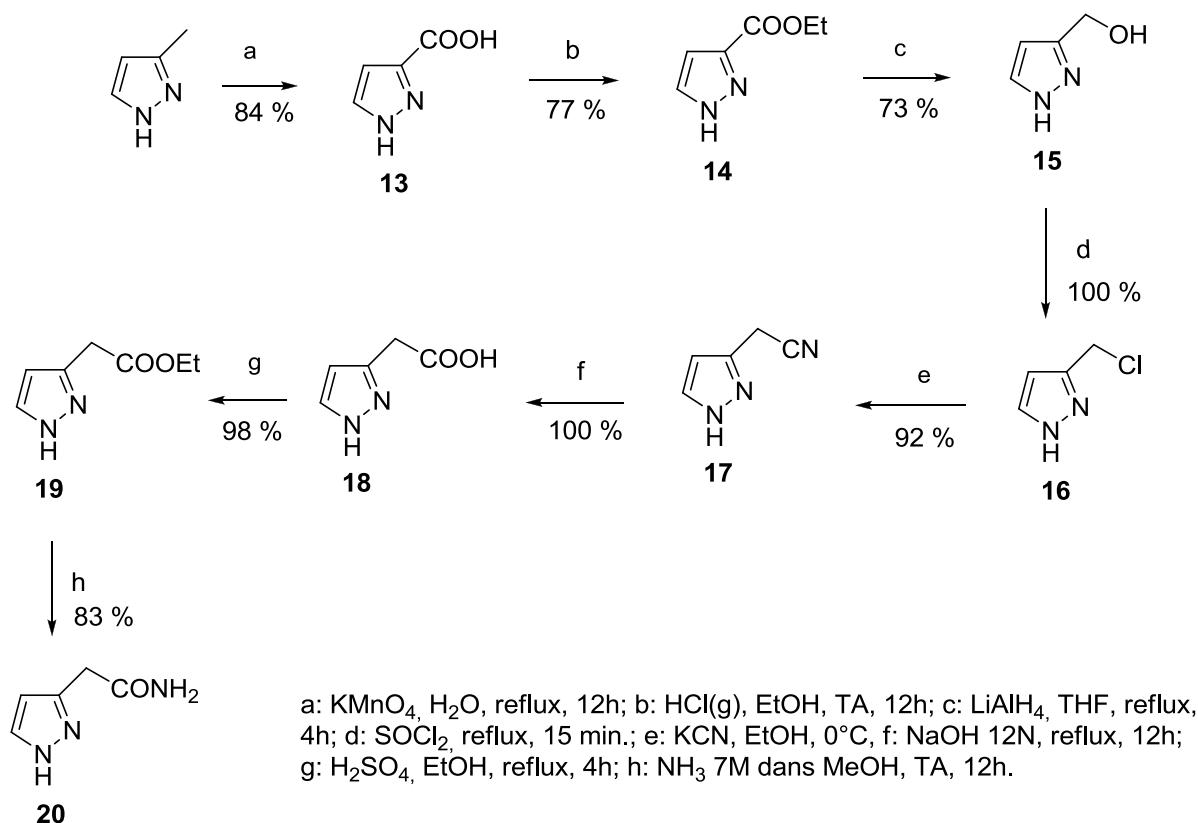


Schéma 36 : Synthèse du 3-pyrazole acétamide 20

Lors de la première étape, le groupement méthyle du 3-méthylpyrazole est oxydé par du KMnO_4 avec un rendement de 84 %. Après estérification de **13** dans l'éthanol en présence de chlorure d'hydrogène, le composé obtenu **14** est alors réduit par du LiAlH_4 . L'alcool **15** formé est transformé quantitativement en le dérivé chloré **16** par action du SOCl_2 , **16** étant alors soumis à l'action de KCN dans l'éthanol pour fournir le dérivé cyané **17**. L'hydrolyse du composé **17** par de la soude concentrée donne l'acide **18** qui est estérifié avec un rendement de 92 % dans l'éthanol à reflux en présence d' H_2SO_4 . La dernière étape a consisté à transformer la fonction ester de **19** en fonction acétamide pour conduire au composé désiré **20**. Le rendement global de ces 8 étapes est de 35 %.

b) Synthèse du synthon glyoxylate 21

Les divers synthons **21** souhaités ont été rapidement accessibles à partir de sources commerciales, à savoir des indoles substitués en position 5 (Schéma 37).⁶⁷ En effet, les produits **21a-c** ont été obtenus en une séquence de deux étapes via le passage par le chlorure d'acyle intermédiaire, formé par action du chlorure d'oxalyle sur l'indole correspondant, qui

réagit sur l'éthanol pour donner les produits **21a-c** souhaités. Il est à noter que les deux étapes se font sans purification intermédiaire avec un bon rendement pour les trois produits.

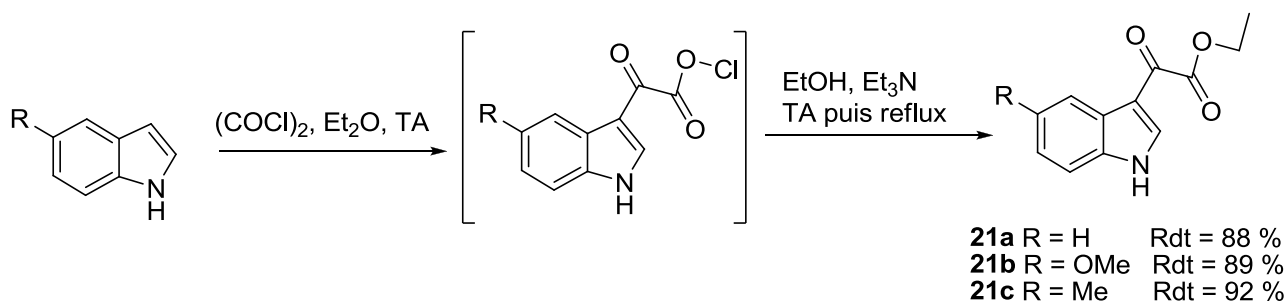


Schéma 37 : Préparation des synthons glyoxylates **21a-c**

2. Préparation des intermédiaires acycliques **22**

Les conditions de couplage élaborées par Faul ont tout d'abord été appliquées à la combinaison pyrazole acétamide/indole glyoxylate **20/21a**, les conditions décrites étant d'utiliser le THF comme solvant en présence de tBuOK à 0 °C puis agité 3 h après retour à température ambiante.

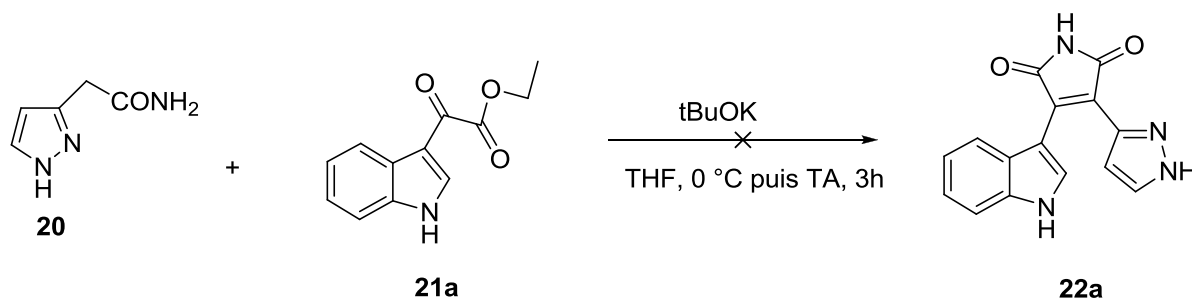


Schéma 38 : Condensation de Faul des intermédiaires **20** et **21**

Dans ces conditions, nous n'avons observé aucune condensation des réactifs **20** et **21a** (Schéma 38). Nous avons alors décidé de protéger la fonction NH libre de chacun des synthons afin de masquer le caractère acide de ces fonctions dans les conditions basiques appliquées. **20** et **21a-c** ont ainsi été protégés sous forme de carbamates N-Boc, **23** et **24a-c** respectivement, ayant été préparés dans des conditions usuelles (BOC₂O, DMAP, CH₂Cl₂) avec de bons rendements (Schéma 39).

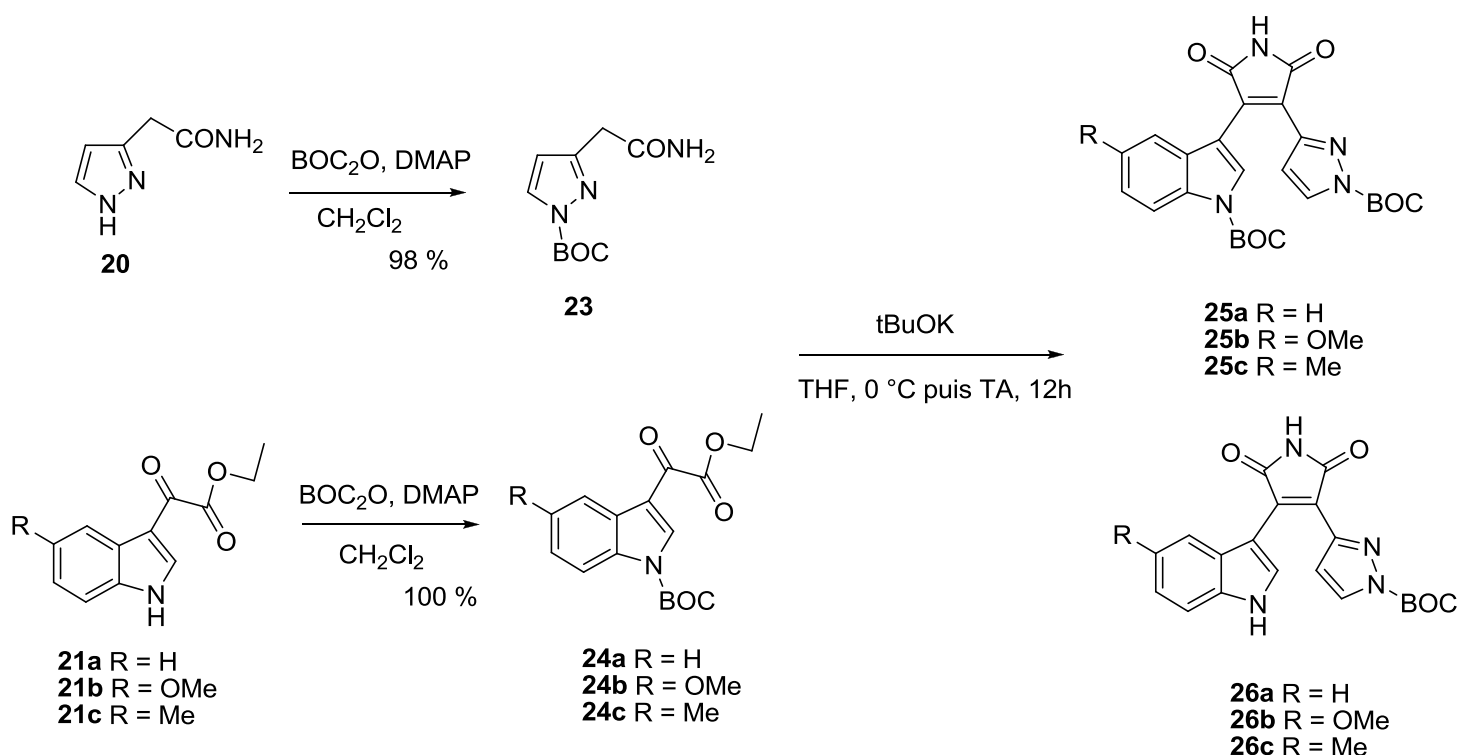


Schéma 39 : Préparation des intermédiaires acycliques selon les conditions décrites par Faul et al.

La combinaison **23/24a** a alors été soumise aux mêmes conditions de couplage de Faul et cette fois-ci, une conversion totale des précurseurs a été observée. Alors que le composé **25a** correspondant au composé **22a** portant deux groupements protecteurs Boc n'a pas pu être isolé, nous avons détecté après purification la présence du produit monoprotégé **26a**, témoignant de la déprotection partielle du groupement Boc dans les conditions basiques appliquées. Le travail de purification se révélant particulièrement fastidieux, nous avons décidé de poursuivre la synthèse sans purifier les composés obtenus à cette étape et donc d'engager le brut réactionnel dans l'étape de cyclisation ultérieure.

D'un point de vue mécanistique, la condensation de Faul met en jeu une succession de déprotonations, additions nucléophiles et éliminations, faisant intervenir notamment les intermédiaires **C** puis **D** qui après élimination de type E_{1cb} conduit à la formation du squelette maléimide **E** souhaité (Schéma 40).⁶⁸

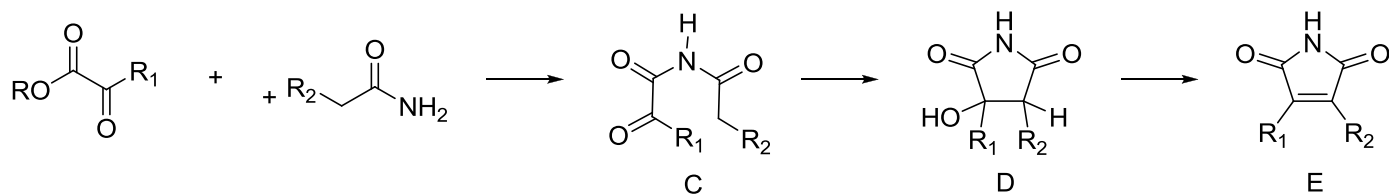


Schéma 40 : Mécanisme de formation du noyau maléimide proposé par Faul et al.⁶⁸

3. Préparation des analogues 27 : cyclisation photochimique des intermédiaires acycliques 26

Une telle étape de cyclisation par voie photochimique faisant intervenir de l'iode a été réalisée par Prudhomme *et al.* en 2003 pour accéder à des analogues de la rebeccamycine.⁶⁹

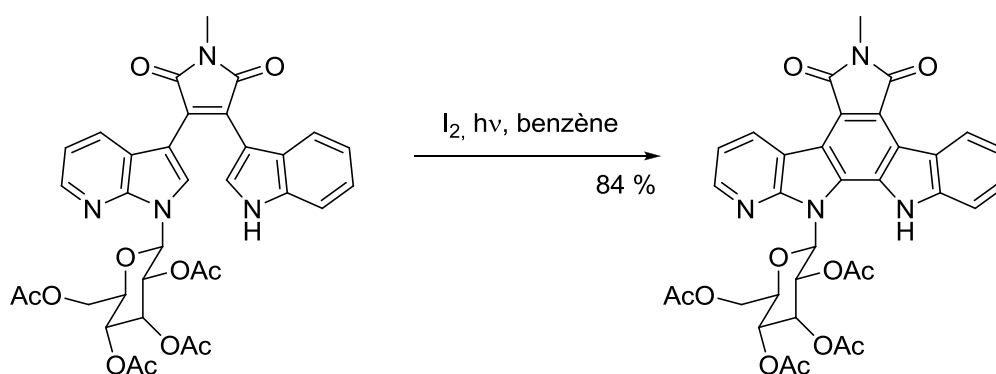


Schéma 41 : Photocyclisation des analogues de la rebeccamycine par Prudhomme et al.

Pour notre part, nous avons ainsi suivi une démarche analogue à celle utilisée pour la série A pour envisager la cyclisation par voie photochimique des intermédiaires **26a-c** en les produits **27a-c** (Schéma 42). Il est à noter que la présence du groupement protecteur Boc sur la partie pyrazole des précurseurs **26a-c** est déterminante quant à la progression de la cyclisation, sa présence permettant la formation d'une liaison C-C (Schéma 42) plutôt qu'une liaison C-N, conduisant aux analogues A (comme cela est illustré schéma 43).

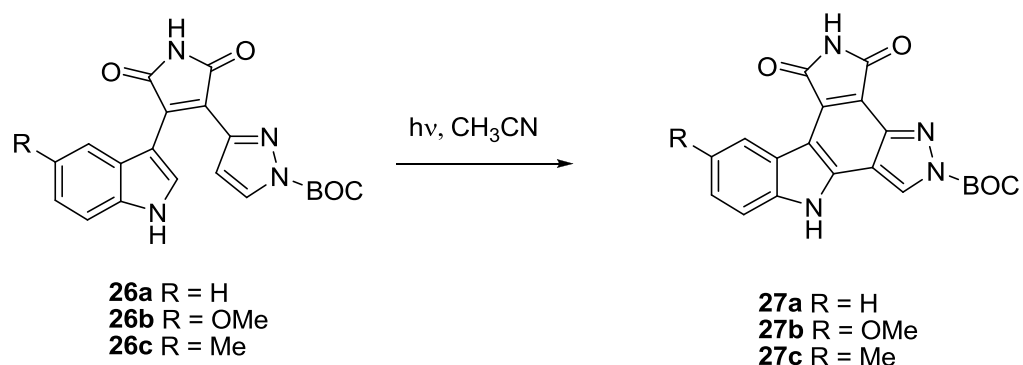


Schéma 42 : Photocyclisation des intermédiaires **26**

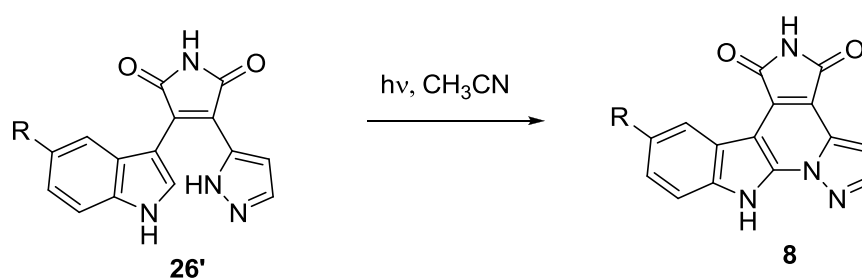


Schéma 43 : Evolution possible de la photocyclisation de **26** en **8** sans la présence de groupement protecteur

Dans un premier temps, l'analyse par spectroscopie UV-Visible du réactif nous a aussi permis de choisir la longueur d'onde de travail et pour les mêmes raisons que celles avancées pour la cyclisation des intermédiaires **11** (Schéma 31), nous avons irradié les intermédiaires **26a-c** à la longueur d'onde de 350 nm. (Figure 22)

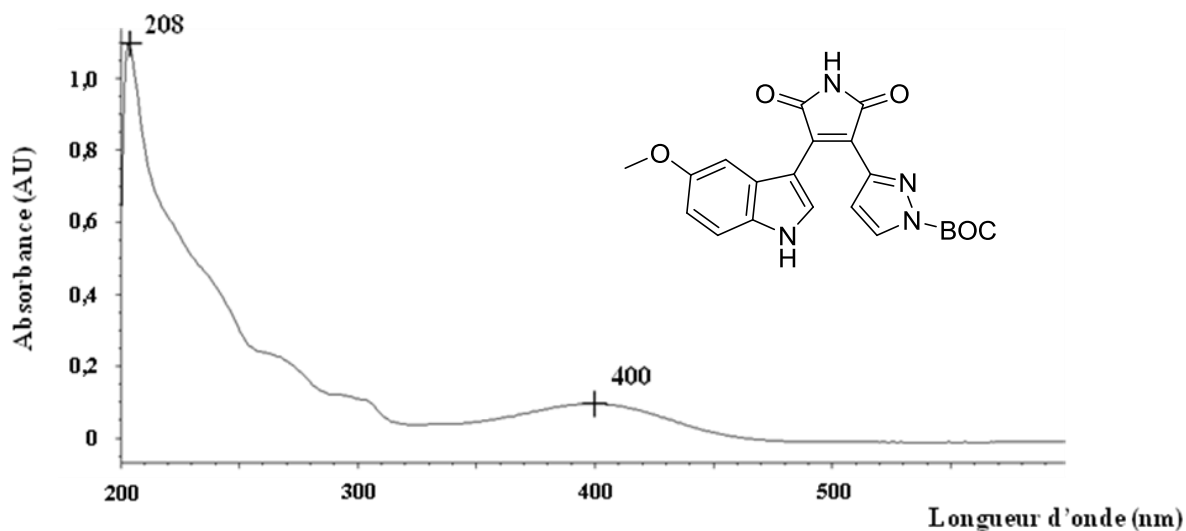


Figure 22 : Spectre UV-visible du composé **26b**

[c] = 2 nM, l = 1 cm, solvant : éthanol

Comme cela a déjà été souligné, la concentration est un paramètre important dans les réactions photochimiques et travailler à partir du brut réactionnel de la condensation de Faul a rendu la maîtrise de cette étape délicate. Toutefois, sous certaines conditions de concentration, les produits **27a-c** ont précipité et ont ainsi pu être isolés par simple filtration.

4. Déprotection

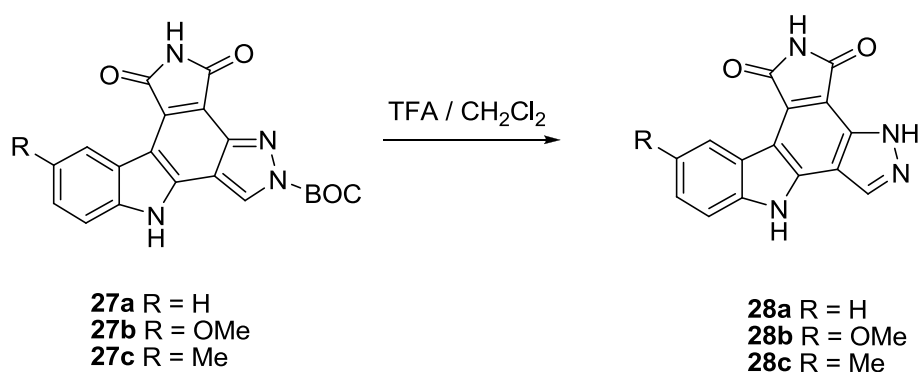


Schéma 44 : Obtention des analogues B de la série pyrazole

La déprotection de la partie pyrazole des produits **27** se fait par action du TFA en solution dans le CH_2Cl_2 avec des rendements satisfaisants. Cette déprotection conduit à une aromatisation du cycle benzénique central.

Au bilan, ces trois dernières étapes, couplage, cyclisation et déprotection nous ont permis d'obtenir les produits **28** avec un rendement ne dépassant pas les 5 %.

B. Seconde approche

A la vue du travail nécessaire pour atteindre les analogues visés, en partant de produits commerciaux (12 étapes, rendement global de 1,5 %) il semblait intéressant de nous intéresser à une autre voie de synthèse plus courte. Formellement, ces analogues sont composés d'un indole, d'un maléimide et d'un pyrazole condensés autour d'un cycle benzénique central (Figure 23).

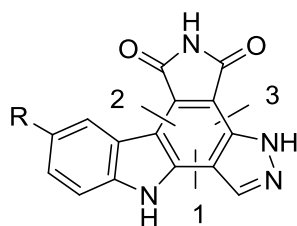


Figure 23 : Structure des analogues B

Nous avons vu au cours des paragraphes précédents que la réaction photochimique à partir de composés ouverts de type **26** nous permet d'accéder proprement aux produits cyclisés en créant la liaison 1. La liaison 2 peut être issue de l'addition du dibromomaléimide sur le noyau indolique comme cela a déjà été décrit dans la synthèse de Yoshida (cf partie II-4) via l'action d'un lithien. La liaison 3 pourrait provenir d'un couplage de type Suzuki entre le dérivé bromé obtenu grâce au dibromomaléimide sur un pyrazole boronique. La voie de rétrosynthèse envisagée est présentée Schéma 45.

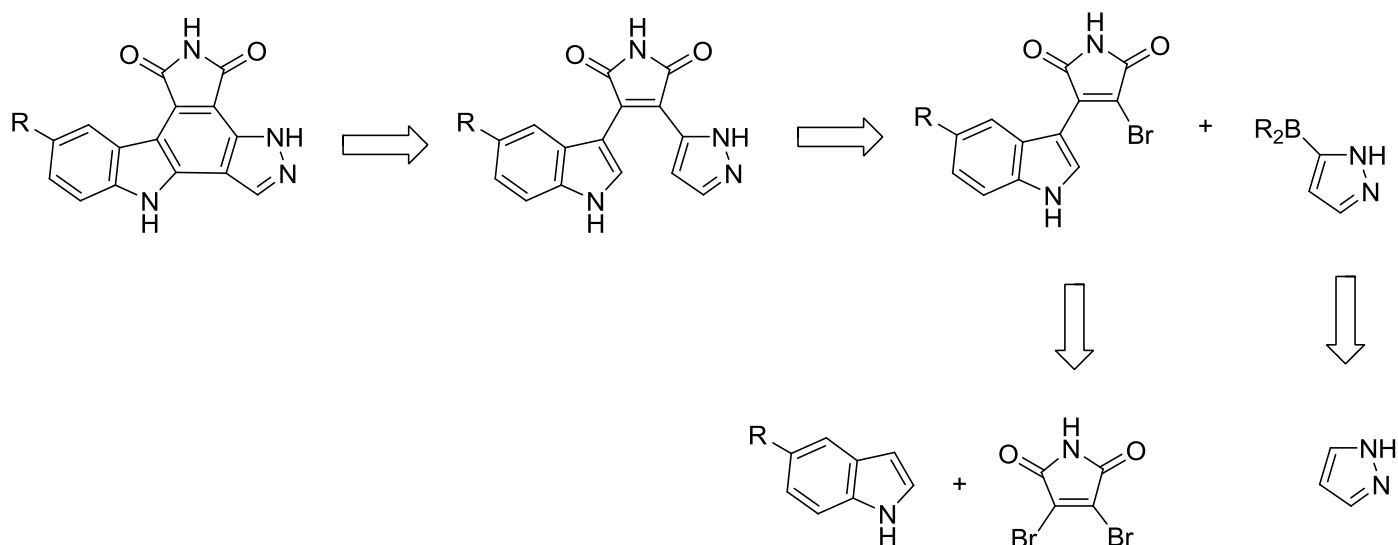


Schéma 45 : Seconde rétrosynthèse pour les analogues B

1. Synthèse de l'ester boronique du pyrazole

Pour atteindre les analogues voulus, il faut un cycle pyrazole comportant un groupement boronique en α d'un azote. Ce type de composé a été décrit par MacLaughlin *et al.* via une synthèse en deux étapes à l'échelle de la mole (Schéma 46).⁷⁰

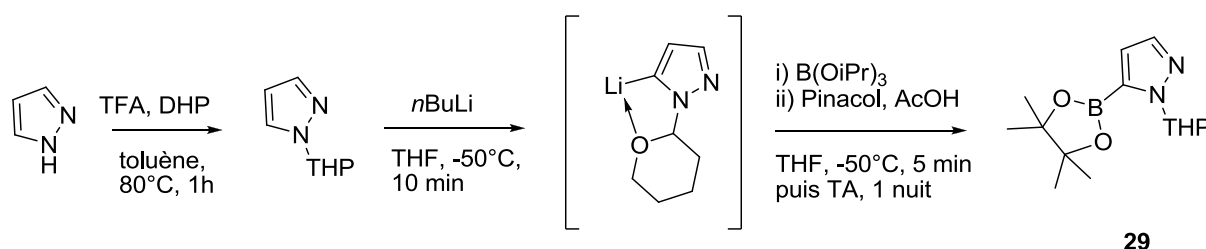


Schéma 46 : Préparation du pyrazole boronique

Dans un premier temps, MacLaughlin *et al.* introduisent un groupement THP sur l'azote du pyrazole. Le *n*-BuLi permet la préparation de l'anion correspondant qui réagit ensuite sur le $B(OiPr)_3$. En dernier lieu, l'addition du pinacol permet la stabilisation du boronique. Sous cette forme, il ne lui est plus possible de dimériser.

Tout au long de ces deux étapes, le contrôle de la température est décrit comme important. Selon le cas, il faut rester en dessous de 80 °C (première partie) ou -40 °C et -30 °C (deuxième partie).

Il est à noter que le milieu réactionnel devient visqueux rendant l'utilisation d'une agitation magnétique impossible. Nous avons utilisé un réacteur à quatre cols et une agitation mécanique pour cette synthèse.

Dans cet exemple, le groupement THP n'est pas qu'un simple groupement protecteur. Il est en effet décrit comme « métallo-directeur » puisque la deuxième étape se fait en présence de nBuLi dont l'ion Li sera chélaté par l'oxygène du THP. La déprotonation se fera en α de l'azote assurant ainsi la régiosélectivité voulue pour la préparation du boronique.

2. Synthèse du dérivé bromé

La synthèse du dérivé bromé est décrite par Aurélie Bourderieux selon un protocole faisant intervenir du LiHMDS.

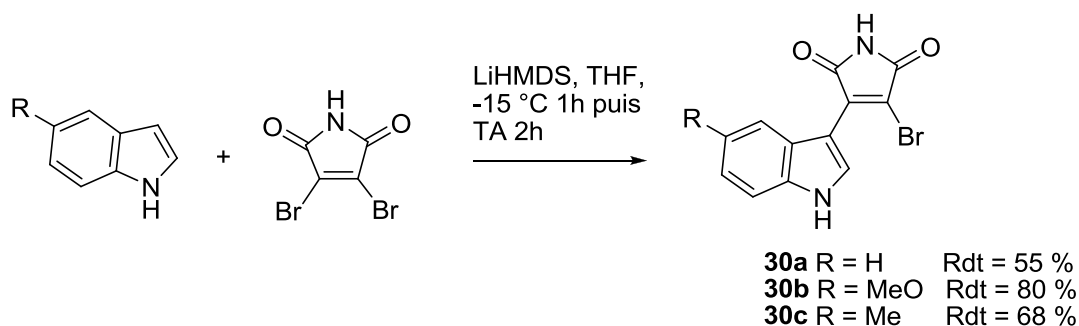


Schéma 47 : Préparation des intermédiaires bromés **30**

Ce protocole est semblable à celui utilisé dans la synthèse des composés **11a-c** de la série pyrazole A (partie II-4). Le LiHMDS, à basse température forme le lithien de l'indole qui réagit avec le dibromomaléimide.

Cette étape, décrite sur l'indole⁷¹ et le dérivé méthoxy⁷², a été réalisée sur les 3 indoles substitués et a conduit aux produits **30a-c** avec des rendements allant de 55 % à 80 %.

3. Couplage de Suzuki

Nous avons dans un premier temps réalisé cette étape de couplage dans les conditions décrites par Prudhomme *et al.* représentées Schéma 48.⁷³

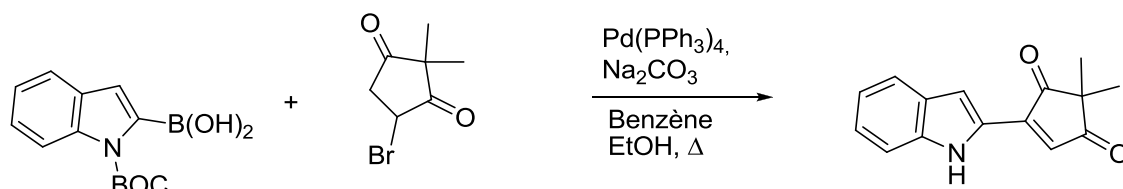


Schéma 48 : Couplage de Suzuki selon Prudhomme et al.

Appliquées à nos réactifs, ce couplage de Suzuki nous a permis d'obtenir l'intermédiaire ouvert sans substituant **31a** uniquement (Schéma 49).

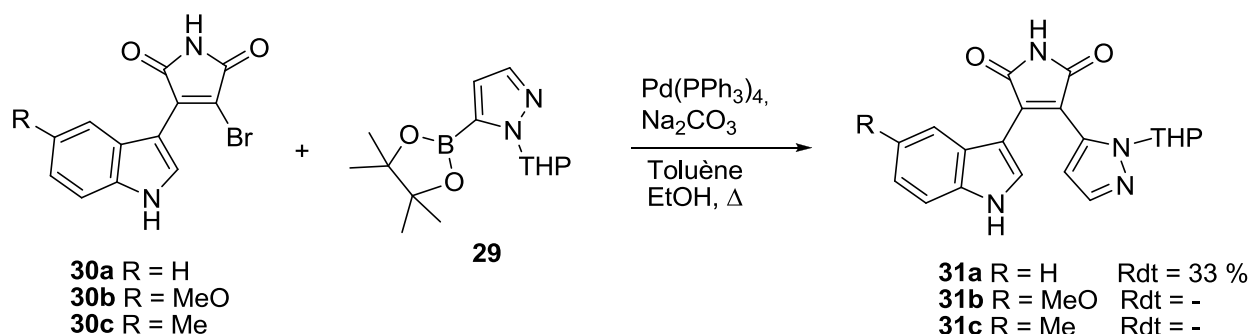


Schéma 49 : Couplage de Suzuki

En effet, malgré nos efforts pour utiliser d'autres conditions expérimentales en terme de solvant, bases et catalyseur, il nous a été impossible, jusqu'à présent, d'obtenir les produits **31b** et **31c** autrement qu'à l'état de traces détectées par spectrométrie de masse.

Les trop faibles quantités obtenues pour les dérivées MeO et Me ne nous ont pas permis d'envisager la suite de la synthèse sur ces deux analogues.

4. Cyclisation photochimique

A partir du travail réalisé en amont sur la réaction de cyclisation pour ce type d'intermédiaire, semblables aux composés obtenus via la méthode de Faul (voir C-1-c) l'obtention du composé **32** a été facilitée (Schéma 50).

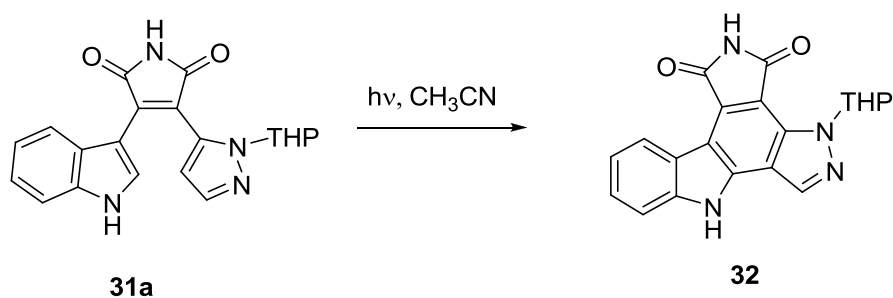


Schéma 50 : Photocyclisation de l'intermédiaire 31a

Là encore, l'utilisation d'un rayonnement à 350 nm, une puissance de 128 W sur le composé **31a** en solutions dans de l'acétonitrile nous a permis de synthétiser le produit cyclisé **32** avec un bon rendement.

Le brut réactionnel a été engagé dans l'étape de déprotection dans purification afin de minimiser les pertes de produits.

5. Déprotection

Le clivage du groupement THP se fait facilement dans des conditions acides.⁷⁰ L'utilisation d'une solution d'HCl dans le méthanol nous a permis d'obtenir le dérivé cyclisé attendu (Schéma 51) dont on a pu vérifier par comparaison des spectres RMN ^1H et ^{13}C qu'il était bien le même que celui obtenu via la méthode de Faul.

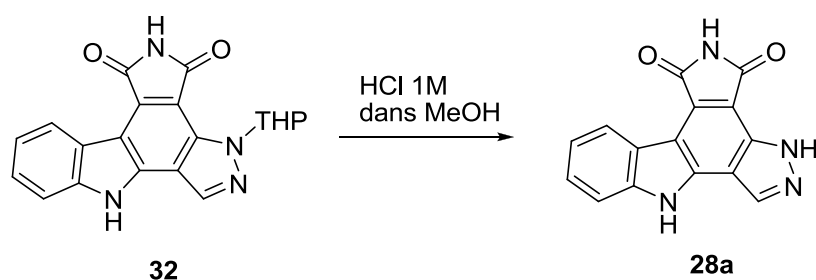


Schéma 51 : Déprotection de l'intermédiaire 32

6. Vers la synthèse des analogues

L'analogues pyrazole de type B générique (R = H) a pu être préparé via ce couplage de Suzuki en seulement 4 étapes avec un rendement du même ordre de grandeur que pour la méthode précédente. Il apparaît toutefois clairement que cette voie de synthèse permet l'accès aux analogues de type B plus rapidement. Un travail de méthodologie approfondi sur

le couplage de Suzuki devrait permettre d'obtenir les intermédiaires acycliques des séries méthoxy et méthyle avec des rendements corrects de façon à privilégier cette voie de préparation.

Partie 2 : SYNTHÈSE D'ANALOGUES TETRACYCLIQUES DE LA GRANULATICIMIDE

En plus du travail concernant les analogues pentacycliques de la granulaticimide, nous avons voulu regarder s'il était possible de mettre à jour de nouveaux cœurs hétérocycliques capables de pénétrer le site actif de la protéine. Pour ce travail de prospective, nous nous sommes intéressés à des structures tétracycliques de formule générale suivante :

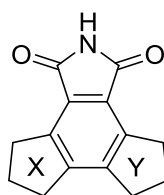


Figure 24 : Structure générale des analogues tétracycliques

Comme les produits naturels granulaticimide et isogranulaticimide, elles comprennent un cycle benzénique central entouré de trois pentacycles dont un cycle maléimide indispensable pour l'ancrage de la molécule dans le site actif de la protéine. Les deux autres pentacycles X et Y sont choisis parmi les noyaux pyrrole, pyrazole, imidazole, maléimide et cyclopentène.

I. Molécules symétriques, premier squelette X = Y = pyrrole

Récemment, dans le but de faire des marqueurs de fluorescence, Lin *et al.* se sont intéressés à des structure symétriques ouvertes comportant soit deux pyrroles, soit deux indoles. Ils ont ainsi montré qu'en ne travaillant pas à froid mais en chauffant, l'utilisation d'un réactif de Grignard lors de l'addition du pyrrole sur le dibromomaleimide permet l'introduction de deux noyaux pyrroles.⁷⁴ Nous avons repris ce protocole pour obtenir le composé **33** qui est obtenu pur avec un rendement de l'ordre de 16 %. Un peu de produit **34** (5 %), correspondant à l'addition d'une seule molécule de pyrrole est aussi obtenu lors de cette réaction. Ces mauvais rendements s'expliquent du fait de la purification que nous n'avons pas optimisée.

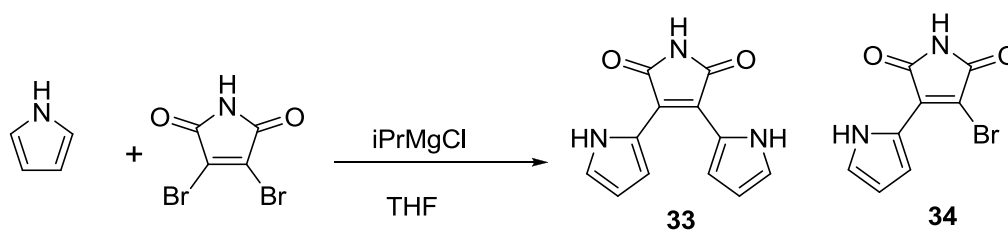


Schéma 52 : Préparation du composé 33

La cyclisation de ce composé a été tentée par voie photochimique mais n'a pas permis pour le moment d'accéder au composé 35 attendu.

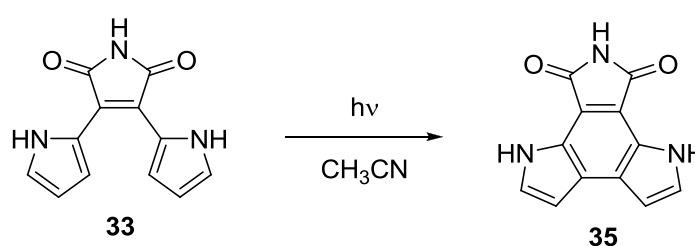


Schéma 53 : Photocyclisation du composé 33

II. Molécules disymétriques, deuxième squelette X = pyrrole, Y = pyrazole

Pour le deuxième type de squelette que nous voulions faire, il nous semblait intéressant d'utiliser le synthon 34 précédemment obtenu. Mais dans un premier temps, il était important d'avoir une méthode de préparation plus efficace. Pour cela, nous avons adapté un protocole proposé par Routier *et al.*⁷¹ qui synthétisaient un synthon analogue, mais comportant un indole à la place du pyrrole. Ce synthon était ensuite, mis en jeu dans des réactions de Suzuki. L'addition du pyrrole sur le dibromomaléimide se fait en présence de LiHMDS. Ce dernier arrache un proton du pyrrole, l'anion formé attaque ensuite un des carbones du maléimide portant un brome, avec départ de Br⁻.

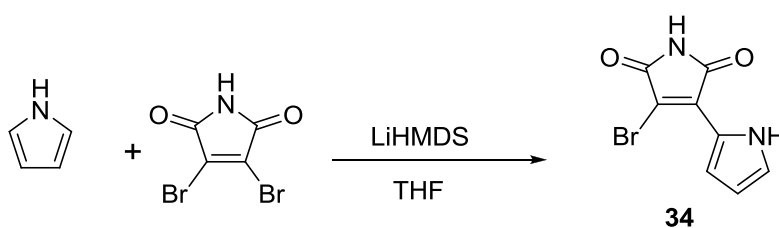
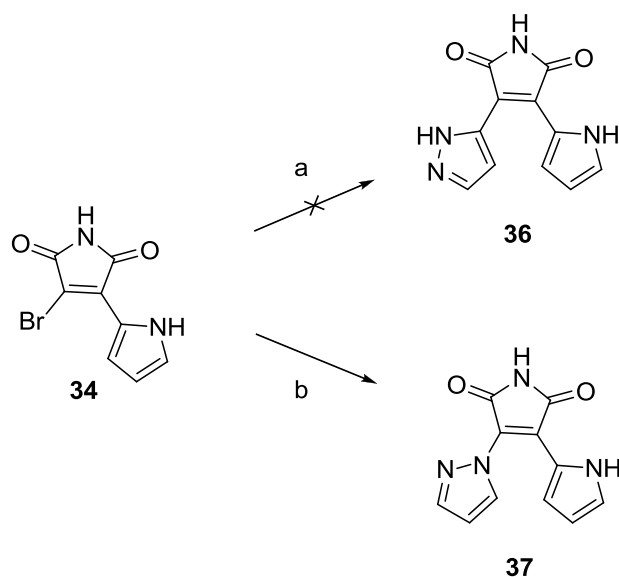


Schéma 54 : Préparation du composé 34

Dans notre cas, on obtient le composé **34** avec un rendement de 80 % correspondant à la formation d'un anion en position 2 du pyrrole.

Pour introduire un noyau pyrazole sur le composé **34**, notre première idée a aussi été de faire des réactions de Suzuki, d'autant que nous disposions du pyrazole boronique **29**. Nos différentes tentatives en ce sens n'ont pas abouti au composé **36** mais se sont heurtées à des échecs.



a : **29**, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, Toluène, EtOH, Δ ; b : pyrazole, CuI, 1-10 phénanthroline, Cs₂CO₃, DMF, tube scellé, Δ

Schéma 55 : Préparation de l'intermédiaire acyclique **37**

Nous avons ensuite adapté un protocole proposé par Kuduk et al. qui introduisait un noyau pyrazole sur un noyau aromatique. La réaction entre le composé **34** et le pyrazole en présence de CuI et 1-10 phénanthroline, a conduit au composé **37** qui pouvait aussi conduire par cyclisation à un dérivé tétracyclique intéressant.⁷⁵

Cette fois encore, la réaction de cyclisation pour conduire au composé **38** comportant un cycle pyridinique central a été tentée sans succès par photochimie en utilisant les conditions décrites par Prudhomme pour la préparation des aza-analogues de la rébeccamycine.⁶⁹

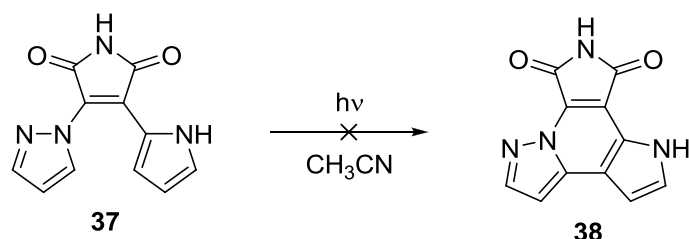


Schéma 55 : Préparation de 38 à partir de 37

III. Molécules disymétriques, troisième squelette X = pyrrole, Y = 2^{ème} maléimide

Le squelette hétérocyclique suivant auquel nous nous sommes intéressés comporte en plus de l'enchaînement maléimide / benzène / pyrrole, un deuxième motif maléimide.

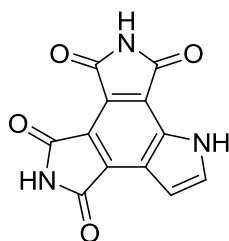


Figure 25 : Structure des analogues tétracycliques comportant un deuxième cycle maléimide

Cette molécule s'inspire d'une série développée par Prudhomme et son équipe dans laquelle le cycle imidazole de la granulatinide a été remplacé par un deuxième cycle maléimide. Certaines des molécules qu'ils ont étudiées présentent une activité inhibitrice vis-à-vis de la Chk1 de l'ordre du nanomolaire ce qui constitue un gain de 2 unités de log par rapport aux produits naturels.

Le schéma de rétrosynthèse pour cette molécule a été pensé autour d'une réaction de Diels-Alder faisant intervenir un diène comprenant un pyrrole et un maléimide, et le maléimide.

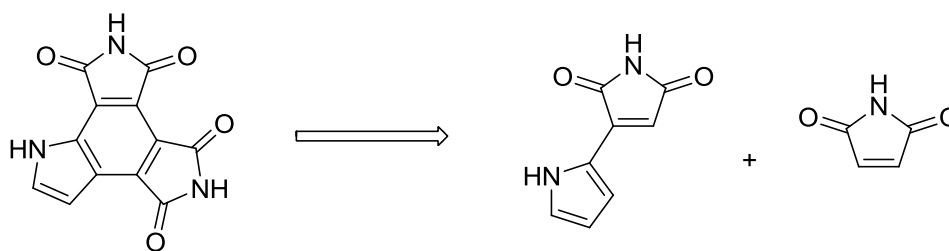
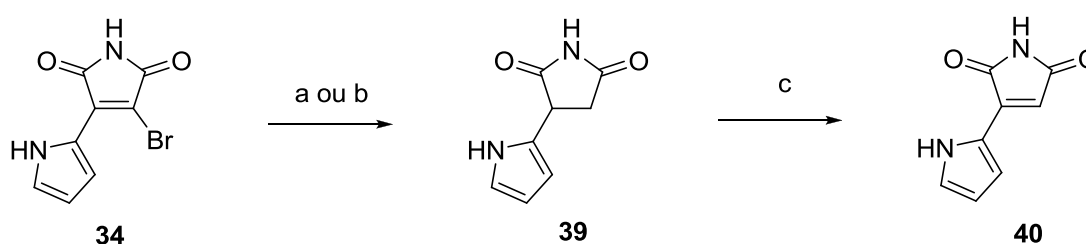


Schéma 57 : Rétrosynthèse des analogues tetracycliques comportant un deuxième cycle maléimide

La synthèse du diène **40** a été envisagée à partir du dérivé **34** selon le schéma réactionnel suivant :



a : H₂, Pd/C, MeOH, TA ; b : Zn THF/NH₄Cl, TA
c : MnO₂, CHCl₃

Schéma 58 : Préparation du diène **40**

La débromation du composé **34** se fait en deux étapes conformément à un protocole décrit par Prudhomme dans le cas d'un composé analogue, mais comportant un aza-indole à la place du pyrrole.⁷⁶ La première étape faisant intervenir l'hydrogène en présence de palladium sur charbon a conduit quelles que soient les conditions étudiées (stoechiométrie, température, temps de réaction) au composé **39** correspondant à la déhalogénéation de **34** accompagnée d'une réaction de réduction de la double liaison du maléimide. On a aussi observé un manque de reproductibilité des rendements obtenus (quelques pourcents à 84 %).

Nous avons voulu voir si une autre méthode de déhalogénéation n'impliquant pas une réduction de double liaison ne pouvait pas être utilisée. Pour cela nous nous sommes intéressés à une réaction de déhalogénéation sur un noyau aromatique décrite récemment par Hekmatshoar.⁷⁷ Elle se fait en présence de Zn dans un mélange THF/NH₄Cl. Malheureusement, cette réaction a aussi conduit au composé **39** avec un rendement plus faible (40 %) mais bien reproductible.

La deuxième étape dans la synthèse du diène est une étape d'oxydation pour recréer la double liaison du cycle maléimide. Dans sa suite réactionnelle, Prudhomme *et al.* utilisent le DDQ pour cette étape.⁷⁶ Dans notre cas, ce réactif ne s'est pas révélé efficace, néanmoins le produit attendu **40** a finalement pu être obtenu mais avec un faible rendement (de l'ordre de 10 %) par action du MnO₂.

Pour le moment, la réaction de Diels-Alder n'a pas encore été réalisée faute de temps.

IV. Molécules disymétriques, quatrième squelette X = pyrrole, Y = cyclopentène

En 2006, l'équipe d'Hudkins publie une série de molécules décrite pour inhiber la PARP-1, une enzyme nucléaire impliquée dans les processus de réparation de l'ADN.⁷⁸ Elle catalyse la synthèse de chaînes Poly ADP ribose à partir du NAD⁺ en réponse à des coupures d'ADN simple brin. Parmi les composés les plus efficaces, on note le composé **41** qui inhibe l'enzyme avec un IC₅₀ de 40 nM.

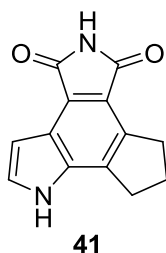
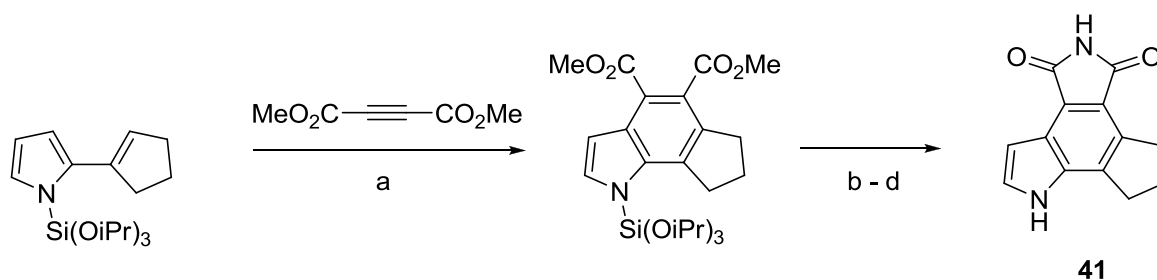


Figure 26 : Structure du composé **41**

La synthèse de ce composé était réalisée en quatre étapes sur la base d'une réaction de Diels-Alder entre le diène comportant un pyrrole et un cyclopentène, et l'acétylène dicarboxylate de méthyle.



a : sans solvant, 150 °C, 64h ; b : 10 N NaOH en solution dans EtOH, reflux, 3 h ; (c) anhydride acétique, 73 h ; (d) (TMS)₂NH/MeOH, DMF, 73 °C, 4 h

Schéma 59 : Préparation du composé **41** par Hudkins et al.

Il nous a paru intéressant de voir quelle pouvait être l'activité de ce composé sur le checkpoint G2, le but étant d'envisager ensuite la série suivante.

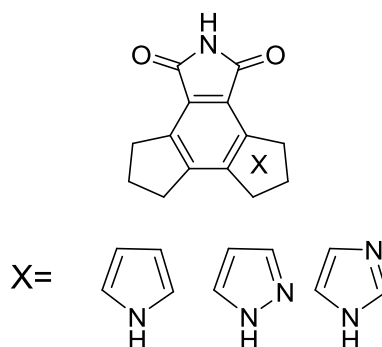


Figure 27 : Structure générale de la série tetracyclique comportant un cyclopentène

Nous avons donc étudié une synthèse alternative de ce composé basée aussi sur une réaction de Diels-Alder entre le même diène que celui utilisé par l'équipe d'Hudkins, le maléimide jouant cette fois le rôle de diénofile.

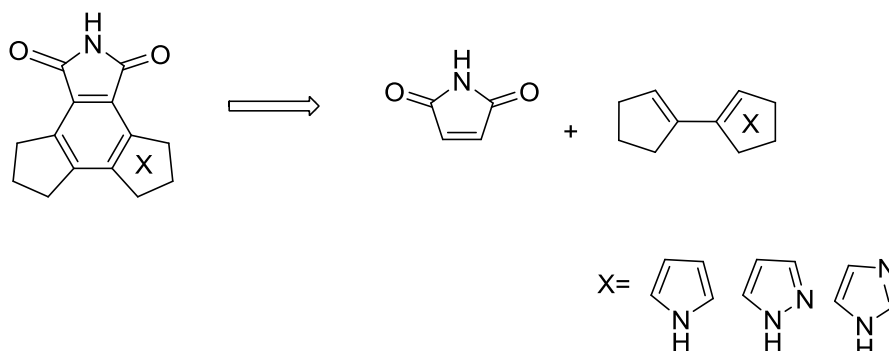


Schéma 60 : Rétrosynthèse des analogues tetracycliques comportant un cyclopentène

A. Synthèse des diènes

La synthèse du diène **42** a été décrite dans un brevet par Chatterjee⁷⁹ qui a modifié une procédure précédemment décrite par Tashiro *et al.*⁸⁰. Elle consiste à condenser l'énamine **43** sur un noyau pyrrole.

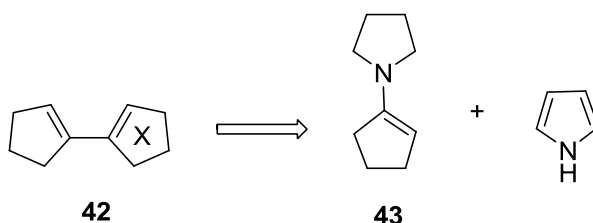


Schéma 61 : Rétrosynthèse des diènes **42**

Nous avons voulu voir s'il était possible de généraliser cette méthode pour obtenir les diènes comprenant les noyaux pyrazole et imidazole.

L'énamine, synthon commun aux 3 diènes, est obtenu selon le protocole reporté par Kuehne.⁸¹

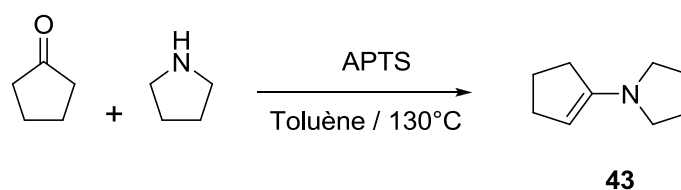


Schéma 62 : Préparation de l'énamine **43**

La condensation de la cyclopentanone sur la pyrrolidine se fait dans le toluène à 130 °C en présence de quelques cristaux d'APTS. Le produit **43** est isolé par distillation Kugelrohr, avec un rendement de l'ordre de 77 %.

Il est décrit que le produit doit être fraîchement préparé pour l'étape suivante. En effet, malgré une conservation à -16 °C, nous observons la dissociation de l'énamine pour redonner la cyclopentanone et la pyrrolidine.

1. Synthèse des diènes

L'énamine obtenue est condensée sans solvant à 145 °C pendant 5 h sur les hétéropentacycles pour donner les diènes voulus. Dans le cas du pyrrole et du pyrazole, on obtient deux diènes régioisomères l'un de l'autre, dans le cas de l'imidazole, un seul diène est obtenu

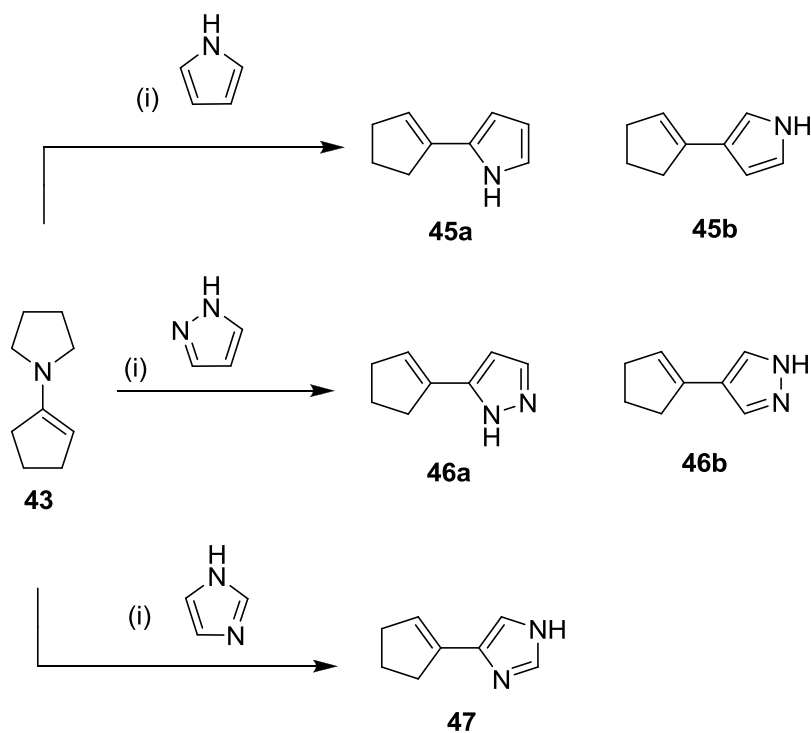


Schéma 63 : Préparation des diènes **45**, **46**, et **47**

a) Cas du Pyrrole

Il est décrit dans la littérature^{80,82} que lorsque la réaction du pyrrole sur une énamine similaire est réalisée dans des conditions douces (60 °C / 5 min), elle conduit avec un bon rendement (> 70 %) à l'adduit tricyclique **48** issu d'une réaction de N-alkylation du pyrrole.

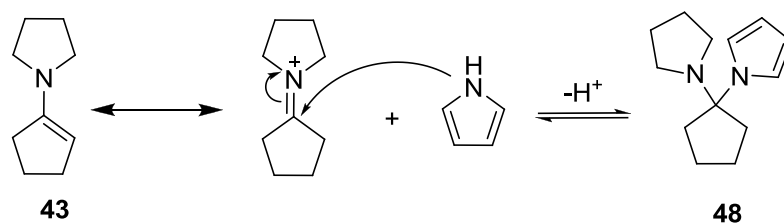


Schéma 64 : Addition du pyrrole sur l'énamine **43** dans des conditions douces

Par contre, en travaillant dans des conditions plus dures (150 °C / 5 h) comme nous l'avons fait, on observe la formation des produits de C-alkylation du pyrrole, les deux régioisomères **45a/45b**.

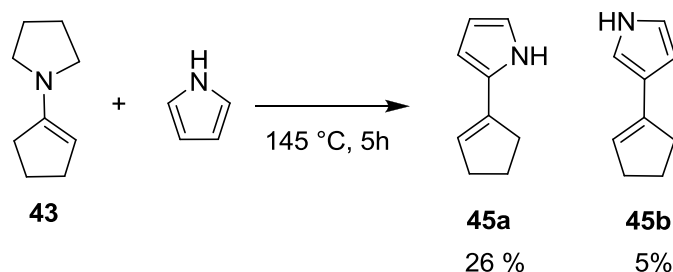


Schéma 65 : Préparation des diènes **45a** et **45b**

Ces deux régioisomères ont été séparés par flash chromatographie, ils sont obtenus avec des rendements respectifs de 26 et 5 %.

Ces faibles rendements peuvent être expliqués par la formation d'autres produits secondaires, parmi lesquels les deux composés **49** et **50**, résultant de l'addition d'une deuxième molécule d'énamine sur les diènes obtenus.

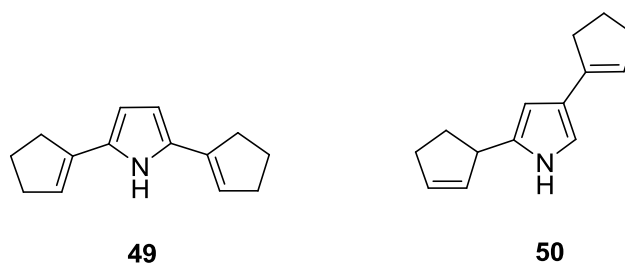


Figure 28 : Produits secondaires de l'addition du pyrrole sur l'énamine **43**

b) Cas du pyrazole

Une analyse similaire peut être faite pour la réaction du pyrazole sur l'énamine **43**.

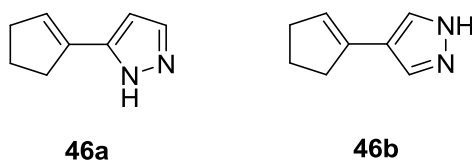


Figure 29 : Structure des diènes pyrazoles **46a** et **46b**

Les deux diènes régioisomères **46a** et **46b** ont été obtenus mais, dans ce cas, avec des rendements plus faibles que précédemment, respectivement de 3 et de 2 %.

c) Cas de l'imidazole

L'imidazole étant une molécule symétrique, un seul régioisomère **47** a été obtenu avec également un faible rendement.

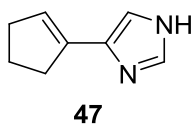


Figure 30 : Structure du diène imidazole **47**

2. Réaction de Diels-Alder

a) Cas du diène pyrrole

La réaction de Diels Alder a d'abord été étudiée dans le cas du diène **45** comportant un noyau pyrrole. Nous avons repris les conditions décrites par Tao *et al.* dans un cas similaire.⁷⁸ ce qui nous a amené à travailler sans solvant, à 190 °C pendant 3 h.

La réaction a été effectuée avec les deux isomères **45a** et **45b**, les deux adduits de Diels-Alder **41a** et **41b** ayant été obtenus avec des rendements respectifs de 17 et 15%.

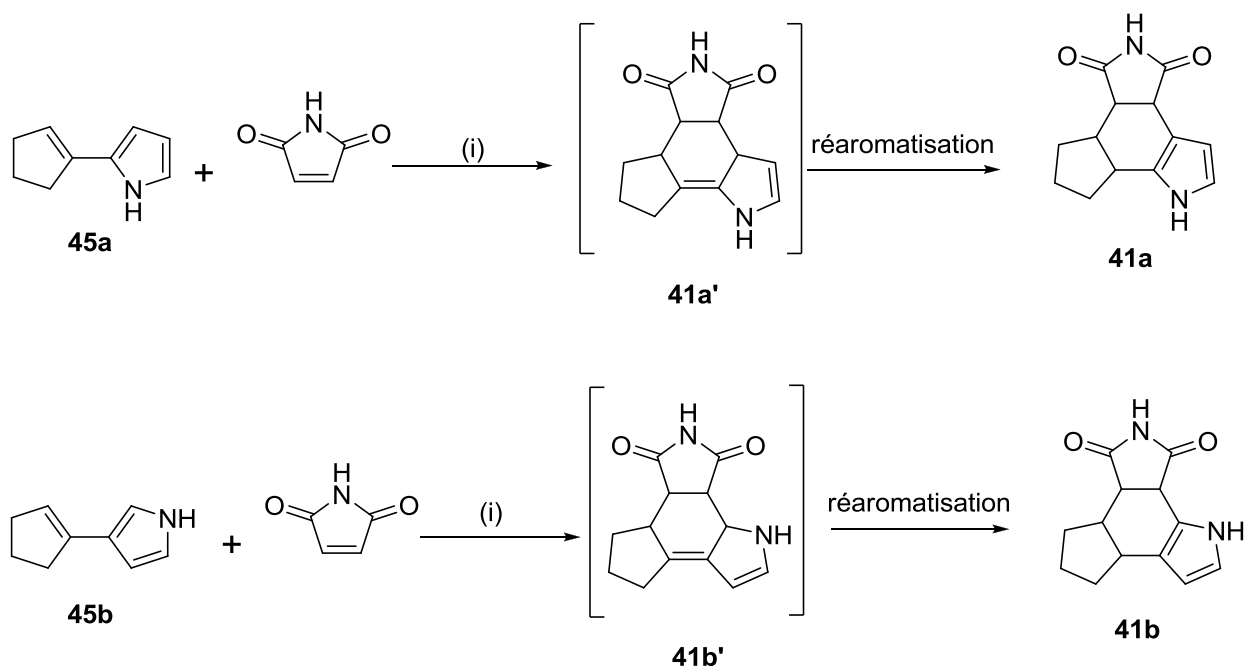


Schéma 66 : Préparation des composés 41 par une réaction de Diels Alder

D'après les spectres RMN des produits isolés, il semble que la double liaison des cycles à 6 chaînons des composés **41a'** et **41b'** formés théoriquement ait migré de façon à donner les composés **41a** et **41b** dans lequel le cycle pyrrole a retrouvé son aromaticité.

b) Cas du diène pyrazole

Dans le cas du diène comportant un noyau pyrazole, la réaction tentée dans les mêmes conditions que pour le pyrrole avec les diènes du pyrazole **46a** et **46b** n'a pas permis d'aboutir aux adduits de Diels-Alder **52a** et **52b** attendus mais au produit **7** correspondant à l'addition de Michael du pyrazole sur le maléimide. On retrouve ici le produit secondaire déjà obtenu lors de la condensation du composé **5** sur le maléimide. On avait dans ce cas expliqué sa formation par la rupture de la liaison C-N.

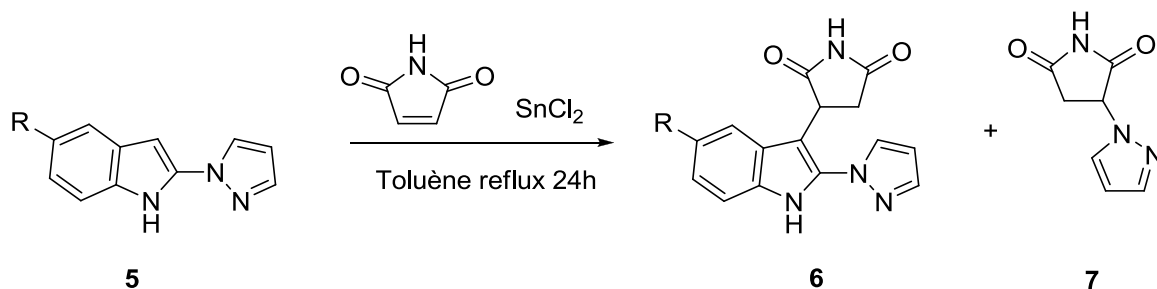
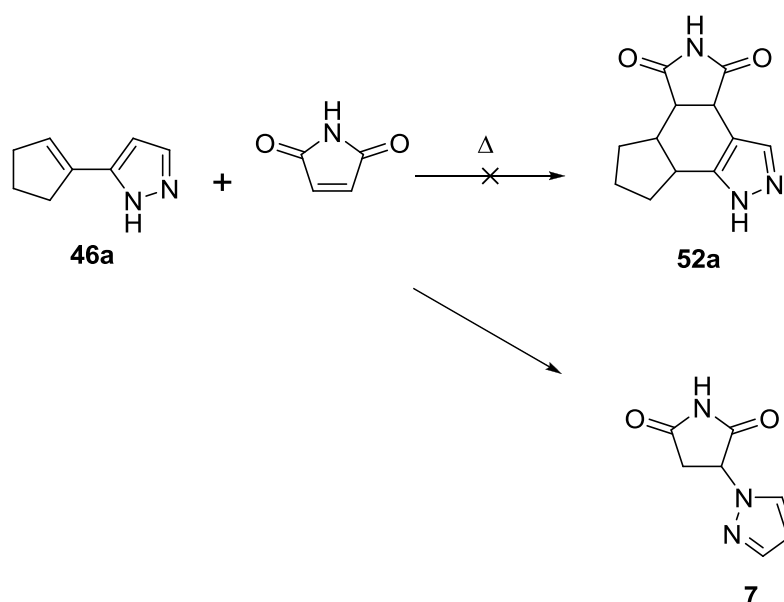


Schéma 67 : Synthèse des composés 6

Cette fois-ci, la réactivité semble différente puisqu'on a rupture d'une liaison C-C. D'autres conditions, notamment l'utilisation de microondes, ne se sont pas révélées plus efficaces pour aboutir aux adduits **52** attendus.

Schéma 68 : Réaction de Diels Alder à partir du diène pyrazole **46a**

Nous avons pensé que la formation du composé **7** dans lequel le noyau pyrazole est accroché au maléimide par son atome d'azote libre pouvait peut-être être évitée si cet atome d'azote était protégé. Nous avons donc protégé l'atome d'azote des diènes pyrazoles **46a** et **46b** par un groupement BOC.

Les diènes protégés **53a** et **53b** ont été obtenus par action du BOC_2O dans le THF avec des rendements respectifs de 11 et 3 % que nous n'avons pas cherché à optimiser.

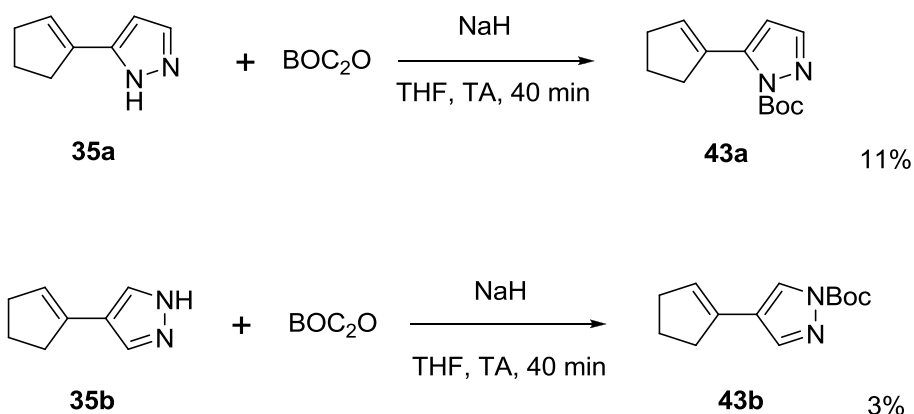


Schéma 69 : Protection des diènes **46a** et **46b**

La réaction de Diels-Alder a été tentée avec ces derniers diènes protégés dans diverses conditions (thermiques, micro-ondes, travail en tube scellé) mais n'a malheureusement pas conduit aux adduits attendus. Cette fois encore la liaison C-C entre le cyclopentène et le pyrazole semble s'être coupée, sa rupture dans les conditions testées ayant de nouveau conduit au composé **7**.

3. Aromatisation de l'adduit de Diels Alder

Les adduits de Diels-Alder obtenus avec comme hétérocycle le pyrrole **41a** et **41b** ont ensuite été oxydés avec de la 2,4-dichloro-5,6-dicyano benzoquinone comme cela a été décrit dans les travaux de Tao *et al.* pour des molécules similaires.⁷⁸

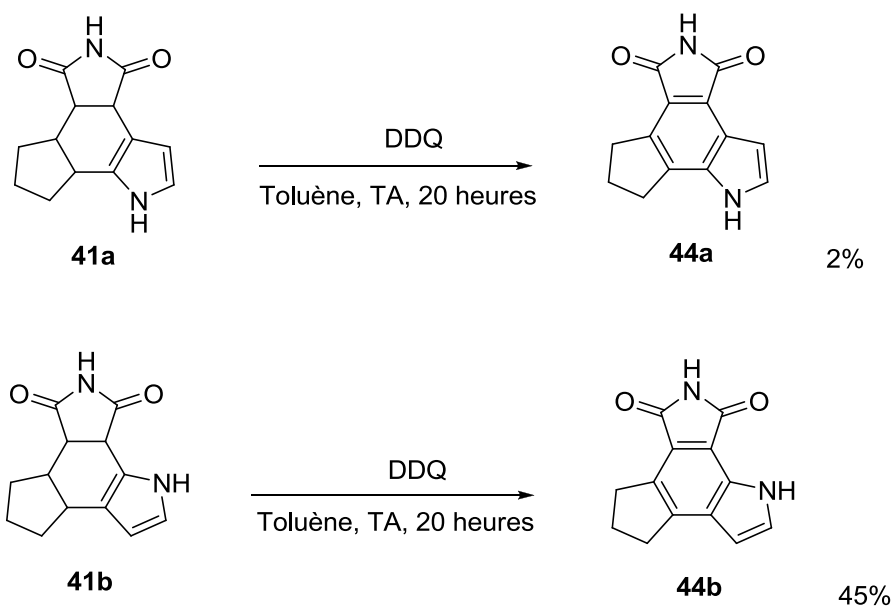


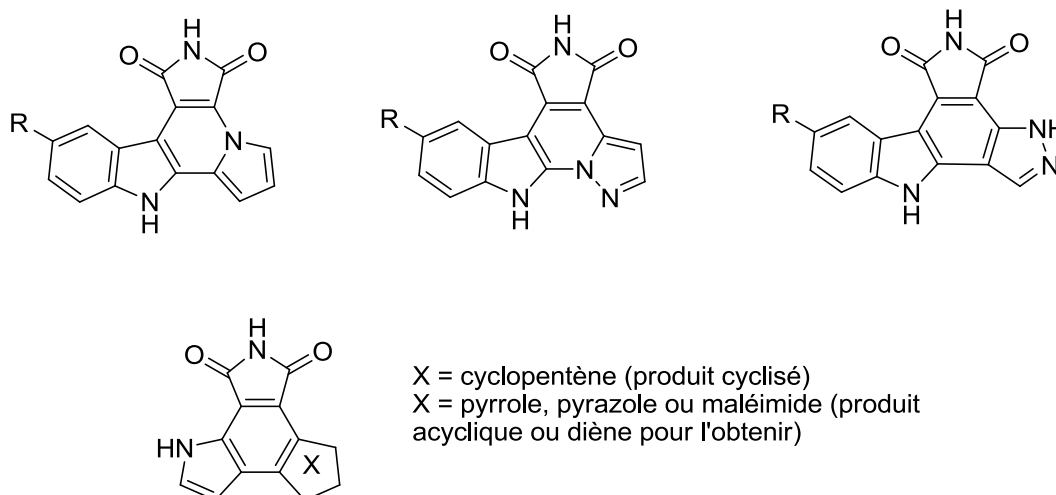
Schéma 70 : Synthèse des analogues tetracycliques **54a** et **54b**

Les deux régioisomères **54a** et **54b** ont été obtenus avec des rendements faibles de l'ordre de 2 %. Pour optimiser ce rendement, dans le cas du régioisomère **54b**, nous avons procédé à un lavage basique qui a permis la déprotonation de la forme réduite du DDQ et donc son passage en phase aqueuse. La purification par flash chromatographie s'en est trouvée facilitée. Le composé **54b** a ainsi été obtenu avec un rendement de 45 %. On peut supposer qu'un rendement équivalent serait observé dans le cas de l'autre isomère si nous utilisions un traitement identique, travail que nous n'avons pas fait car nous disposions de suffisamment de produit pour les tests biologiques.

Au bilan dans cette série, pour le moment, seuls les deux analogues comportant un cycle pyrrole ont pu être préparés, ceux comportant un cycle pyrazole n'ont pas été obtenus, quant à celui comportant un cycle imidazole, la voie de synthèse reste encore à être validée.

Au cours de ce chapitre, nous avons synthétisé une série « d'analogues pyrroles » des alcaloïdes granulatinimide et isogranulatinimide. Ces composés, obtenus sur la base d'une réaction de Michael entre un indolopyrrole diversement substitué en para de l'azote indolique et le maléimide, exceptés deux, sont originaux. Nous avons aussi préparés deux séries « d'analogues pyrazoles » (type A et type B) selon que le cycle central est benzénique ou pyridinique. Les composés de type A sont synthétisés à partir de la condensation d'un indolopyrazole sur le dibromomaléimide tandis que les composés de type B sont obtenus sur la base d'une réaction de condensation faisant intervenir un indolyglyoxylate et un pyrazole-acétamide. Tous les analogues pyrazoles préparés sont des composés originaux.

D'autres structures tétracycliques analogues ont aussi été étudiées dont certaines fins de synthèse restent encore à être mises au point, notamment les réactions de cyclisation finale. Nous avons toutefois, pour le moment pu obtenir deux structures isomères comportant en plus des cycles benzénique central et maléimide, un cycle pyrrole et un cycle cyclopentène.



Certaines pistes pour une diversification des différentes structures obtenues ont été explorées, le travail effectué ouvrant des portes pour l'accès à des structures de plus en plus originales.

CHAPITRE III

EVALUATIONS
BIOLOGIQUES

Les analogues de la granulatinimide et l'isogranulatinimide que nous avons synthétisés ont été évalué selon deux critères, leur inhibition de croissance de population cellulaire, travail qui a été réalisé par l'équipe du Professeur R. Kiss, au laboratoire de toxicologie, de la Faculté de Pharmacie de l'Université Libre de Bruxelles, et leur inhibition du checkpoint G2, mesure effectuée par l'équipe du Pr. B. Ducommun à l'Institut Pierre Potier de Toulouse

I. Principe des tests

A. Test d'inhibition de la croissance globale de la population cellulaire

L'évaluation de l'activité anti-tumorale *in vitro* en termes d'inhibition de la croissance cellulaire a été réalisée à l'aide du test colorimétrique au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (sels de tétrazolium MTT) qui permet indirectement de mesurer l'effet de composés potentiellement anti-cancéreux sur la croissance globale de lignées cellulaires issues de différentes origines.⁸³ Il est basé sur la capacité d'une cellule vivante à réduire les sels de tétrazolium MTT, produit jaune, en formazan, produit bleu, grâce à une réaction de réduction ayant lieu au sein des mitochondries (Figure 30). La quantité de formazan est alors évaluée par spectrophotométrie UV-Visible.

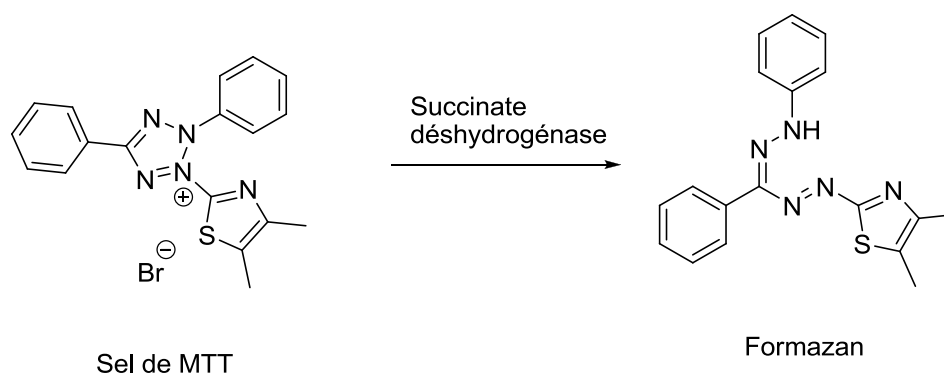


Figure 30 : Réaction ayant lieu au sein de la mitochondrie

On peut ainsi quantifier la croissance cellulaire en fonction de la concentration en produit à tester. Pour chaque composé, à une concentration donnée, la quantité de cellule viable est rapporté à celle de l'expérience contrôle réalisée dans les mêmes conditions mais sans le produit à tester. En rassemblant les valeurs obtenues en fonction de la concentration (voir

Figure 31), on peut déterminer l'IC₅₀, concentration en produit qui réduit de 50 % la croissance de la population cellulaire.

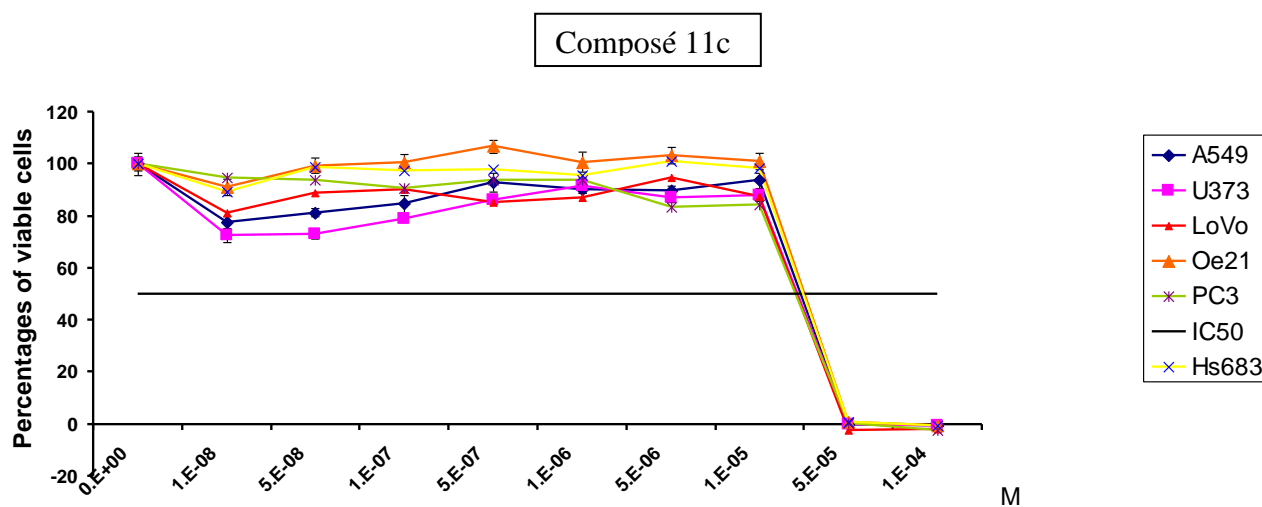


Figure 31 : Exemple de courbes de viabilité cellulaire (lignées U373, A549, LoVo, OE21, PC et Hs683) après 3 jours de traitement avec le composé **11c** à des concentrations allant jusqu'à 100 μ M (testé) 0 nM (contrôle), puis de 10 nM à 100 μ M tous les demi-log)

Le test colorimétrique MTT permet de déterminer la concentration qui réduit de 50% la croissance d'une lignée cellulaire donnée traitée par un produit donné. En revanche, ce test ne permet nullement de savoir si la réduction de 50% de croissance induite par un produit donné est liée à un effet cytotoxique (le produit tue les cellules), cytostatique (le produit inhibe la prolifération cellulaire) ou encore anti-adhésif (le produit détache les cellules de leur support), ou une combinaison de ces divers effets.

Nous avons donc fait appel à la microscopie à contraste de phase assistée par ordinateur (vidéomicroscopie quantitative) pour visualiser les effets induits par certains produits d'intérêt sur les lignées de glioblastome humain U373.

B. Test d'inhibition du checkpoint G2

L'évaluation de l'inhibition du checkpoint G2 a été réalisée selon un protocole adapté du travail de Roberge *et al.*¹⁵ Il semble important de revenir sur quelques notions afin de comprendre ce test.

Nous avons vu au cours du premier chapitre qu'une cellule qui se divise passe par 4 phases : G1, S, G2, M. Au cours de la phase S, la quantité d'ADN de la cellule double passant de $2N$ à $4N$. On peut donc représenter l'évolution de la quantité d'ADN selon le schéma suivant présenté en figure 44.

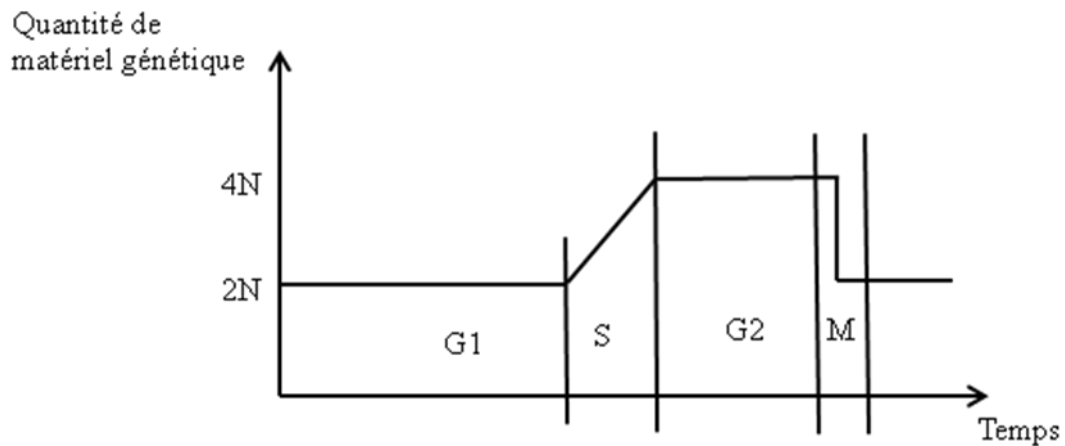


Figure 32 : Evolution de la quantité d'ADN au cours du cycle cellulaire

Le test réalisé afin d'évaluer l'inhibition de la transition G2/M repose sur le déclenchement du point de contrôle G2/M via la perturbation de l'ADN des cellules cancéreuses. Pour atteindre cet objectif, pour des raisons d'équipement et de commodité, un inhibiteur de la topoisomérase II, qui conduit à la formation de cassures double brin de l'ADN est utilisé. Le point contrôle est ainsi activé. La présence d'un inhibiteur de checkpoint G2 permet aux cellules cancéreuses, si le produit est actif, d'entrer en mitose. On va alors bloquer les cellules en cours à ce stade par addition d'un agent inhibiteur du fuseau mitotique (interférant avec les microtubules responsable de la migration des chromosomes lors de la mitose). Afin d'évaluer l'efficacité de l'inhibiteur, on pourra calculer l'index mitotique correspondant au nombre de cellules en mitose (donc ayant franchit le checkpoint G2 grâce à l'inhibiteur) divisé par le nombre total de cellules.

$$\text{Index Mitotique (IM)} = \text{nombre de cellules en mitose} / \text{nombre total de cellules}$$

Cet index mitotique est un premier screening d'inhibiteurs potentiels, s'il est intéressant une deuxième expérimentation dose/réponse sera réalisée afin de déterminer les IC_{50} .

D'un point de vue technique, la détermination du nombre de cellules en mitose se fait par la méthode de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Les analyses par FACS utilisent la cytométrie de flux qui permet de faire défiler les cellules les unes après les autres dans un capillaire et de les exposer à une irradiation lumineuse (un laser) avant de mesurer la fluorescence qui est émise. Avant cette étude, les cellules sont mises en contact avec deux marqueurs fluorescents différents, l'un marque l'ADN (qui devient quantifiable et permet de déterminer dans quelle phase du cycle sont les cellules), l'autre une protéine propre à la mitose.

Le FACS nous donne donc, pour chaque cellule « lue », deux valeurs de fluorescence. L'une représente la quantité d'ADN, l'autre la présence d'un épitope lié à la mitose. A partir de ces données, on peut tracer deux types de graphes :

- i) Le premier correspond au profil de répartition des cellules dans les différentes phases du cycle. Celui-ci est représenté par le nombre de cellule en fonction de la fluorescence mesuré (voir figure 33, partie gauche).
- ii) Le second sert à calculer l'index mitotique (IM) ; Pour cela on rapporte en abscisse la fluorescence associée à la quantité d'ADN et en ordonnée la fluorescence des protéines de mitose. L'axe des ordonnées est positionné de façon à éliminer la fluorescence naturelle du milieu d'étude. Sur ce graphique on peut alors retrouver le nombre de cellule dans chaque phase du cycle. L'IM est donc le rapport du nombre dans la partie A (voir figure 33 partie droite) sur le nombre total de cellule.

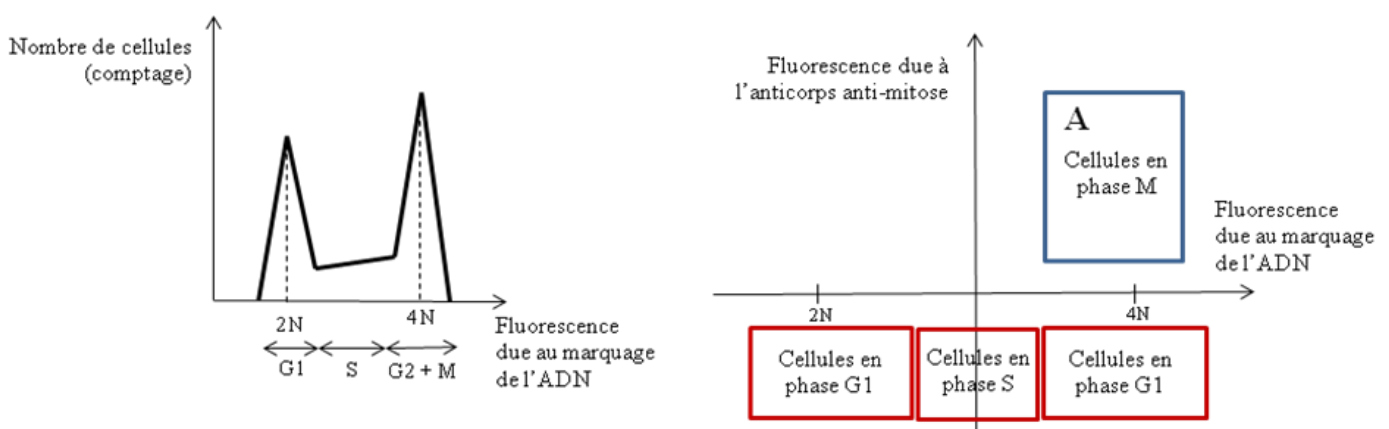


Figure 33 : Schématisation des résultats obtenus par FACS

II. Matériels et méthodes

(Voir partie expérimentale)

III. Résultats

A. Test d'inhibition de la croissance de la population cellulaire

Les IC₅₀ obtenus pour les composés sur différentes lignées cellulaires sont rassemblés dans les tableaux 9 et 10. La valeur indiquée correspond à la moyenne des 6 essais. Les composés de la série pyrrole ont été testés sur 3 lignées cellulaires.

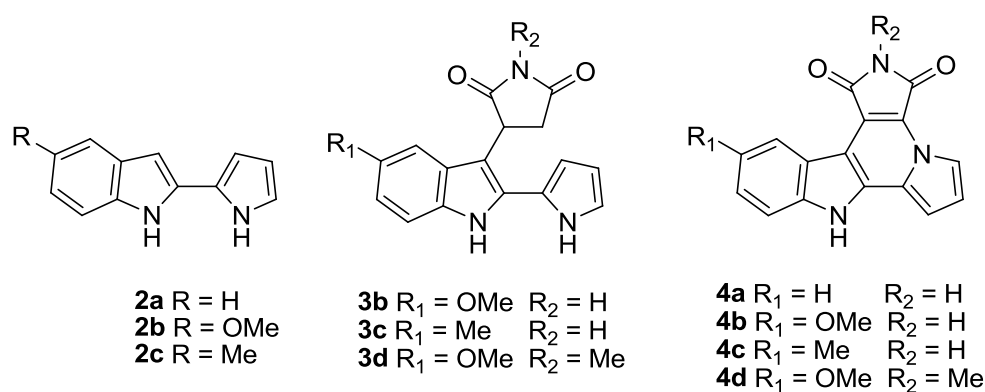


Figure 34 : Structure des composés évalués pour leur inhibition de la croissance de la population cellulaire dans la série pyrrole

Tableau 4 : Résultats des tests de prolifération cellulaire pour la série pyrrole

Composé	IC ₅₀ (μM) : valeurs conduisant à 50 % d'inhibition de la croissance cellulaire après 3 jours de culture en présence du composé		
	Lignée cellulaire humaine		
	A549	U373	MCF7
2a	61	89	56
2b	48	41	37
2c	55	43	NT
3b	20	5	29
3c	4	15	19
3d	7	10	7
4a	18	33	49
4b	14	22	42
4c	26	26	35
4d	36	28	36
Camptothecine	0,5	0,2	0,7
Etoposide	3,2.10 ⁻³	0,217	42,5.10 ⁻³

D'une façon générale, les valeurs de IC₅₀ sont centrées autour de 30 μM pour cette série.

On remarque que quelques produits sont plus actifs que la moyenne sur certaines lignées précises par exemple, **3c** et **3d** sur la lignée A549 avec des IC₅₀ de 4 et 7 μM respectivement, **3b** sur la lignée U373 avec une IC₅₀ de 5 μM ou encore **3d** sur la lignée MCF7. Il est à noter que pour le composé **4a** déjà synthétisé par l'équipe de Prudhomme, nous trouvons sur la lignée A549, un IC₅₀ de 18 μM au lieu de 2 μM.²⁹

Les composés de la série pyrazole ont eux été testés sur les 7 lignées. Les IC₅₀ des premiers intermédiaires **5** n'ont pas été mesurés avec précision car elles sont supérieures à 100 μM.

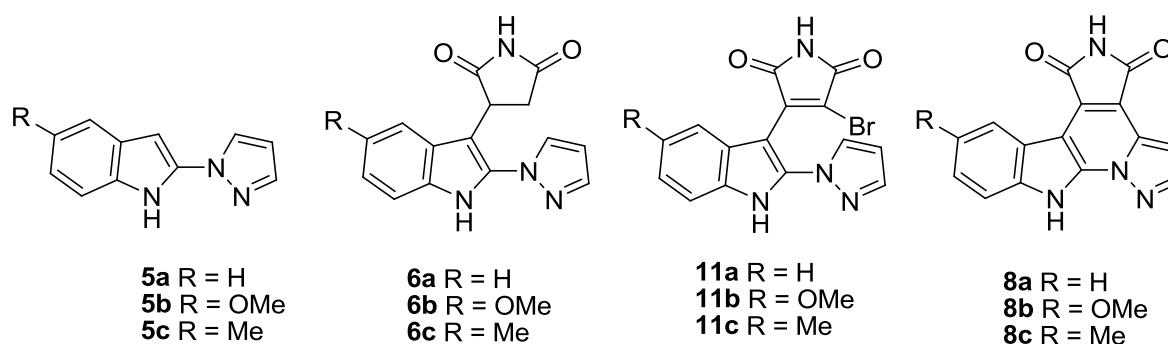


Figure 35 : Structure des composés évalués pour leur inhibition de la croissance de la population cellulaire dans la série pyrazole

Tableau 5 : Résultats des tests de prolifération cellulaire pour la série pyrazole

Composé	IC ₅₀ (µM) : valeurs conduisant à 50 % d'inhibition de la croissance cellulaire après 3 jours de culture en présence du composé						
	Lignée cellulaire humaine						
	A549	HS683	LoVo	OE21	PC3	U373	MCF7
5a	>100	-	-	-	-	>100	>100
5b	>100	-	-	-	-	>100	>100
5b	>100	-	-	-	-	>100	>100
6a	>100	>100	83 ± 2	64 ± 3	>100	>100	-
6b	>100	-	-	-	-	>100	>100
6c	>100	>100	83 ± 3	77 ± 2	>100	>100	-
11a	25 ± 3	29 ± 2	24 ± 1	27 ± 2	27 ± 1	27 ± 1	-
11b	29 ± 1	29 ± 1	27 ± 1	28 ± 1	26 ± 1	27 ± 1	-
11c	29 ± 1	30 ± 1	26 ± 1	30 ± 1	26 ± 2	27 ± 1	-
8a	8 ± 2	3 ± 1	0,4 ± 0,1	2 ± 1	22 ± 1	0,2 ± 0,1	-
8b	8 ± 5	64 ± 10	4 ± 1	5 ± 1	75 ± 1	57 ± 18	-
8c	8 ± 4	22 ± 9	34 ± 12	35 ± 8	>100	>100	-
Camptothecin	0,5	-	-	-	-	0,2	0,7
Etoposide	3,2 nM	-	-	-	-	217 nM	42,5 nM

Dans cette série, on peut noter que les dérivés intermédiaires **5** et **6** ne présentent pas d'activité. Par contre, les structures acycliques **11** comportant le cycle maléimide gagnent en activité, on observe des IC_{50} de l'ordre de 30 μ M, sans vraiment de discrimination d'une lignée à l'autre. Enfin, les analogues finaux **8** sont ceux qui présentent la meilleure activité sur la plupart des lignées cellulaires avec des IC_{50} inférieures à 10 μ M. Dans le cas de ces derniers produits, c'est le composé **8a** (R = H) qui semble le plus intéressant puisqu'il donne les meilleurs résultats sur toutes les lignées.

Pour avoir une première idée, du comportement du type de structures auxquelles on s'est intéressé sur la lignée U373, nous avons choisi d'analyser les composés **2b**, **3b** et **3c** par videomicroscopie. Les images réalisées du même champ cellulaire, prises à différents temps (Figure 36), montrent que les composés **3b** et **2b**, ont une action cytostatique sur la lignée U373 de glioblastome car les cellules prolifèrent moins et plus lentement que les cellules contrôles. A la fin des 3 jours d'expérience, aucune cellule n'est morte. Le produit **3c** est quant à lui, purement cytotoxique induisant une mort cellulaire dès les premières heures de traitement.

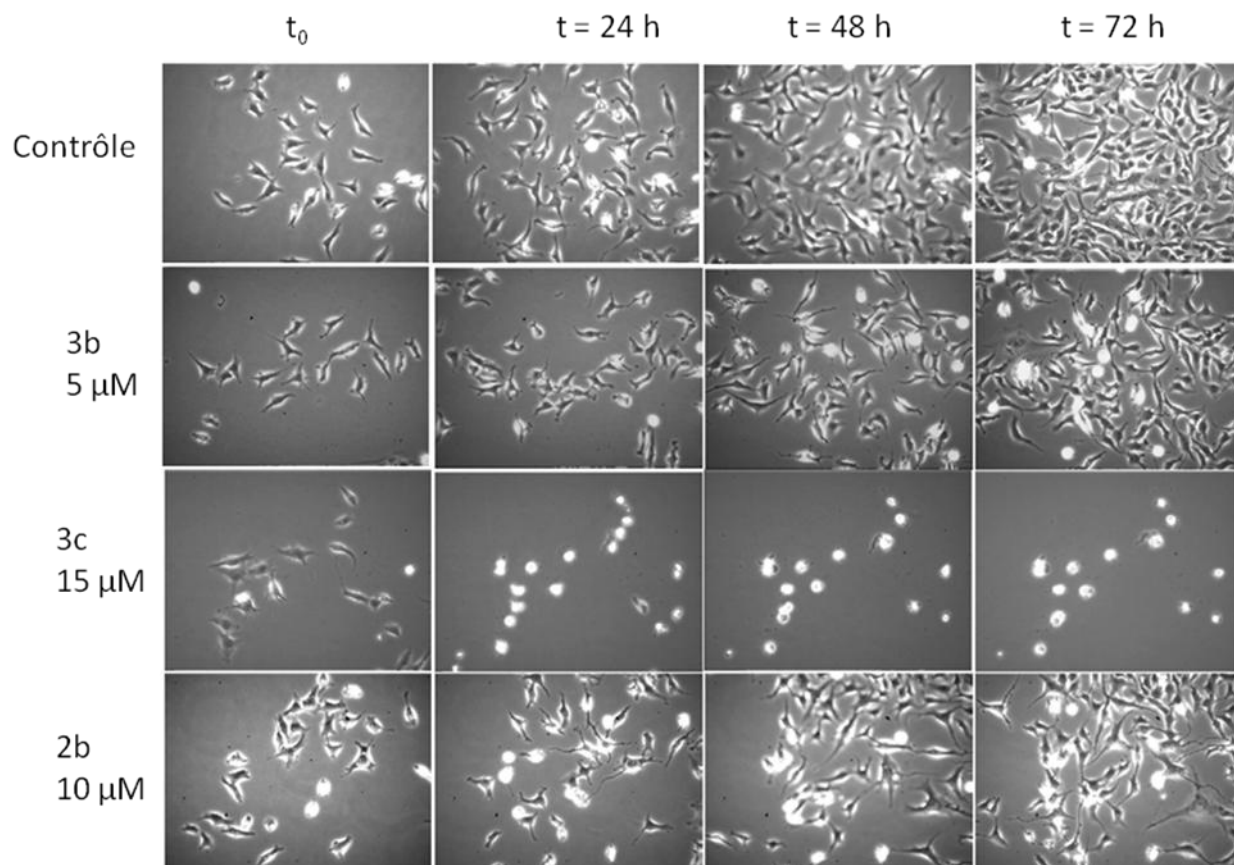


Figure 36 : Lignée cellulaire U373 traitée (ou non – contrôle) pendant 72 h avec les produits **3b**, **3c** et **2b** à la concentration qui correspond à leur valeur d' IC_{50} déterminée par le test *MTT*

B. Inhibition du Checkpoint G2

Certains résultats relatifs à l'inhibition du checkpoint G2 sont présentés en Figure 37 pour illustration, les conditions expérimentales et l'ensemble des résultats relatifs à la granulatinide, sont rassemblés dans les tableaux 11 et 12.

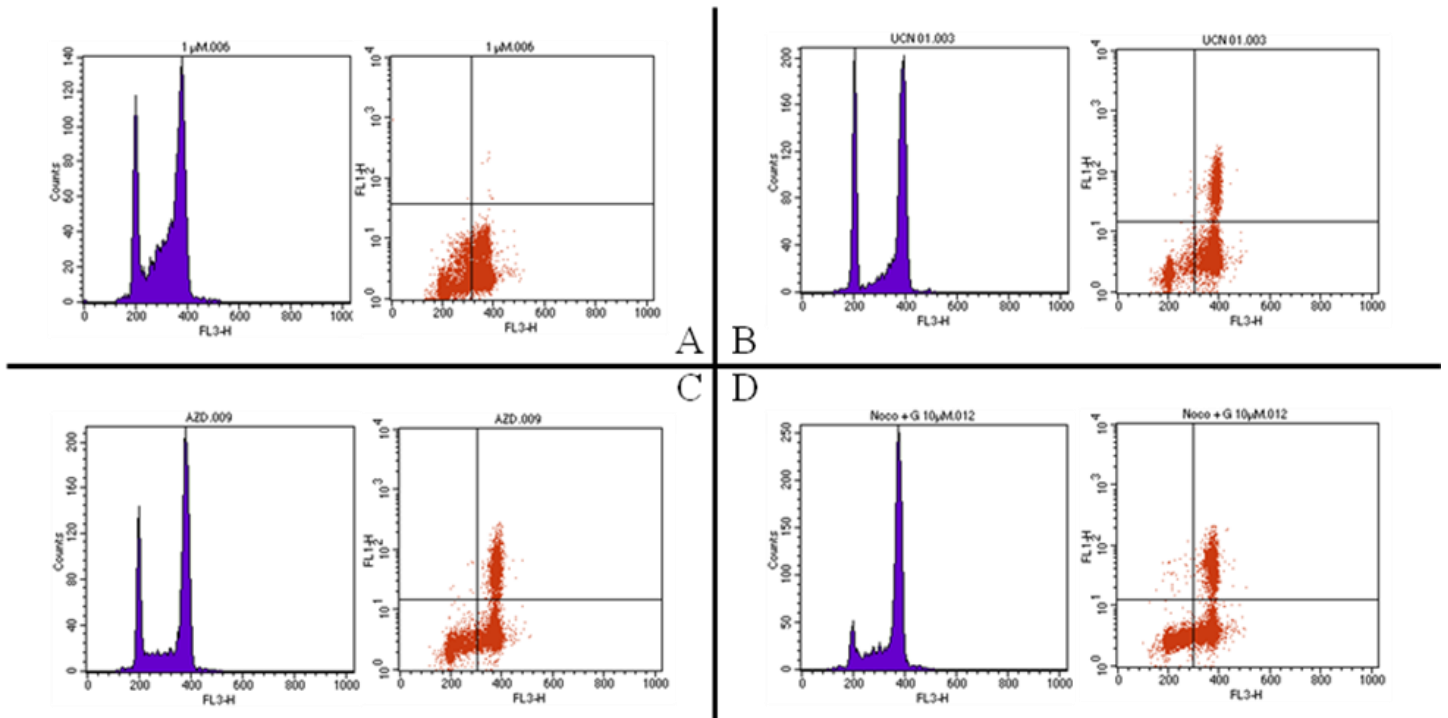


Figure 37 : représentation des résultats obtenus par FACS : en bleu : fluorescence associée à l'iodure de propidium (ADN), en rouge : diagramme des deux fluorescences : celle de l'ADN en abscisse, celle associée à la mitose en ordonnée. A, B, C et correspondent aux entrée 6, 9, 11 et 12 des tableaux 11 et 12 respectivement.

Tableau 6 : Conditions opératoires et résultats de l'analyse FACS pour la granulatimide

Entrée	Inhibiteur	Concentration	Etoposide	Index mitotique
1	Aucun	-	Oui	0,1
2	Aucun	-	Non	33,3
3	Granulatimide	1 nM	Oui	0,1
4	Granulatimide	10 nM	Oui	0,1
5	Granulatimide	100 nM	Oui	0,1
6	Granulatimide	1 μ M	Oui	0,09
7	Granulatimide	10 μ M	Oui	0,04
8	Granulatimide	100 μ M	Oui	0,04

Dans ce tableau, les entrées 1 et 2 correspondent aux contrôles où l'on peut voir que l'étoposide bloque le cycle cellulaire avant la mitose (IM = 0,1) alors que son absence permet aux cellules de poursuivre le cycle cellulaire jusqu'à la mitose (IM = 33,3). Les entrées 3 à 8 correspondent aux tests effectués à différentes concentrations en granulatimide afin d'évaluer son potentiel inhibiteur de checkpoint G2. Les résultats obtenus ne permettent pas de retrouver le caractère inhibiteur de checkpoint G2 décrit par Roberge pour la granulatimide même quand on travaille à de hautes doses.

Tableau 7 : Conditions opératoires et résultats de l'analyse FACS pour les autres inhibiteurs

Entrée	Inhibiteur	Concentration	Etoposide	Index mitotique
1	Aucun	-	Oui	0,1
2	Aucun	-	Non	33,3
9	UCN01	300 nM	Oui	16,9
10	UCN01 + Granulatimide	300 nM + 10 μ M	Oui	17
11	AZD	250 nM	Oui	26,4
12	Granulatimide	10 μ M	Non	29,6

Les entrées 9 et 11 correspondent aux tests avec l'UCN01 et l'AZD (composés récemment publié par AstraZeneca) connus pour être de bons inhibiteurs de checkpoint G2, le second composé semblant être nettement plus efficace que le premier. Ces deux entrées ont pour but de démontrer la validité du test utilisé. Il est à noter toutefois, que dans ce test l'UCN01 à une concentration de 300 nM correspondant à 40 fois la valeur reportée pour son IC₅₀ sur la Chk1 (7 nM) donne un index mitotique de seulement 17 alors que l'AZD ayant un IC₅₀ sur la Chk1 du même ordre de grandeur donne lui une inhibition quasi-totale.

L'entrée 10 vise à voir s'il y a une additivité de l'effet des deux inhibiteurs, ce qui ne semble pas être le cas avec la granulatimide.

L'entrée 12 permet d'évaluer le potentiel génotoxique de la granulatimide puisque l'étoposide y est absente. L'index mitotique calculé dans ce cas, est proche de celui de l'entrée 2 ce qui indique un faible effet. Ces deux entrées 10 et 12 permettent de réfuter l'hypothèse d'une autre activité bloquant l'entrée en mitose et donc masquant l'inhibition du checkpoint G2 par la granulatimide.

Les résultats relatifs à certains de nos produits sont reportés tableau 8. Dans une première approche, nous n'avons pas systématiquement testé tous les produits dont nous disposons

Tableau 8 : Conditions opératoires et résultats de l'analyse FACS pour les analogues testés

Entrée	Inhibiteur	Etoposide	Index mitotique
1	Aucun	Oui	0,1
2	Aucun	Non	33,3
3	3d	Oui	0,1
4	4a	Oui	0,1
5	4b	Oui	0,08
6	6b	Oui	0,3
7	8b	Oui	0,12
8	8c	Oui	0,05
9	11b	Oui	0,11
10	41a	Oui	0,14
11	44a	Oui	0,08

Pour tous les composés la concentration est de 10 µM

Ces résultats montrent qu'aucun de nos composés ne semble inhiber le checkpoint G2. On remarque aussi que comme pour la granulatinide, on n'observe pas non plus d'inhibition du checkpoint G2 par le composé **4b** alors que l'équipe de Prudhomme reporte un IC₅₀ de 24 nM pour ce composé.

IV. Discussion

D'une façon générale, les résultats de ces tests biologiques ne sont pas conformes à ce qu'on aurait pu attendre.

Notre postulat de départ était de mettre à jour des produits non cytotoxiques par eux-mêmes mais capables de potentialiser l'action d'un génotoxique. Les résultats des tests de prolifération cellulaire, obtenus aussi bien en série pyrrole qu'en série pyrazole, montrent pour certains de nos composés un caractère antiprolifératif de l'ordre du micromolaire qui ne peut pas être expliqué uniquement par l'inhibition de la Chk1. De plus, l'étude par vidéomicroscopie réalisée sur trois composés montre que l'effet observé n'est pas lié à la structure des composés, deux composés de structures proches (**3b** et **3c**) ayant des comportements totalement différents.

Pour les tests d'inhibition du checkpoint G2, le fait de ne pas avoir retrouvé les résultats de la littérature aussi bien pour la granulatinide, que pour le composé **4a** précédemment décrits, rend difficile le commentaire des résultats. Quelques explications peuvent tout de même être avancées pour expliquer certains de ces résultats. En ce qui concerne le composé **4a**, l'équipe de Prudhomme reporte son activité (IC₅₀ = 24 nM) sur la Chk1, ce qui devrait induire aussi une activité en tant qu'inhibiteur du checkpoint G2. L'absence de réponse dans les conditions utilisées par nos partenaires montrent qu'un produit actif *in vitro* peut ne pas donner de réponse *in cellulo* (passage des membranes, métabolisation du produit ou précipitation dans la cellule) selon les conditions dans lesquelles sont réalisées le test. Pour ce qui est de la granulatinide qui elle a été décrite pour inhiber à la fois le checkpoint G2 et la Chk1, il est plus difficile de justifier le résultat observé. Nous avons donc contacté Roberge qui nous a dit avoir effectivement enregistré des problèmes de reproductibilité dans l'évaluation de l'inhibition du checkpoint G2 avec ce produit naturel, l'isogranulatinide lui semblant plus adapté pour servir de référence dans les tests. Nous

sommes donc pour le moment entrain de vérifier cette donnée. Seul ce résultat pourra nous amener à nous prononcer sur la validité de notre test qu'on sera peut-être amener à optimiser.

V. Conclusion

L'évaluation biologique des composés synthétisés au cours de nos travaux a montré pour certains, une activité cytotoxique qui pourrait constituer un point de départ pour définir de nouveaux anticancéreux. Pour l'instant l'activité inhibitrice du checkpoint G2 montrée par ces composés est décevante (aucune activité n'a été observée) mais sujette à caution du fait du test utilisé qui n'a pas permis sur des composés connus de retrouver les résultats de la littérature.

Un gros travail reste donc encore à faire pour avoir vraiment une réponse fiable de l'inhibition du checkpoint G2, avant de passer à l'évaluation de l'inhibition de la Chk1 qui, elle, va demander de disposer de la protéine pure (nos collègues biologistes ont commencé à envisager sa production à partir d'un plasmide dont ils disposent) et de travailler avec des produits radioactifs. Quand ces tests seront finalisés, il restera encore à regarder la sélectivité des composés vis-à-vis de la Chk1 par rapport à d'autres kinases. Ce travail se fera dans le cadre d'une collaboration avec Laurent Meijer à la station biologique de Roscoff. En dernier lieu, nous essayerons de valider le concept d'association, inhibiteur du checkpoint G2 (Chk1)/génotoxique.

CHAPITRE IV

VERS UNE APPROCHE *IN* *SILICO* DE NOUVEAUX INHIBITEURS DERIVES DU PRODUIT NATUREL ISOGRANULATIMIDE

I. Contexte

A. Positionnement de l'étude in silico

Le choix des analogues de la granulatimide et de l'isogranulatimide auxquels nous nous sommes intéressés au cours des chapitres précédents comme inhibiteurs potentiels de la Chk1 a été guidé par les études de relations structure-activité publiées dans la littérature.⁴⁹ En parallèle de notre travail de synthèse, nous avons souhaité s'il était possible d'avoir une approche plus rationnelle du design des inhibiteurs de cette enzyme. Une telle approche a pu être envisagée grâce à divers outils *in silico* à disposition dans notre laboratoire.

B. Etude préliminaire de la Chk1 : rôle et analyse structurale

1. Rôle de la Chk1

La Chk1 est une des 518 kinases recensées dans le génome humain à l'heure actuelle, et plus particulièrement une kinase sérine/thréonine capable de phosphoryler les résidus sérine et thréonine de ses substrats.⁸⁴

Il est important de rappeler qu'au niveau du cycle cellulaire, la Chk1 est une des nombreuses kinases qui interviennent au cours de la cascade enzymatique mise en place par l'activation des kinases ATR et ATM en réponse à des dommages détectés sur l'ADN (Figure 48). En effet, ATM et ATR activent la Chk1 et la Chk2 qui, bien qu'elles partagent des substrats, ont des rôles bien distincts. Dans le cas de la Chk1, cette activation conduit à la phosphorylation des kinases de la famille Cdc25 (A et C) : la désactivation de Cdc25C, conduisant à la perte d'activité du complexe Cycline B/cdk2, a justement pour effet l'arrêt du cycle cellulaire lors de la transition G2/M (Figure 38).⁸⁵

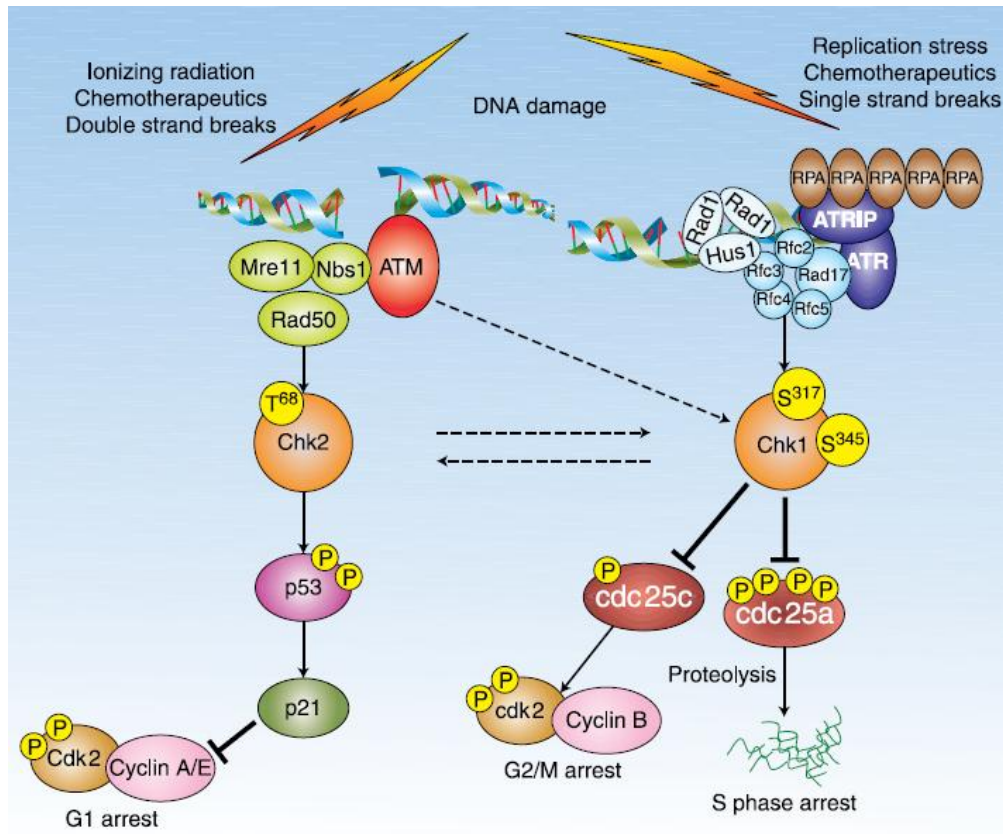


Figure 38 : Voies de signalisation pour l'arrêt du cycle cellulaire³

Lors d'un traitement anti-cancéreux, l'utilisation d'un génotoxique perturbe l'ADN, ce qui a pour effet de déclencher l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre sa réparation. L'inhibition de cette pause empêcherait le processus de réparation de l'ADN de se mettre en place, c'est pourquoi la Chk1 apparaît actuellement comme une kinase cible dont l'inhibition, inactiverait le checkpoint G2 potentialisant ainsi l'activité des génotoxiques.

2. Éléments d'analyse structurale

En 2000, la structure de la Chk1 a été résolue par diffraction des rayons X.⁸⁶ Constituée de 476 acides aminés, elle comporte une partie N-terminale (résidus 1 à 265) hautement conservée (commune à de nombreuses espèces), une partie C-terminale moins conservée et une région flexible faisant le lien entre ces deux parties.

Plusieurs structures ont été publiées dans la banque structurale PDB (Protein Data Bank) et ont permis d'avoir une idée précise de l'organisation de la protéine et des modes de liaison de différents inhibiteurs dans le site (Figure 39).

La Figure 39 suivante montre l'alignement structural de 34 chaînes protéiques issues de différentes structures disponibles ou non dans la PDB (apo-enzyme, complexes) :

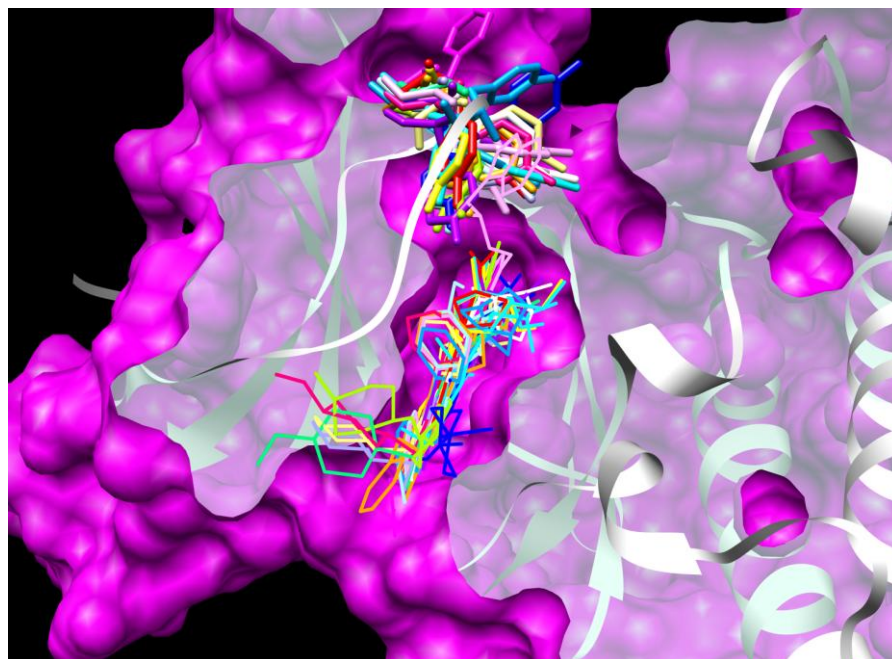


Figure 39 : Alignement structural issu des entrées PDB suivantes : 1IA8, 1NVQ, 1NVR, 1NVS, 1ZLT, 1ZYS, 2AYP, 2BRI, 2BRB, 2BRG, 2BRM, 2BRN, 2BRO, 2C3J, 2C3K, 2C3L, 2CGU, 2CGV, 2CGW, 2CGX, 2E9N, 2E9O, 2E9P, 2E9U, 2E9V, 2GDO, 2GHG, 2HOG, 2HXL, 2HXQ, 2HY0, 2HQM, 2HQN, 2YWP, 3F9N, complexe isoGra/Chk1 non publié. Pour des raisons de clarté, les ligands présents dans les complexes ne sont pas affichés.

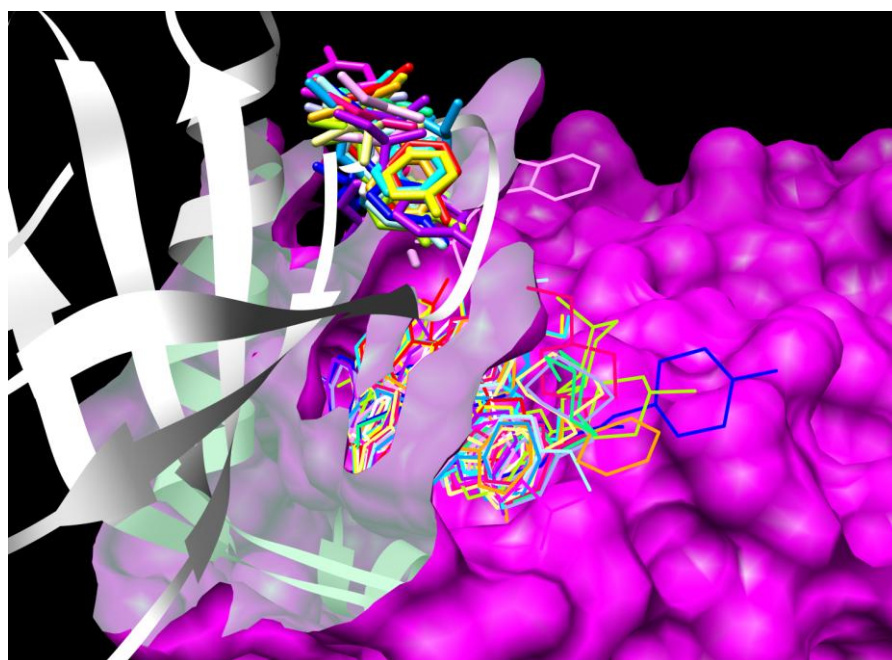
On constate une très forte conservation de la structure (backbone) de la protéine ainsi que des chaînes latérales des acides aminés, à l'exception d'une boucle éloignée du site actif et du résidu Tyr20 présent dans le site actif.

Les figures suivantes montrent différentes vues du site actif, la flexibilité du résidu Tyr20 étant matérialisée en haut du site (Figure 40 coupes A et B). L'essentiel des ligands

polycycliques considérés s'aligne de la même manière selon un plan (partie polycyclique) vu en tranche (A) ou de côté (B). Ce noyau rigide occupe la partie centrale du site, avec des extensions occupant l'espace conformationnel libre à l'entrée du site ou de part et d'autre, en profondeur.



A



B

Figure 40 : Différentes coupes montrant le site enzymatique (A entrée du site en bas, B entrée du site à droite). Seules les structures isoGra/Chk1 (non publiée, en blanc) et la surface moléculaire de l'apo-enzyme (IIA8, en rose) ont été représentées côté enzyme. Tous les ligands présents dans les complexes sont affichés.

Enfin, grâce à l'ensemble de ces données cristallographiques, le site actif a pu être découpé en quatre régions importantes (Figure 41):

- une région charnière hautement conservée composée des résidus importants tels que Cys87 et Glu85
- une région polaire constituée des acides aminés Tyr20, Lys38, Glu55 et Asp148
- une poche ribose comportant des acides aminés hydrophiles tels que Glu91, Glu134 et Asn135
- une région exposée au solvant.

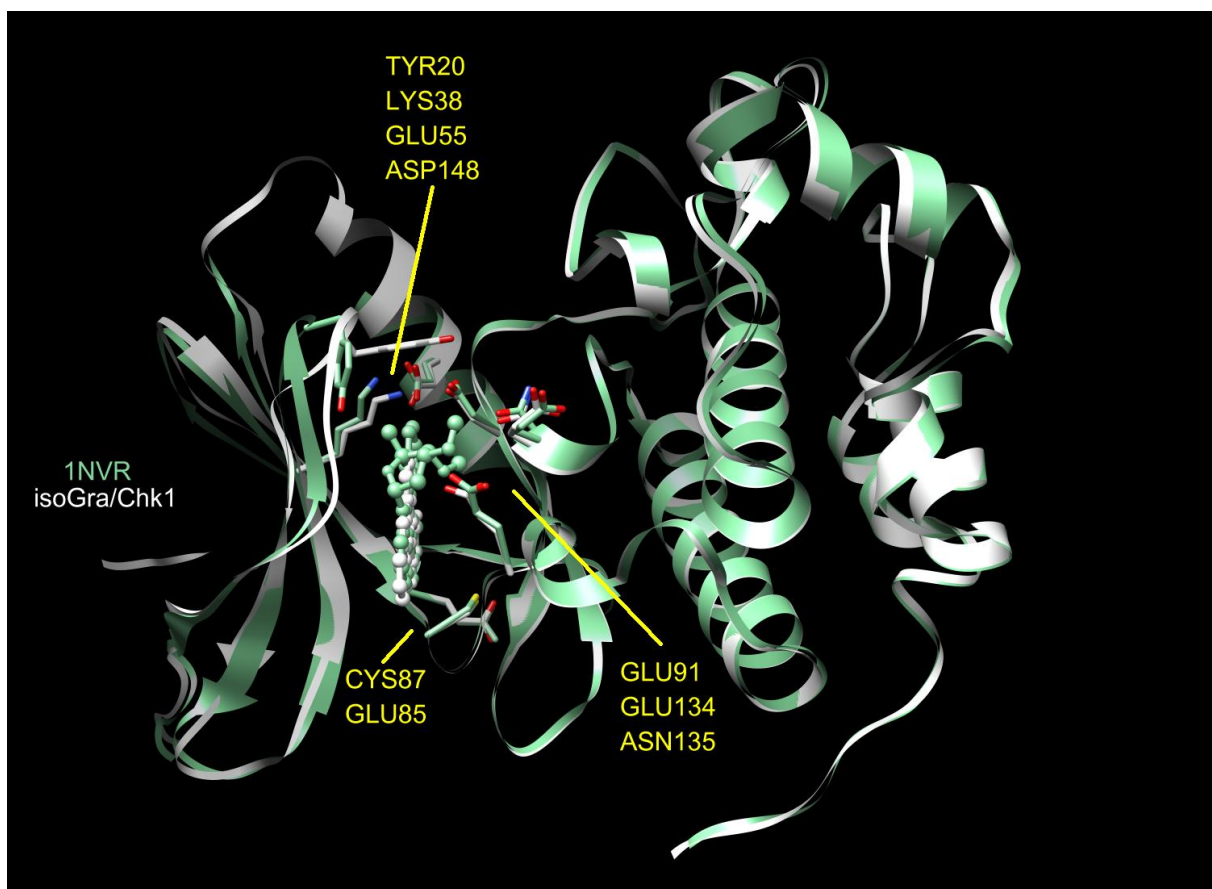


Figure 41 : Aligment de 2 structures de Chk1 : isoGra/Chk1 (cf. a3 Tableau 12) et 1NVR (cf. a4 Tableau 12). Les ligands présents dans le site sont l'isogranulatimide et un dérivé STU (staurosporine) de l'UCN (7-hydroxystaurosporine). L'entrée du site (région exposée au solvant) est vue de dessus.

Certaines de ces régions seront encore discutées dans la suite de ce chapitre qui va consister en deux parties:

- (i) la réalisation d'expériences d'arrimage (docking) moléculaire dans l'optique de prédire *in silico* l'affinité des analogues dérivés de l'isogranulatimide préparés au cours de cette thèse.
- (ii) l'analyse structurale d'un certain nombre de structures cristallographiques ligand/Chk1 dans l'optique d'envisager la conception rationnelle de nouveaux analogues d'isogranulatimide capables d'inhiber la Chk1.

En réalité ces deux approches ont été menées simultanément, mais elles seront présentées de cette manière pour clarifier les résultats et distinguer les éléments qui proviennent de notre étude d'arrimage moléculaire et ceux issus de la littérature et des structures de complexe existants.

II. Prédiction *in silico* de l'affinité des analogues préparés pour la Chk1

A. Introduction

Aucune donnée *in vitro* ou *ex vivo* concernant l'activité anti-Chk1 des analogues préparés au cours de ce travail de thèse n'étant disponible au moment où nous avons commencé cette étude, nous avons décidé d'estimer *in silico* l'affinité pour la kinase-cible Chk1 de ces analogues, ainsi que des intermédiaires de synthèse correspondants. Pour ce faire, l'ensemble des molécules synthétisées à été organisée en ligandothèques puis soumis à des calculs d'arrimage (docking) moléculaire. Nous espérons par ce travail disposer d'informations pouvant orienter les synthèses futures sur la base de résultat d'affinités moléculaires (scores) théoriques vis-à-vis d'une structure protéique cible.

B. Analyses de structures protéiques et identification de résidus clés

Avant d'engager les différents analogues dans les expériences d'arrimage moléculaire proprement dites, la première étape de notre étude a consisté à choisir des structures cristallographiques de Chk1 utilisables pour les calculs et représentatives de l'ensemble des structures disponibles (cf. section III).

Nous présentons ici un résumé de la diversité structurale de Chk1 basé sur quelques structures cristallographiques: (i) la structure 1IA8 correspondant à la structure cristallographique de l'apoenzyme Chk1,^{87,86} (ii) les structures 1NVR et 1NVQ correspondant à la structure cristallographique des complexes STU/Chk1 et UCN/Chk1,¹⁶ (iii) la structure cristallographique du complexe isogranulatimide/Chk1.⁴⁸

Tableau 9 : Structures cristallographiques représentatives. (i) la structure cristallographique de la Chk1 est issue de la banque PDB (entrée a1)^{88,86} (ii) les structures cristallographiques du complexe UCN/Chk1 et STU/Chk1 issues de la banque PDB (entrées a2, a4)^{88,16} (iii) la structure cristallographique du complexe isogranulatimide/Chk1 (les coordonnées de cette structure n'ayant pas été publiées dans la PDB, elles nous ont été transmises par l'équipe de Roberge (entrée a3)⁴⁸)

Entrée	Structure	Code PDB	Résolution	Référence
a1	Chk1	1IA8	1.70	7
a2	UCN/Chk1	1NVQ	2.05	8
a3	isoGra ^a /Chk1	- ^b	1.65	9
a4	STU/Chk1	1NVR	1.80	8

Le choix des ligands isogranulatimide et UCN/STU se justifie largement de par leur similitude structurale entre elles mais surtout avec les analogues préparés au cours de cette thèse. L'analyse de ces cas typiques (apo-enzyme, complexes) nous amène aux mêmes observations que celles avancées par Roberge *et al.* en 2004 (figure 42),⁴⁸ à savoir :

- le point commun entre l'UCN/STU et l'isogranulatimide est que ces deux types de ligands se lient dans la poche catalytique de la Chk1 via l'établissement de deux liaisons hydrogènes clés : une première avec l'atome d'oxygène du groupe carbonyle du résidu Glu85 (E85 sur la figure 42A) et une seconde avec l'atome d'azote de la fonction amide du résidu Cys87 (C87 sur la figure 42A).

- la différence entre l'UCN/STU et l'isogranulatimide réside dans l'existence d'interactions spécifiques avec certains résidus de la poche catalytique de la Chk1. Alors que le fragment sucré de l'UCN conduit à la formation de liaisons hydrogène avec les résidus Ser147, Glu91 (E91 sur la figure 42B) et Glu134, l'isogranulatimide présente une liaison hydrogène clé avec l'atome d'oxygène du groupe carbonyle du résidu Glu17 (E17 sur la figure 42A).

Cette différence est importante car elle entraîne une distinction topologique fondamentale entre le complexe isogranulatimide/Chk1 et les structures de l'apoenzyme Chk1 et du complexe UCN/Chk1. En effet, alors que la Chk1 et le complexe UCN/Chk1 ont des structures protéiques quasi identiques, l'existence de cette liaison hydrogène entre

l'isogranulatimide et le résidu Glu17 conduit à un changement conformationnel au niveau de la boucle riche en glycine de la protéine (figure 42C). Ce changement conformationnel est d'ailleurs avancé comme responsable de la forte sélectivité de l'isogranulatimide envers la Chk1.⁴⁸

Dans l'optique de réaliser des expériences d'arrimage moléculaire sur la protéine Chk1, cette information topologique a été déterminante car elle a rendu compte de l'existence d'un élément de flexibilité au voisinage du site catalytique, à savoir la boucle riche en glycine et plus particulièrement le résidu clé Glu17.

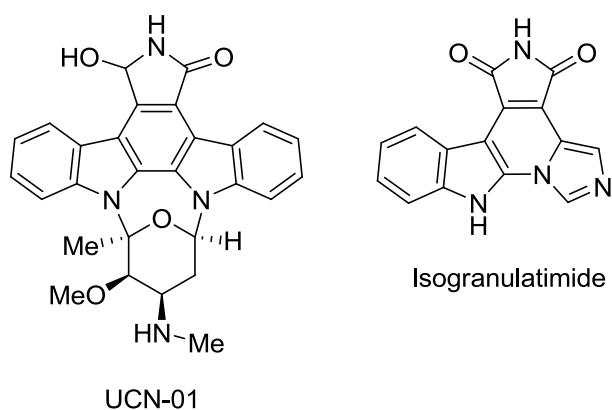
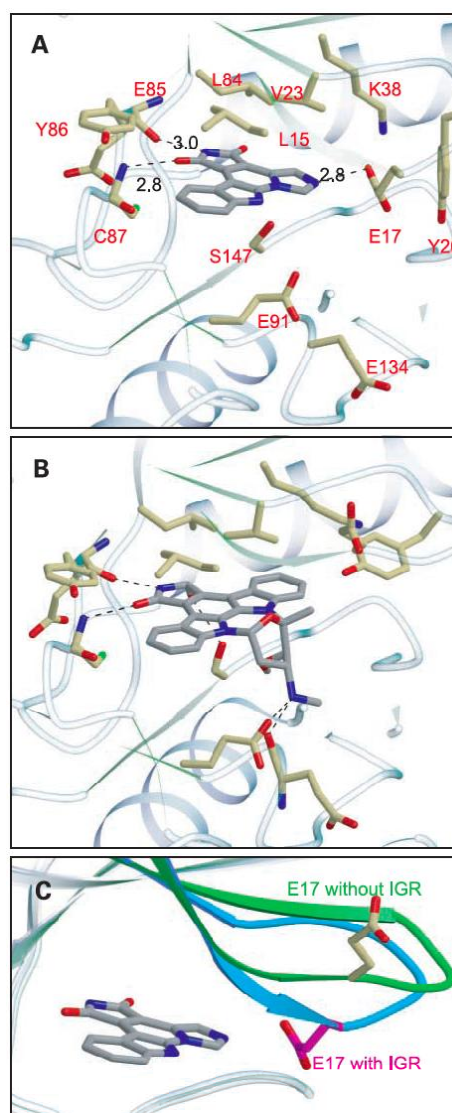


Figure 42 : Structures cristallographiques:
(A) du complexe Isogranulatimide/Chk1;
(B) du complexe UCN/Chk1 et (C) zoom
sur la superposition des structures.



C. Calculs d'arrimage moléculaire

Nous avons choisi d'engager dans les expériences d'arrimage, à la fois la structure de l'apoenzyme Chk1 (structure 1IA8) et la structure protéique du complexe isogranulatimide/Chk1. Dans ce dernier cas, la structure 1NVR est préférée à 1NVQ car sa résolution est meilleure. Par ailleurs, comme la sélection des acides aminés définissant le site de liaison du ligand est un paramètre important pour le bon déroulement des calculs, nous avons défini plusieurs critères à respecter, à savoir un site de liaison relativement large autour des résidus clés que sont Glu85 et Cys87 et un volume qui puisse contenir l'environnement de l'essentiel des ligands existants dans la PDB.

La figure suivante présente une situation simplifiée du site en distinguant la zone exposée au solvant (dessus, bas) et les résidus Glu85 et Cys87 dans le flanc droit du site (Figure 43).

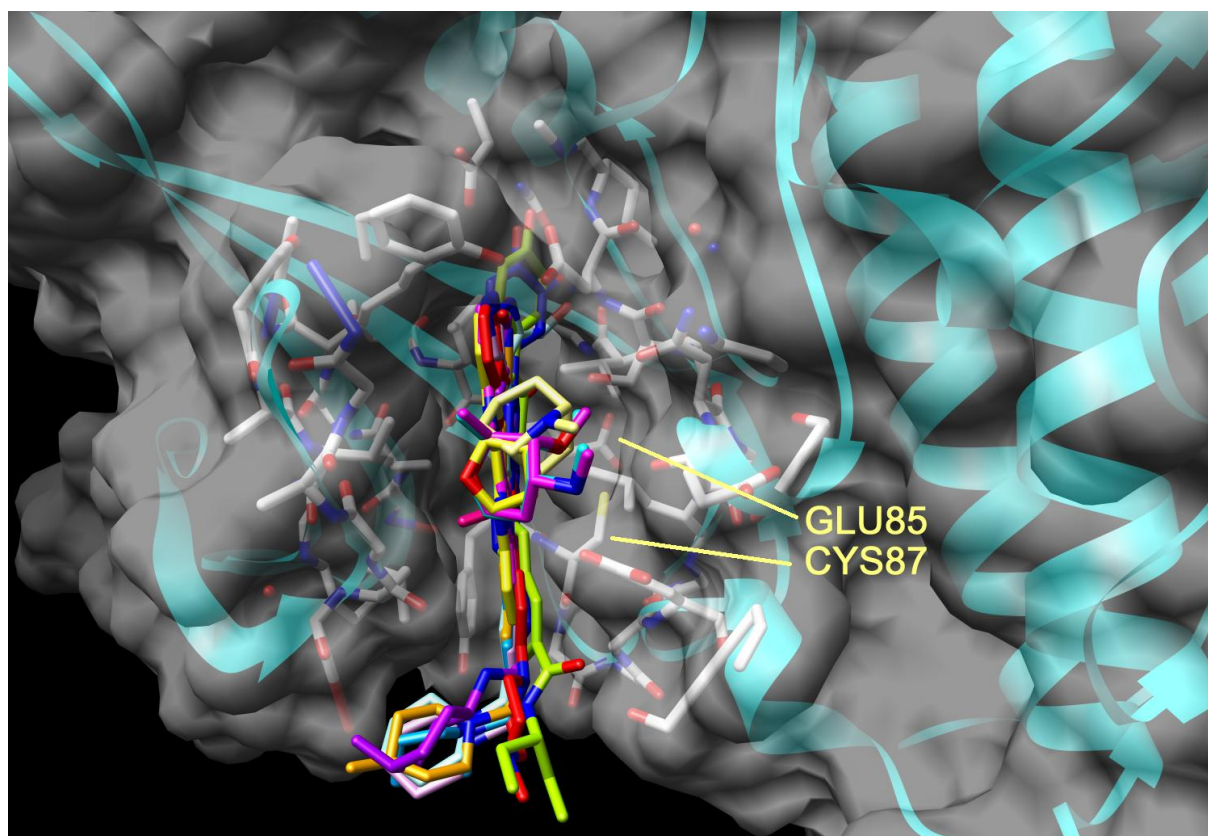


Figure 43 : Environnement immédiat (à 8 Å) autour des différents ligands alignés dans le site actif, les valeurs utilisées pour le calcul correspondent à des sphères de l'ordre de 15 à 20 Å.

a) Résultats

Dans ces conditions, les analogues de la granulatifimide (**4a-d** et **8a-d** Figure 44) ainsi que les intermédiaires de synthèse correspondant (**3a-d** et **6a-c** Figure 44) ont été engagés dans diverses expériences d'arrimage moléculaire.

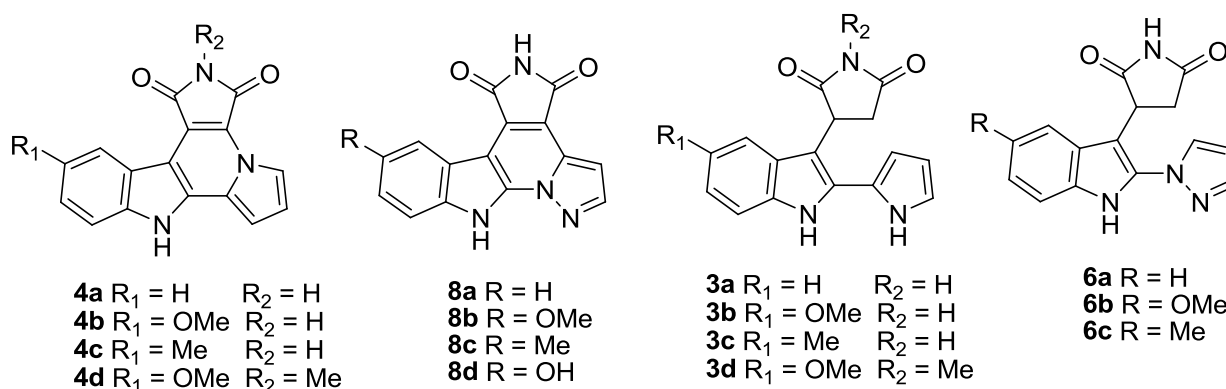


Figure 44 : Analogues de la granulatifimide et intermédiaires de synthèses engagés dans les expériences d'arrimage moléculaire

Les résultats ressortant de ces calculs sont résumés dans les deux items suivants:

- (i) quelle que soit la structure protéique choisie, la pose la plus favorable a toujours correspondu à celle où le ligand se superpose à l'isogranulatimide dans le complexe réel isogranulatimide/Chk1. Comme la rigidité des structures cycliques est semblable à celle du produit naturel, on comprend aisément que la superposition soit énergétiquement favorable. La libre rotation autour de la liaison entre les noyaux indole et succinimide des formes acycliques (Figure 44 : composés **3a-d** et **6a-c**) pourrait donner des résultats différents mais là aussi on observe étonnamment une superposition des squelettes.
- (ii) quels que soient les paramètres de calculs imposés, à savoir la définition d'un site de liaison plus ou moins large et/ou la définition de certaines zones protéiques comme zones flexibles, la pose énergétiquement la plus favorable a aussi toujours correspondu à celle où le ligand se superpose à l'isogranulatimide dans le complexe réel isogranulatimide/Chk1.

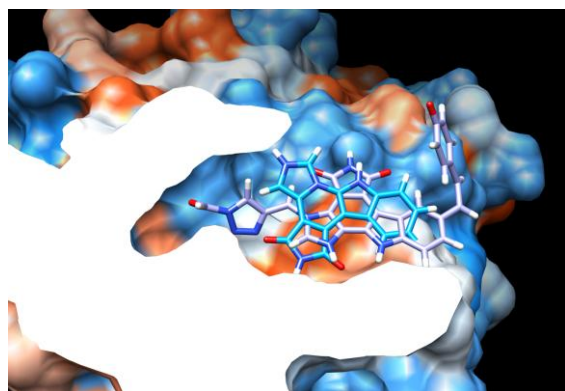
Si on s'intéresse à des ligands virtuels (structures données en annexes), qui n'ont pas été synthétisés, les résultats sont plus variables mais suivent la même logique : les ligands proches de l'isogranulatimide en encombrement stérique (Taille) et en formule développée ont des modes de liaison similaires.

Le tableau suivant résume quelques résultats, sur quelques molécules dont la meilleure pose (Moldock Score GRID ou RerankScore) est supérieure ou inférieure à l'isogranulatimide (IGI) et (ou) la conformation du ligand dans le site actif est similaire à l'IGI (Tableau 10).

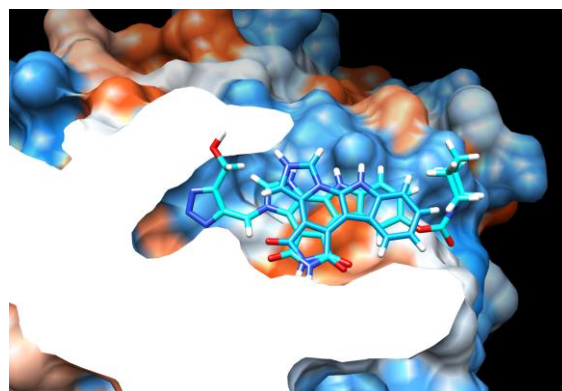
Tableau 10 : Quelques résultats d'arrimage moléculaire avec des molécules virtuelles.

Les colonnes Energy (Moldock Score GRID) et RerankScore correspondent à des fonctions de score de Molegro. La colonne Cyclique indique si le ligand est en série acyclique ou non, la colonne Taille donne une idée de l'encombrement dans le site par rapport à l'isogranulatimide (ligand dont le nom est IGI_400 et indiqué en gras pour des raisons de clarté).

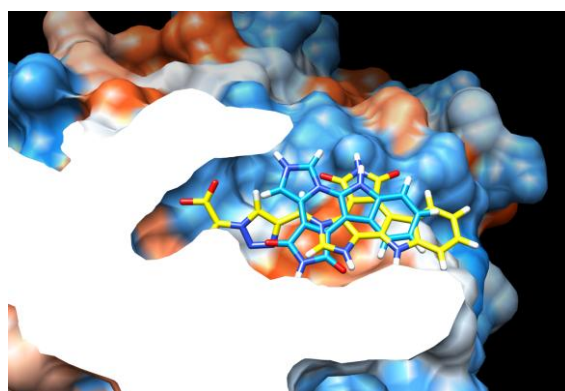
Energy	Ligand	MW	RerankScore	Cyclique	Taille
-152.781	D63_763	404.399	-36.7715	acyclique	
-101.005	D41_741	212.204	-82.2688		inf
-102.685	D39_739	198.201	-85.1131		inf
-162.027	D62_762	388.442	-87.9916	acyclique	
-118.714	D46_746	344.367	-97.801	acyclique	
-127.984	IGI_400	277.258	-101.647		
-138.739	D34_734	305.244	-109.692		equiv
-131.779	D38_738	336.298	-111.6		equiv
-142.261	D33_733	305.244	-111.648		equiv
-143.351	D36_736	342.308	-112.261		sup
-133.692	D42_742	331.259	-112.316		equiv
-135.022	D43_743	331.259	-113.067		equiv
-145.002	D35_735	342.308	-113.141		sup
<i>-146.528</i>	<i>D31_731</i>	<i>320.236</i>	<i>-116.024</i>		<i>equiv</i>
-189.058	D60_760	512.477	-119.68	acyclique	
-176.129	D59_759	385.336	-138.654	acyclique	
<i>-206.142</i>	<i>D44_744</i>	<i>483.495</i>	<i>-142.047</i>		<i>sup</i>
<i>-197.28</i>	<i>D65_765</i>	<i>513.485</i>	<i>-144.439</i>	<i>acyclique</i>	
<i>-180.894</i>	<i>D66_766</i>	<i>413.346</i>	<i>-146.14</i>	<i>acyclique</i>	
<i>-198.411</i>	<i>D78_778</i>	<i>502.46</i>	<i>-149.696</i>	<i>acyclique</i>	



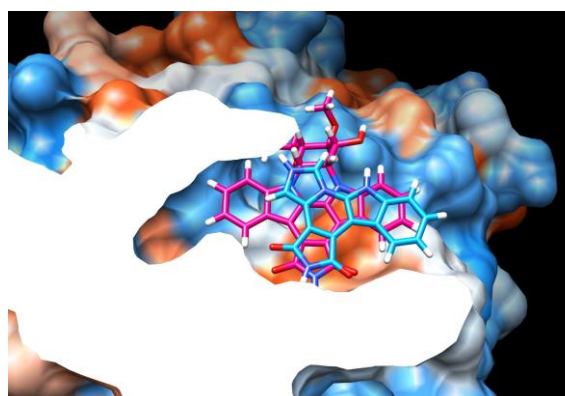
D78_778



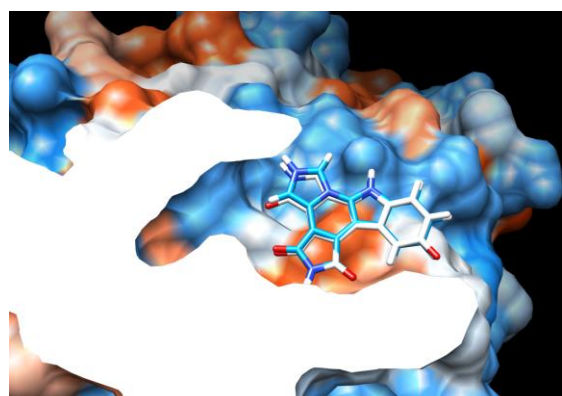
D65_765



D66_766



D44_744



D31_731

Figure 45 : Position dans le site actif de différents dérivés (meilleures poses en série acyclique et cyclique pour des scores de type MoldockScore GRID et RerankScore). L'isogranulatimide (arrimage moléculaire, similaire à la cristallographie) est affichée en bleu clair dans chaque image.

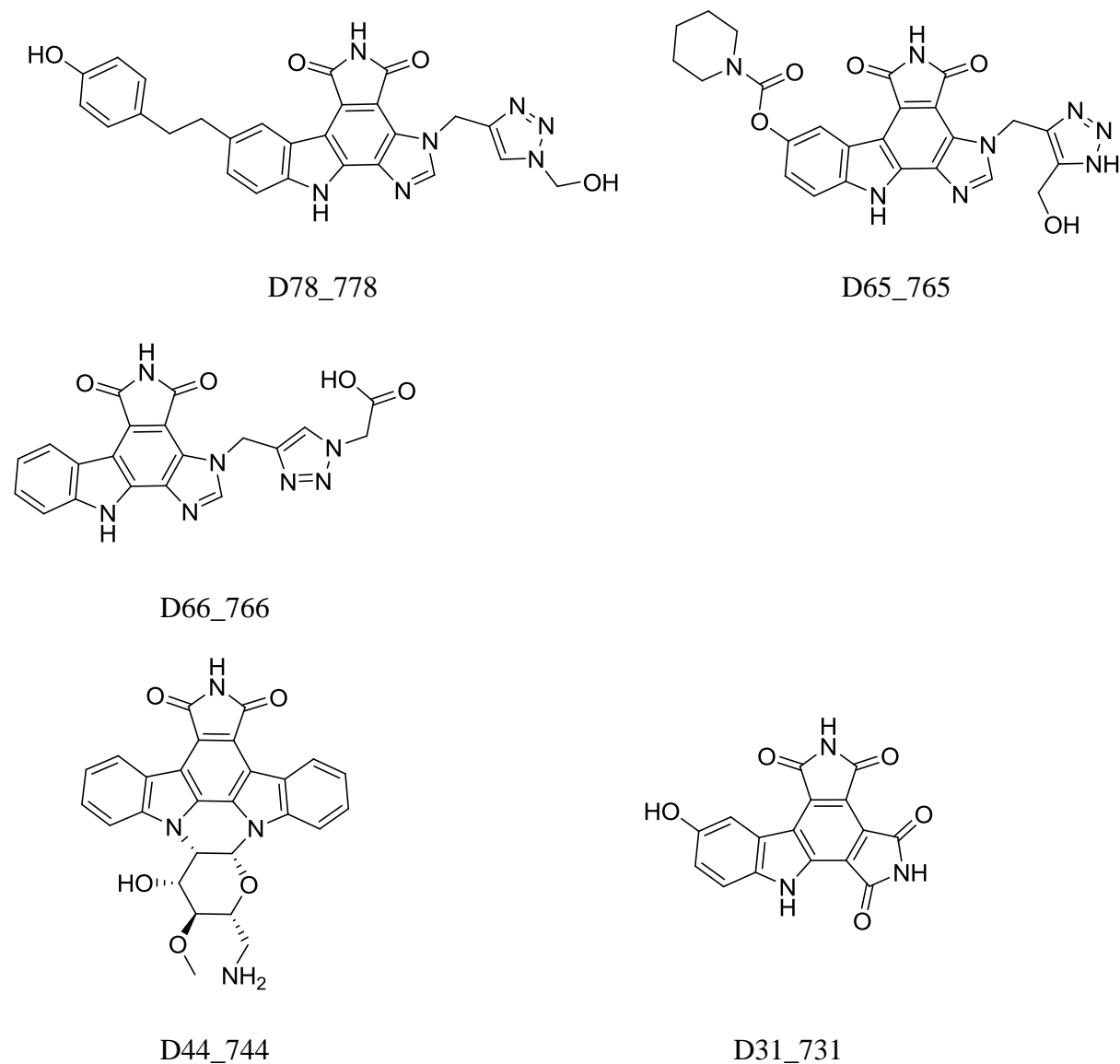


Figure 46 : Structure des ligands virtuels représentés Figure 45

Les résultats obtenus avec les ligands virtuels montrent qu'il est possible d'occuper l'ensemble du site (en profondeur et en surface au delà du site), à partir de substitutions basées sur un noyau isogranulatimide ou équivalent, avec des valeurs de scores améliorées par rapport au ligand IGI. Par contre, la conformation du site (fente) et la nature plane et compacte de certains ligands ne favorise probablement pas des interprétations fines des résultats de calculs : il n'est pas évident que les fonctions de score dont nous disposons soient

suffisamment discriminantes, en particulier en série cyclique dans le cas des molécules avec une enveloppe similaire à l'isogranulatimide.

Les résultats obtenus avec l'ensemble des ligands synthétisés restent très proches et comme un grand nombre de molécules a été soumis aux calculs, une analyse plus approfondie de ces résultats n'a pour l'instant pas été réalisée. Une telle analyse, comprenant notamment un bilan des interactions atomiques en jeu (liaisons hydrogène, hydrophobe & électrostatique) ainsi qu'une étude du comportement de la structure protéique (modification conformationnelle), n'aura de sens que lorsque des tests d'inhibition *in vitro* de la Chk1 par nos ligands auront été effectivement effectués.

b) Conclusion

En conclusion à cette étude *in silico*, nos ligands apparaissent comme des candidats prometteurs pour l'inhibition de la Chk1 en référence au ligand isogranulatimide. Toutefois, ce n'est, qu'une fois les activités anti-Chk1 évaluées *in vitro*, que nous pourrions exploiter de manière plus approfondie les résultats théoriques accumulés au cours de cette étude.

Il sera alors intéressant de déterminer s'il y a une corrélation entre une méthode d'évaluation de score donnée et les résultats biologiques *in vitro*, l'objectif étant de disposer d'au moins une fonction de score suffisamment sensible et discriminante par rapport à nos séries de ligands.

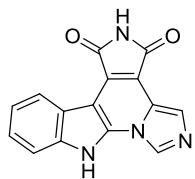
A partir de là, une nouvelle phase de conception *in silico* pourra démarrer sur des bases rationnelles nettement augmentées par rapport à cette étude préliminaire.

III. Vers un design rationnel de nouveaux inhibiteurs de la Chk1 dérivés de l'isogranulatimide

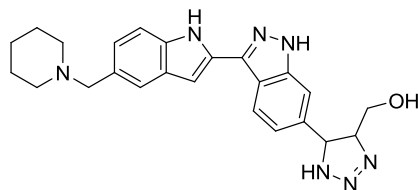
A. Introduction

Depuis 2006, la découverte et le développement de nouveaux inhibiteurs de la Chk1 suscitent un engouement important dans la communauté scientifique.⁸⁹ En effet, une large variété de ligands de la Chk1 a été décrite dans la littérature, la majorité d'entre eux ayant été développée par des compagnies pharmaceutiques comme Merck, AstraZeneca, Pfizer ou encore Abbott (pour illustrations, LIG1-15 Figure 52). D'un point de vue structural, il apparaît clairement que ces ligands présentent une large diversité tout en se distinguant du squelette isogranulatimide et donc des dérivés élaborés au cours de cette thèse. Il est important de noter que la plupart de ces ligands possèdent *in vitro* une activité anti-Chk1 de l'ordre de quelques dizaines de nM voire du nM (LIG-1, 4 et 7), certains d'entre eux étant d'ailleurs actuellement en phase clinique.

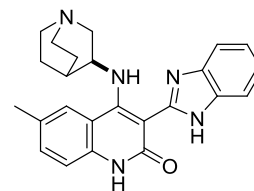
Au vu de cette densité importante d'inhibiteurs connus de la Chk1 et comme un grand nombre d'entre eux a été cocrystallisé avec la Chk1, il nous a semblé judicieux d'analyser les structures cristallographiques de ces complexes et de les comparer au complexe isogranulatimide/Chk1 dont nous disposons. Cette étude a eu pour objectif de repérer les éléments structuraux favorables à une inhibition efficace et sélective de la Chk1, ceci afin de définir de manière rationnelle de nouveaux ligands de la Chk1 à base granulatimide.



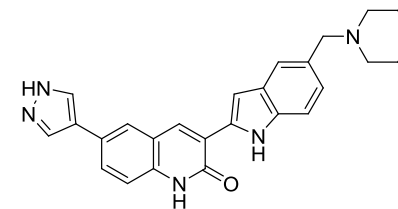
Isogranulatimide
 $IC_{50} = 0,44 \mu M$



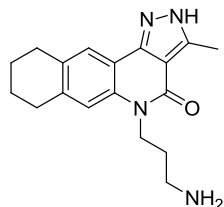
LIG 1 - Merck Research Laboratories
 $IC_{50} = 0,30 nM$
Bioorg. Med. Chem. Lett., **2006**, 16, 6049
Fichier PDB : 2HOG



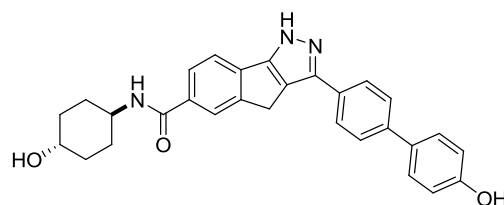
LIG 2 - Chiron Corporation
 $IC_{50} = 0,35 nM$
Bioorg. Med. Chem. Lett., **2006**, 16, 3121
Fichier PDB : 2GDO



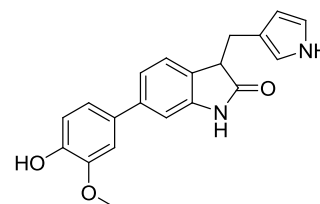
LIG 3 - Merck Research Laboratories
 $IC_{50} = 0,65 nM$
Bioorg. Med. Chem. Lett., **2006**, 16, 5907
Fichier PDB : 2HYO



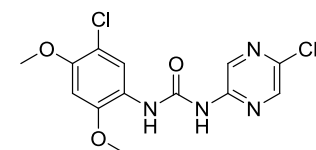
LIG 4 - Merck Research Laboratories
 $IC_{50} = 1,10 nM$
Bioorg. Med. Chem. Lett., **2007**, 17, 5989
Fichier PDB : 2QHN



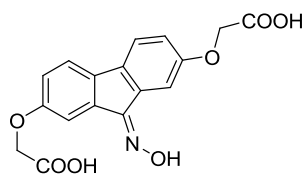
LIG 5 - Abbott Laboratories
 $IC_{50} = 3,90 nM$
Bioorg. Med. Chem., **2007**, 15, 2759
Fichier PDB : 2E9N



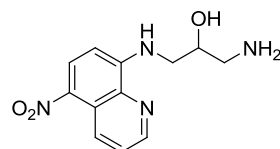
LIG 6 - Abbott Laboratories
 $IC_{50} = 7 nM$
Bioorg. Med. Chem. Lett., **2006**, 16, 421
Fichier PDB : 2AYP



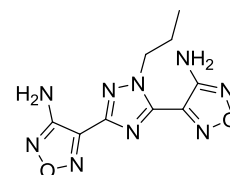
LIG 7 - Abbott Laboratories
 $IC_{50} = 7 nM$
Bioorg. Med. Chem. Lett., **2006**, 16, 2293
Fichier PDB : 2YWP



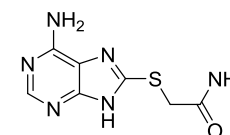
LIG 8 - Vernalis Laboratories
 $IC_{50} = 13 \mu M$
Bioorg. Med. Chem., **2006**, 14, 4792
Fichier PDB : 2CGU



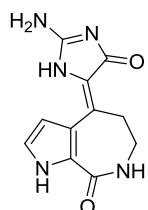
LIG 9 - Vernalis Laboratories
 $IC_{50} = 27 \mu M$
Bioorg. Med. Chem., **2006**, 14, 4792
Fichier PDB : 2CGV



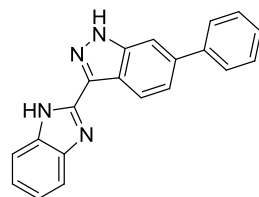
LIG 10 - Vernalis Laboratories
 $IC_{50} = 17 \mu M$
Bioorg. Med. Chem., **2006**, 14, 4792
Fichier PDB : 2CGW



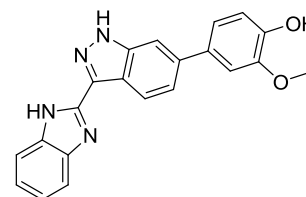
LIG 11 - Vernalis Laboratories
 $IC_{50} = 16 \mu M$
Bioorg. Med. Chem., **2006**, 14, 4792
Fichier PDB : 2CGX



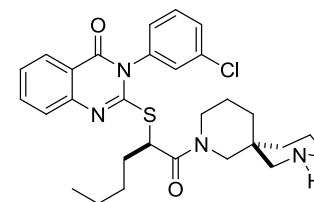
LIG 12 - Abbott Laboratories
 $IC_{50} = 0,7 \mu M$
Bioorg. Med. Chem., **2009**, 19, 841
Fichier PDB : 2C3J



LIG 13 - Abbott Laboratories
 $IC_{50} = 8,6 \mu M$
Bioorg. Med. Chem., **2006**, 14, 1792
Fichier PDB : 2C3L



LIG 14 - Abbott Laboratories
 $IC_{50} = 26 nM$
Bioorg. Med. Chem., **2006**, 14, 1792
Fichier PDB : 2C3K



LIG 15 - Abbott Laboratories
 $IC_{50} = 1,3 \mu M$
Bioorg. Med. Chem. Lett., **2009**, 19, 1240
Fichier PDB : 3F9N

B. Résultats & discussion

Un sous-ensemble des structures protéiques LIG/Chk1 a été aligné sur la structure protéique du complexe isogranulatimide/Chk1 (Tableau 11).

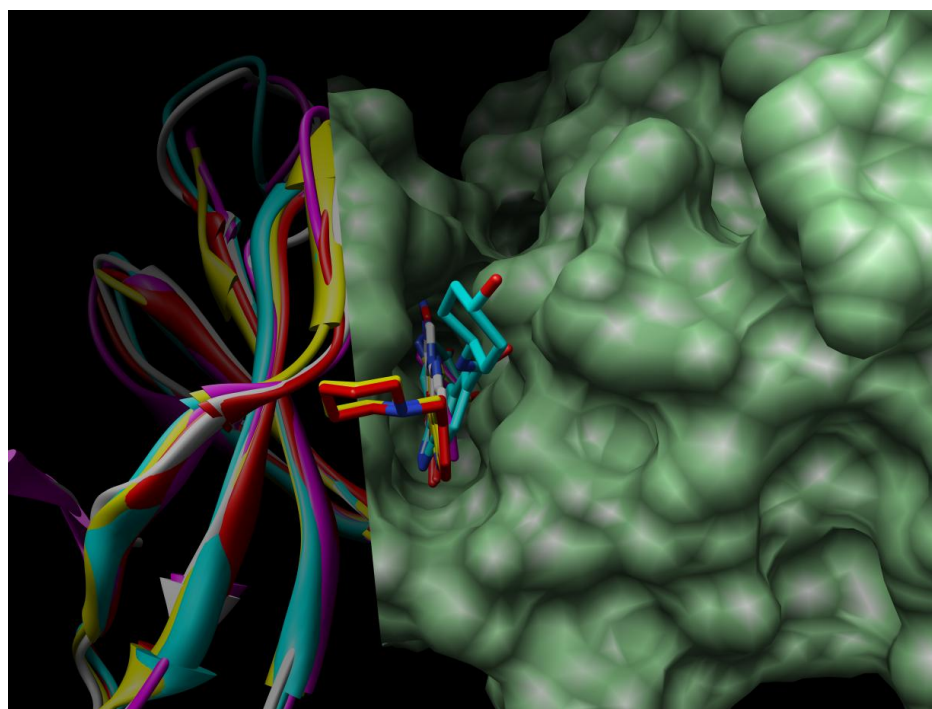
Tableau 11 : Structures cristallographiques des complexes ligand/Chk1 utilisés pour l'étude.

Entrée	Structure	Code PDB	Résolution	Référence
a1	isoGra ^a /Chk1	- ^b	1.65	9
a2	LIG1/Chk1	2HOG	1.90	32
a3	LIG2/Chk1	2GDO	3.00	33
a4	LIG3/Chk1	2HYO	1.70	34
a5	LIG4/Chk1	2QHN	1.70	35
a6	LIG5/Chk1	2E9N	2.50	36
a7	LIG6/Chk1	2AYP	2.90	37
a8	LIG7/Chk1	2YWP	2.90	38
a9	LIG8/Chk1	2CGU	2.50	39
a10	LIG9/Chk1	2CGV	2.60	39
a11	LIG10/Chk1	2CGW	2.20	39
a12	LIG11/Chk1	2CGX	2.20	39
a13	LIG12/Chk1	2C3J	2.10	40
a14	LIG13/Chk1	2C3L	2.35	40
a15	LIG14/Chk1	2C3K	2.60	40
a16	LIG15/Chk1	3F9N	1.90	41

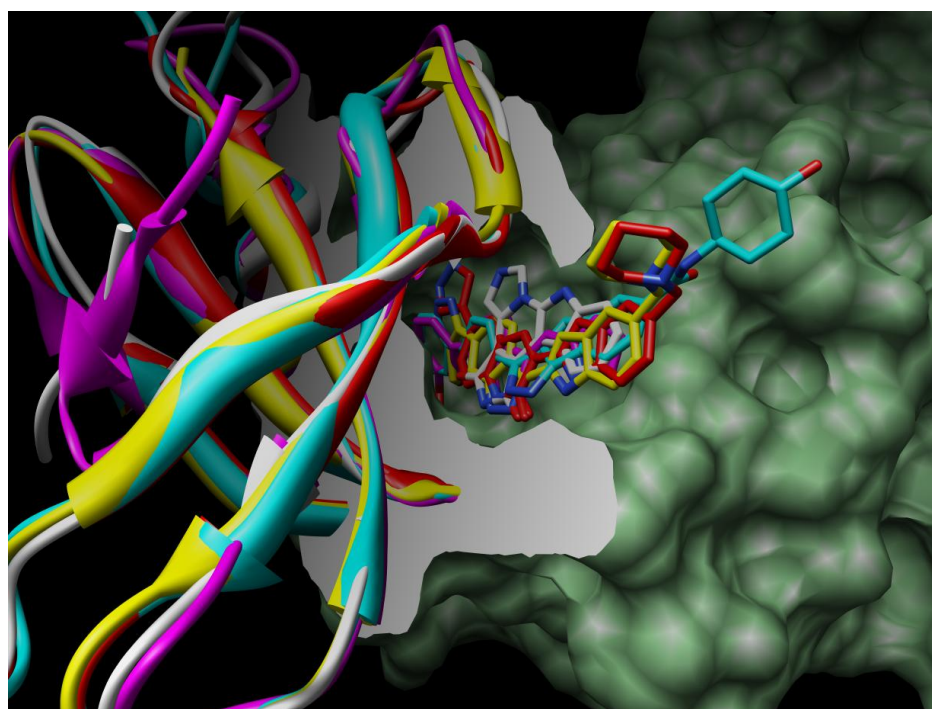
^aisoGra = isogranulatimide, ^bCoordonnées cristallographiques transmises au format .doc par l'équipe de Roberge en référence aux données publiées en 2004.⁴⁸

Toutefois, pour des raisons évidentes de clarté, seuls quatre ligands (à savoir LIG1, LIG3, LIG5 et LIG6), sont représentés en Figure 47, le choix de ces ligands reposant à la fois sur leur diversité structurale et sur leur activité anti-Chk1 élevée.

Une fois les structures LIG/Chk1 superposées à la structure cristallographique isogranulatimide/Chk1, nous avons cherché à repérer les points communs et les différences importantes concernant les interactions ligand/Chk1 en place dans ces divers complexes



A



B

Figure 47 : Vues de l'accès (A) et de la poche du site actif (B) pour les structures PDB 2AYP, 2E9N, 2HOG, 2HY0 alignées sur isoGra/Chk1 correspondant respectivement aux ligands LIG6 (magenta), LIG5 (bleu), LIG1 (jaune), LIG2(rouge) et isogranulatimide (blanc). La surface moléculaire est celle de isoGra/Chk1.

Par analyse de ces cinq structures, les points communs que l'on peut observer sont les suivants :

- (i) les cinq ligands présentent un cœur hétérocyclique de géométrie plane qui est bien adapté à l'entrée du site catalytique.
- (ii) les cinq cœurs hétérocycliques concernés sont ancrés dans le site catalytique via l'établissement d'interactions avec les deux mêmes résidus qui sont Glu85 et Cys87. Pour la granulatomide, l'isogranulatimide et leurs analogues décrits dans la littérature, ces interactions correspondent à l'ancrage du cycle maléimide.

Quant aux différences globales que l'on peut noter entre le complexe isogranulatimide/Chk1 et les complexes LIG/Chk1, elles résident essentiellement dans l'existence d'interactions additionnelles dans les complexes LIG/Chk1 permettant aux ligands d'exploiter au mieux et de manière plus efficace l'espace mis à disposition par le site catalytique. En effet, alors que, comme mentionné précédemment, l'isogranulatimide interagit avec le résidu Glu17 de la Chk1 (Figure 47A), les autres ligands établissent un réseau d'interactions beaucoup plus complexe au sein du site catalytique :

(i) dans le cas de LIG1, c'est la présence de la fonction alcool à proximité du motif triazole qui permet d'expliquer la forte affinité de ce ligand pour la Chk1 (Figure 48).⁹⁰ En effet, sa présence a pour effet de déplacer une des trois molécules d'eau conservées nativement dans une poche hydrophobe proche du site catalytique et une fois cette molécule d'eau déplacée, la fonction alcool participe à un réseau étroit de liaisons hydrogènes avec les deux molécules d'eau restantes. De plus, il apparaît que la même fonction alcool établit une liaison hydrogène supplémentaire avec le résidu Asp148 du squelette protéique (Figure 48).

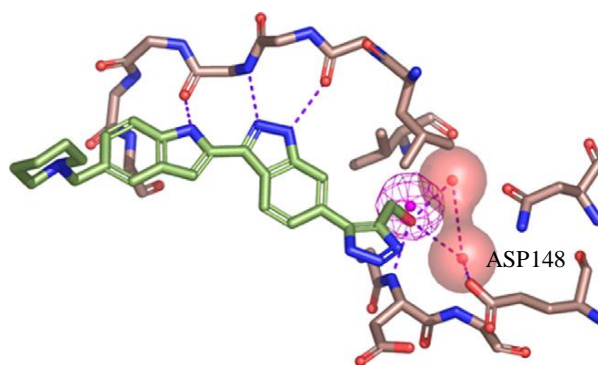


Figure 48 : Structure cristallographique du complexe LIG 1/Chk1

(ii) LIG3 présente sensiblement le même profil de réseau d'interactions que LIG1 (Figure 48).⁹¹ Le motif pyrazole terminal de LIG3 permet également au ligand d'accéder à la poche hydrophobe précédemment évoquée via l'établissement d'une liaison hydrogène avec le

résidu Asp148 (D148). Tout comme dans le cas de LIG1, les trois molécules d'eau présentes nativement dans la poche sont également concernées par l'interaction, à la différence que le motif pyrazole de LIG3 ne déplace aucune de ces trois molécules d'eau (Figure 49).

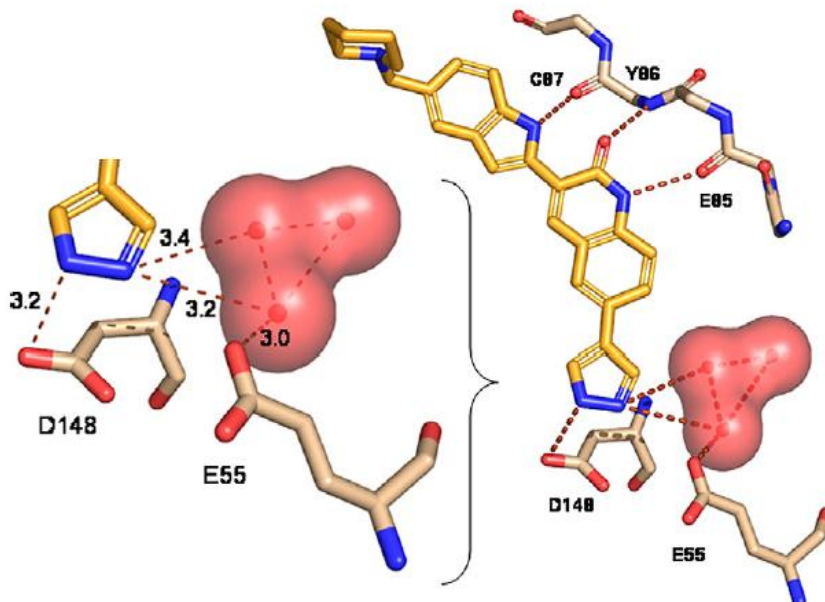


Figure 49 : Structure cristallographique du complexe LIG 3/Chk1

- (iii) LIG5 et LIG6 exploitent quant à eux une autre poche située à la périphérie du site catalytique dont les résidus concernés sont Lys38, Glu55 et Asn59.^{92,93} Dans le cas de LIG5, c'est la fonction phénol qui permet l'interaction avec les résidus Glu55 et Asn59 (Figure 47A) alors que dans le cas de LIG6, la fonction phénol interagit avec Glu55 et la fonction éther méthylique établit une liaison hydrogène avec le résidu Lys38 (Figure 47B).

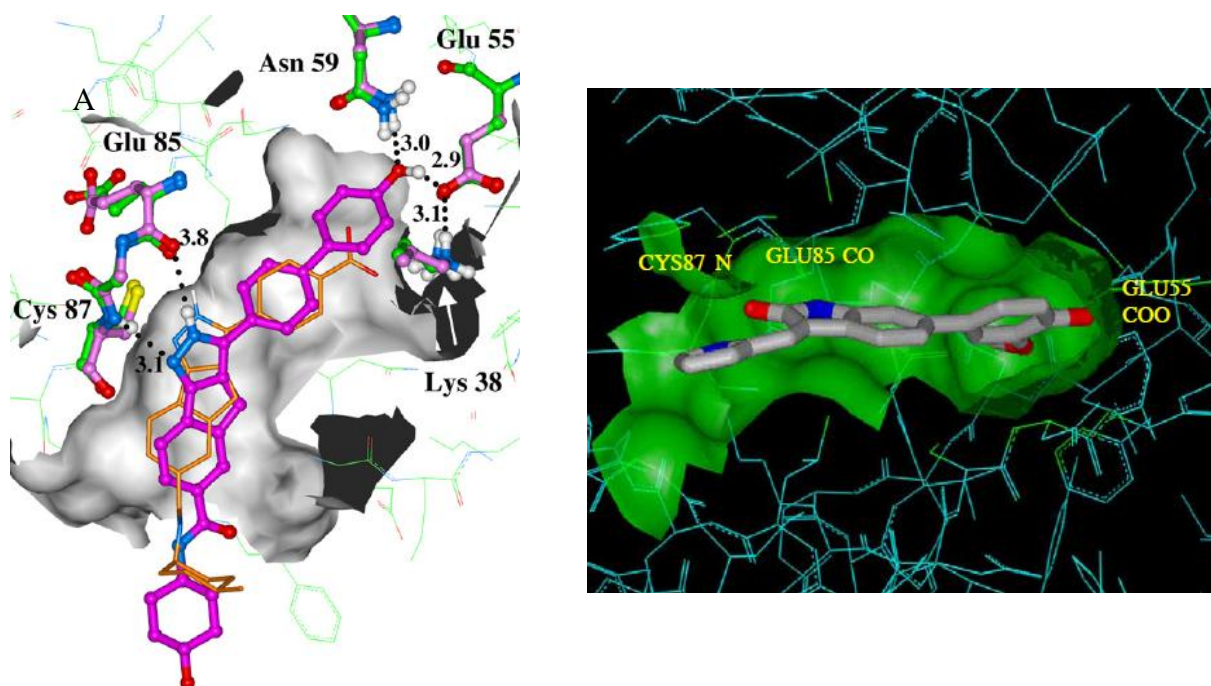


Figure 50 : Structures des complexes LIG 5/Chk1 avec LIG 5 en rose (A) et LIG 6/Chk1 (B)

A partir de ces observations qui sont d'ailleurs généralisables à l'ensemble des ligands LIG1-15, il apparaît clairement que l'exploitation du squelette protéique par le ligand isogranulatimide est loin d'être optimale.

IV. Matériels & méthodes

(voir partie expérimentale)

V. Conclusion

Cette étude nous a permis de mieux appréhender la structure tertiaire de la Chk1 et plus particulièrement de son site catalytique ATP. Par rapport au design des inhibiteurs potentiels de l'enzyme que nous avons fait à priori, nous nous rendons compte que toutes les structures semblent être de bons candidats. Leur alignement quasi parfait avec l'isogranulatimide nous laisse penser que l'inhibition qu'ils vont induire devrait être au moins équivalente à celle observée avec les produits naturels.

Néanmoins, ce travail montre aussi que les structures choisies ne correspondaient pas à une occupation optimale de la poche catalytique relativement profonde et étroite. Par conséquent, afin d'optimiser l'affinité de ligands dérivés de l'isogranulatimide pour la Chk1, une alternative à développer pourrait reposer sur la fonctionnalisation du pharmacophore isogranulatimide ou granulatimide ou tout autre cœur hétérocyclique analogue par des substituants judicieusement choisis.

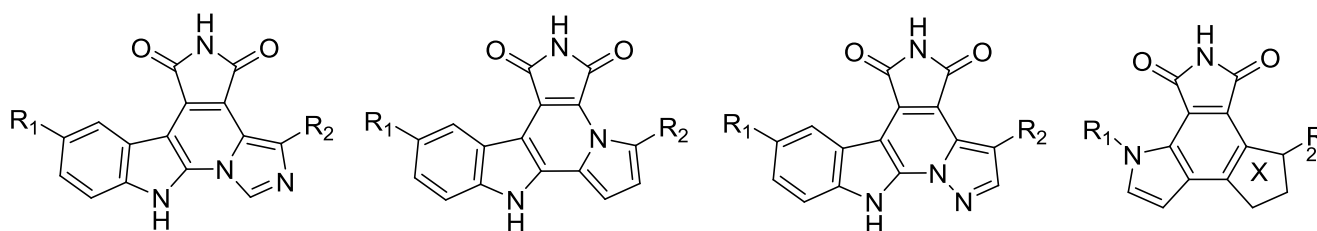


Figure 51 : Diversification envisagée sur les différents pharmacophore

Cette approche est théoriquement possible, les résultats d'arrimage moléculaire sur des ligandothèques virtuelles (cf. section précédente) le démontrent, mais il sera nécessaire de disposer d'autres informations (tests enzymatiques) pour aller vers une démarche rationnelle.

Il est à noter aussi que très récemment, est apparue dans la littérature une autre alternative s'intéressant à l'inhibition de la Chk1 via des inhibiteurs allostériques.⁹⁴ Cette voie a été confirmée par modélisation moléculaire mais n'en est pour l'instant qu'à ses débuts puisque les inhibiteurs proposés n'ont des IC_{50} que de l'ordre du micromolaire.

CONCLUSION
GENERALE

Au cours de ce travail de thèse qui avait pour objectif la synthèse d'analogues des alcaloïdes marins granulaticide et isogranulaticide, nous nous sommes intéressés à la préparation de deux types de squelette, l'un pentacyclique et l'autre tétracyclique.

Trois séries de molécules pentacycliques ont été préparées. Dans la première, le cycle imidazole des produits naturels a été remplacé par un noyau pyrrole. La synthèse de ces composés, basée sur une réaction de Michael entre un indolopyrrole diversement substitué en para de l'azote indolique et le maléimide ont ainsi pu être préparés.

Pour les deux autres séries pentacycliques dans lesquelles le cycle imidazole a été remplacé par un cycle pyrazole, deux voies de synthèse, l'une basée sur la condensation d'un indolopyrazole sur le dibromomaléimide, l'autre faisant intervenir un indolopyrazole et un pyrazole-acétamide, ont été mises au point.

Dans le but de définir de nouvelles structures d'inhibiteurs potentiels, des squelettes tétracycliques comportant un cycle benzénique central entouré d'un noyau maléimide et de deux autres cycles à cinq chaînons ont aussi été étudiées. Pour le moment, seules, deux structures isomères pour lesquelles ces deux derniers cycles sont un pyrrole et un cyclopentène ont pu être obtenues.

Les premières évaluations biologiques concernant l'activité antiproliférative ont mis en évidence que certains des composés pentacycliques obtenus possèdent des propriétés cytotoxiques intéressantes. Ce résultat n'est pas vraiment conforme à notre postulat de départ, à savoir de trouver des molécules qui ne devraient pas être cytotoxiques par elles-mêmes, mais seraient capables de potentialiser l'action d'un génotoxique. Il pourrait cependant constituer un point de départ pour accéder à des anticancéreux ayant un mode d'action différent pour ce type de squelettes.

Concernant l'inhibition du checkpoint G2, le fait de ne pas avoir retrouvé le résultat de la littérature pour la granulaticide, composé de référence de cette étude, rend difficile l'interprétation de l'absence d'activité observée avec l'ensemble de nos composés dont plus particulièrement celui précédemment décrit par l'équipe de Prudhomme pour être un inhibiteur puissant de la Chk1. Une étude plus poussée pour accéder à ce paramètre important de l'évaluation biologique reste donc encore à faire. Une fois ce paramètre maîtrisé, d'autres tels que l'inhibition de la Chk1, la spécificité de la Chk1 vis-à-vis d'autres kinases et la validité du concept d'association pourront alors être étudiés.

Le dernier volet de ce mémoire qui concernait une étude *in silico* de la Chk1 associée à différents ligands aussi bien reportés dans la littérature, que ceux que nous avons étudiés, a permis d'aller vers une rationalisation du design des inhibiteurs potentiels de l'enzyme. Il a montré que le cœur hétérocyclique de nos structures constitue une plateforme de départ intéressante sur laquelle il faudra introduire des substituants pour une occupation optimale de la poche catalytique relativement profonde et étroite.

Ce travail qui constituait pour notre équipe une première pierre à l'édifice de ce nouvel axe de recherche concernant le contrôle du cycle cellulaire, ouvre des perspectives pour définir des molécules potentiellement utilisables dans les traitements anticancéreux

PARTIE
EXPERIMENTALE

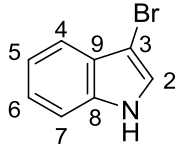
Toutes les réactions nécessitant des conditions anhydres ont été réalisées avec des solvants distillés.

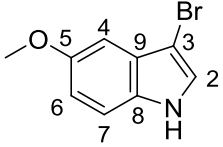
Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur des plaques de silice Merck silica gel 60F₂₅₄. Les plaques de chromatographie ont été révélées sous lampe UV et/ou par chauffage après immersion dans une solution d'acide phosphomolybdique à 10 % dans l'éthanol.

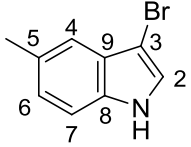
Les flashes chromatographies ont été réalisées avec un gel de silice SDS 35-70 μm . Les analyses RMN ont été obtenues avec des Bruker Advance 300, Advance 400 et Advance 500 fonctionnant à 300, 400 et 500 MHz respectivement pour les analyses RMN ^1H et à 75, 100 et 125 MHz respectivement pour les analyses RMN ^{13}C .

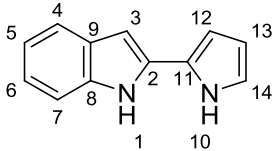
Les déplacements chimiques sont donnés en partie par millions (ppm) par rapport au solvant deutéré considéré comme référence interne. Les constantes de couplage sont données en Hertz (Hz). Les spectres infra-rouge (IR) ont été enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer FT-IR 1725X. Les spectres de masse ont été obtenus grâce à un spectromètre ThermoQuest TSQ 7000. Les spectres de masse haute résolution ont été enregistrés grâce à un spectromètre ThermoFinnigan MAT 95 XL.

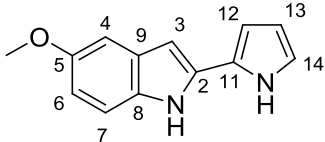
Les abbreviations des données pour la RMN sont les suivantes: s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet), dd (doublet dédoublé), ddd (doublet dédoublé dédoublé), td (triplet dédoublé).

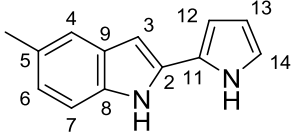
1a	N° CAS 1484-27-1
	3-Bromo-1H-indole
$C_6H_8NBr \rightarrow M = 194,97 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution d'indole (1,0 g, 8,6 mmol) dans du DMF anhydre et dégazé (22,5 mL) est ajoutée goutte à goutte à température ambiante et sous agitation une solution de dibrome (440 μL, 8,6 mmol) dans du DMF anhydre et dégazé (22,5 mL). Après 2h d'agitation à l'abri de la lumière, le milieu réactionnel est plongé dans de l'eau glacée (440 mL) contenant 7,5mL d'ammoniaque et du sulfite de sodium (5,0 g). Le produit attendu est isolé par filtration sous la forme d'un solide blanc qui noircit à la lumière (1,40 g, rdt 84 %)</p>	
RMN ^1H (300MHz, Acétone- d_6) δ 7,14 (td, 1H, $J=7,2 \text{ Hz}$ et $J=1,2 \text{ Hz}$, H_5); 7,22 (td, 1H, $J=7,2 \text{ Hz}$ et $J=1,5 \text{ Hz}$, H_6); 7,47 (m, 3H, $H_2/H_4/H_7$); 10,58 (sl, 1H, NH)	
RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone- d_6) δ 91,4 (C_3); 113,8 (C_7); 120,0 (C_4 ou C_6); 121,8 (C_6 ou C_4); 124,3 (C_5 ou C_2); 126,2 (C_2 ou C_5); 128,5 (C_9); 137,7 (C_8)	
SM (DCI- CH_4) m/z 195,0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 100 %) 197,0 (96)	
Pf décomposition	

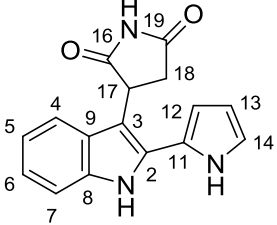
1b	N° CAS 85092-83-7
	3-bromo-5-methoxy-1H-indole
C ₉ H ₈ BrNO → M= 224,98 g.mol ⁻¹	
<p>A une solution de 5-methoxyindole (1,0 g, 6,8 mmol) dans du DMF anhydre (35 mL) est ajoutée goutte à goutte à température ambiante et sous agitation une solution de brome (350 µL, 6,8 mmol) dans du DMF anhydre (35 mL).</p> <p>Après 2h d'agitation, le milieu réactionnel est plongé dans de l'eau glacée (350 mL) contenant de l'ammoniaque aqueux (6 mL) et du sulfite de sodium (4,0 g). Après extraction par du CH₂Cl₂ (3x200 mL), les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO₄ et évaporées sous pression réduite. Le brut huileux marron obtenu est utilisé sans purification pour l'étape suivante.</p>	
<p>RMN ¹H (300 MHz, Acétone-d₆) δ 3,79 (s, 3H, OMe); 6,85 (dd, 1H, J=8,7 Hz et J=2,4 Hz, H₆); 6,94 (d, 1H, J=2,4 Hz, H₄); 7,37 (d, 1H, J=8,7Hz, H₇); 7,40 (d, 1H, J=2,7Hz, H₂); 10,42 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ¹³C (75 MHz, Acétone-d₆) δ 56,8 (OMe); 91,1 (C₃); 101,2 (C₇); 114,7 (C₄ ou C₆); 115,0 (C₄ ou C₆); 126,6 (C₂); 128,9 (C₉); 132,6 (C₈); 156,7 (C₅)</p>	
<p>SM (DCI-CH₄) m/z 226,0 ([M+H]⁺ 100 %) 228,0 (84)</p>	
<p>Pf décomposition</p>	

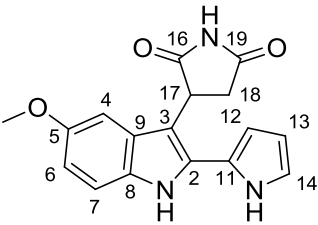
1c	N° CAS 1003708-62-0
	3-bromo-5-methyl-1H-indole
$C_9H_8BrN \rightarrow M = 208,98 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de 5-méthylindole (200 mg, 1,52 mmol) dans du DMF anhydre et dégazé (7,5 mL) est ajoutée goutte à goutte à température ambiante une solution de brome (78 μL, 1,52 mmol) dans du DMF anhydre et dégazé (7,5 mL). Après 2h d'agitation à l'abri de la lumière, le milieu réactionnel est plongé dans de l'eau glacée (80 mL) contenant de l'ammoniaque aqueux (1,4 mL) et du sulfite de sodium (1,0 g). Après extraction par du CH_2Cl_2 (3x60 mL), les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO_4 et évaporées sous pression réduite. Le brut huileux marron obtenu est utilisé sans purification pour l'étape suivante.</p>	
RMN ^1H (300 MHz, Acetone- d_6) δ 2,87 (s, 3H, Me); 6,54 (dd, 1H, $J=8,3 \text{ Hz}$ et $1,5 \text{ Hz}$, H_6); 6,73 (d, 1H, $J = 0,6 \text{ Hz}$, H_2); 6,85 (d, 1H, $J = 8,4 \text{ Hz}$, H_7); 7,01 (d, 1H, $J=2,4 \text{ Hz}$, H_4); 10,87 (sl, 1H, NH).	
RMN ^{13}C (300 MHz, Acétone- d_6) δ 22,5; 91,0; 113,5; 119,6; 126,0; 126,2; 128,8; 131,0; 136,1	
SM (DCI- NH_3) 210,0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 100 %) 212,0 (98 %)	
Pf décomposition	

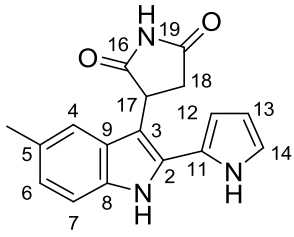
2a	N° CAS 88919-82-8
	2-(1H-pyrrol-2-yl)-1H-indole
$C_{12}H_{10}N_2 \rightarrow M = 182,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de 1a (838,5 mg, 4,3 mmol) dans du dichlorométhane distillé (35mL) est ajouté du pyrrole (600 μL, 8,6 mmol) puis de l'acide trifluoroacétique (120 μL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 20 minutes. Après retour à pH basique par addition d'ammoniaque, le milieu réactionnel est concentré puis purifié par chromatographie sur silice (ether de pétrole/EtOAc 85:15) pour donner un solide blanc (460 mg, rdt 59 %).</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 6,17 (td, 1H, $J=3,6 \text{ Hz}$ et $J=2,4 \text{ Hz}$, H_{12}); 6,57 (m, 1H, H_{13}); 6,63 (d, 1H, $J=2,1 \text{ Hz}$, H_3); 6,88 (td, 1H, $J=2,4 \text{ Hz}$ et $J=1,5 \text{ Hz}$, H_{14}); 6,96 (td, 1H, $J=7,2\text{Hz}$ et $J=1,2 \text{ Hz}$, H_6); 7,03 (td, 1H, $J=7,2 \text{ Hz}$ et $J=1,5 \text{ Hz}$, H_5); 7,31 (dd, 1H, $J=8,1 \text{ Hz}$ et $J=0,9 \text{ Hz}$, H_7); 7,47 (dd, 1H, $J=8,1 \text{ Hz}$ et $J=0,6 \text{ Hz}$, H_4); 10,36 (sl, 1H, NH); 10,57 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) δ 91,4 (C_3); 113,8 (C_7); 120,0 (C_4 ou C_6); 121,8 (C_6 ou C_4); 124,3 (C_5 ou C_2); 126,2 (C_2 ou C_5); 128,5 (C_9); 137,7 (C_9)</p>	
<p>SM (IE) m/z 182,0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 100 %) 181,0 (65) 154,0 (29)</p>	
<p>IR (KBr) 723, 749, 780 (C-H arom), 1036, 1346 (C-N) 1458, 1602 (C=C arom.) 3413 (NH) cm^{-1}</p>	
<p>Pf > 250°C</p>	

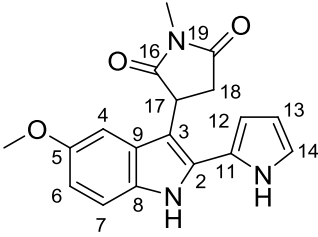
2b	
	5-methoxy-2-(1H-pyrrol-2-yl)-1H-indole
$C_{13}H_{12}N_2O \rightarrow M = 212,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de 1b (770,0 mg, 3,4 mmol) dans du dichlorométhane distillé (35 mL) est ajouté du pyrrole (475 μL, 6,8 mmol) puis de l'acide trifluoroacétique (100 μL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante 30 minutes. Après retour à pH basique par addition d'ammoniaque aqueux, le milieu réactionnel est évaporé à sec puis purifié par flash chromatographie sur colonne de silice (ether de pétrole/EtOAc 85 :15) pour donner un solide blanc sensible à la lumière (417mg, rdt 58 %)</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 3,78 (s, 3H, OMe); 6,19 (td, 1H, $J=3,3 \text{ Hz}$, $J=2,7 \text{ Hz}$, H_{14}); 6,58 (m, 2H, H_3 et H_{13}); 6,71 (dd, 1H, $J=8,7 \text{ Hz}$, $J=2,4 \text{ Hz}$, H_6); 6,87 (td, 1H, $J=2,7 \text{ Hz}$, $J=1,5 \text{ Hz}$, H_{12}); 7,01 (d, 1H, $J=2,4 \text{ Hz}$, H_4); 7,23 (d, 1H, $J=8,7 \text{ Hz}$, H_7); 10,23 (sl, 1H, NH); 10,48 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) δ 56,7 (OMe); 97,4 (C_3); 103,3 (C_4); 107,2 (C_{13}); 110,8 (C_{14}); 112,6 (C_6); 113,0 (C_7); 120,7 (C_{12}); 127,4 (C_{11}); 131,7 (C_9); 133,6 (C_8); 135,0 (C_2); 156,09 (C_5)</p>	
<p>SMHR (ES) calculée pour $C_{13}H_{13}N_2O$: 213,1028 trouvée 213,1019</p>	
<p>IR (KBr) 1226 1241 (C-N et C-O) 1450 1489 1608 (C=C) 3386 3417 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 147 $^{\circ}\text{C}$</p>	

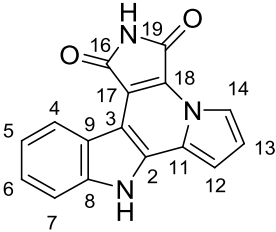
2c	
	5-methyl-2-(1H-pyrrol-2-yl)-1H-indole
$C_{13}H_{12}N_2 \rightarrow M = 196,10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de 1c (320,0 mg, 1,52 mmol) dans du dichlorométhane distillé (15 mL) est ajouté du pyrrole (211 μL, 3 mmol) puis de l'acide trifluoroacétique (40 μL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante 30 minutes. Après retour à pH basique par addition d'ammoniaque aqueux, le milieu réactionnel est concentré puis purifié par flash chromatographie sur silice (éther de pétrole/EtOAc 85:15) pour donner un solide blanc sensible à la lumière (90 mg, rdt 30 %)</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, Acetone-d_6) δ 2,36 (s, 3H); 6,17 (td, 1H, $J=3,4 \text{ Hz}$, $J=2,6 \text{ Hz}$); 6,54 (m, 1H); 6,86 (ddd, 1H, $J=5,2 \text{ Hz}$, $J=2,7 \text{ Hz}$, $J=1,3 \text{ Hz}$); 7,21 (d, 1H, $J=8,2 \text{ Hz}$); 7,26 (d, 1H, $J=0,7 \text{ Hz}$); 10,23 (sl, 1H, NH); 10,50 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) δ 22,5; 97,0; 107,2; 110,7; 112,1; 120,7; 121,1; 124,2; 127,4; 129,9; 131,6; 134,5; 136,9</p>	
<p>SM (DCI-CH_4) calculée pour $C_{13}H_{12}N_2$: 197,1079 trouvée 197,1060</p>	
<p>IR (KBr) 795 1072 1322 (C-N) 1442 1618 (C=C) 3337 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 158 $^\circ\text{C}$</p>	

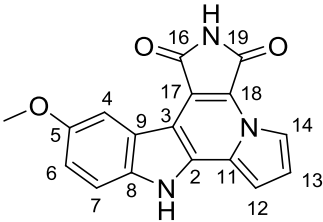
3a	N° CAS 569337-43-5
	3-(2-(1H-pyrrol-2-yl)-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione
$C_{16}H_{13}N_3O_2 \rightarrow M = 279,10 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Un mélange de 2a (200 mg, 1,1 mmol), de maléimide (220 mg, 2,3 mmol) et d'une quantité catalytique de $SnCl_2$ dans du toluène (66 mL) est chauffé à reflux 24 h. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par flash chromatographie sur silice (éther de pétrole/AcOEt 80:20 \rightarrow 50:50) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide blanc (110 mg, rdt 35 %)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 3,04 (dd, 1H, $J=18,6$ Hz et 4,8 Hz, H_{18a}); 3,30 (dd, 1H, $H=18,6$ Hz et 9,9 Hz, H_{18b}); 4,62 (dd, 1H, $J=9,9$ Hz et 4,8 Hz, H_{17}); 6,26 (dd, 1H, $J=3,6$ Hz, et 2,4 Hz, H_{14}); 6,52 (m, 1H, H_{13}); 7,00 (m, 1H, H_{12}); 7,03 (td, 1H, $J=8,1$ Hz et 1,2 Hz, H_5); 7,12 (td, 1H, $J=7,8$ Hz et 0,9 Hz, H_6); 7,35 (d, 1H, $J=7,8$ Hz, H_4); 7,41 (d, 1H, $J=8,1$ Hz, H_7); 10,32 (sl, 1H, NH); 10,44 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) δ 38,5 (C_{18}); 41,4 (C_{17}); 108,4 (C_3); 110,5 (C_{13}); 111,0 (C_{14}); 113,3 (C_7); 119,9 (C_4); 121,4 (C_5); 121,6 (C_{12}); 123,5 (C_{12}); 125,2 (C_{11}); 128,3 (C_9); 133,0 (C_2); 138,3 (C_8); 179,0 (C_{16} ou C_{19}); 181,9 (C_{16} ou C_{19}).</p>	
<p>SM (IE) 279 (M^+ 100 %) 234 (51) 208 (42) 207 (59) 206 (38)</p>	
<p>IR (KBr) 702 737 807 (C-H arom.) 943 973 1032 1071 1182 1267 1301 (C-N) 1349 1416 1456 1538 (C=C arom.) 1703 1774 (C=O) 3353 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 115 °C</p>	

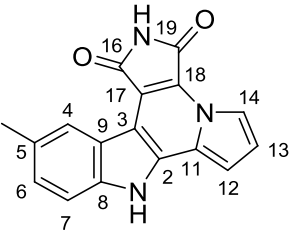
3b	
	3-[5-methoxy-2-(1H-pyrrol-2-yl)-1H-indol-3-yl]pyrrolidine-2,5-dione
$C_{17}H_{15}N_3O_3 \rightarrow M = 309,32 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Un mélange de 2b (320 mg, 1,50 mmol), de maléimide (290 mg, 3,00 mmol) et d'une quantité catalytique de $SnCl_2$ dans du toluène (90 mL) est chauffé à reflux pendant 24 h. Après évaporation du toluène, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2) pour donner le produit sous forme d'un solide vert pâle (276 mg, rdt 59%).</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 3,09 (dd, 1H, $J=18,0$ Hz et $J=5,1$ Hz, H_{18a}); 3,31 (dd, 1H, $J=18,0$ Hz et $J=9,9$ Hz, H_{18b}); 3,76 (s, 3H, OMe); 4,63 (dd, 1H, $J=4,8$ Hz, $J=9,9$ Hz, H_{17}); 6,26 (td, 1H, $J=2,4$ Hz, $J=3,6$ Hz, H_{14}); 6,50 (m, 1H, H_{13}); 6,79 (dd, 1H, $J=2,4$ Hz, $J=8,7$ Hz, H_6); 6,85 (d, 1H, $J=2,4$ Hz, H_4); 6,98 (td, 1H, $J=1,5$ Hz, $J=2,7$ Hz, H_{12}); 7,30 (d, 1H, $J=8,7$ Hz, H_7); 10,15 (sl, 1H); 10,39 (sl, 2H)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) δ 91,4 (C_3); 113,8 (C_7); 120,0 (C_4 ou C_6); 121,8 (C_6 ou C_4); 124,3 (C_5 ou C_2); 126,2 (C_2 ou C_5); 128,5 (C_9); 137,7 (C_9)</p>	
<p>SMHR (ES) calculée pour $C_{17}H_{16}N_3O_3$: 310,1192 trouvée 310,1167</p>	
<p>IR (KBr) 1182 1218 (C-N et C-O) 1488 1708 (C=C) 1775 (C=O) 2833 2940 3353 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 142 °C</p>	

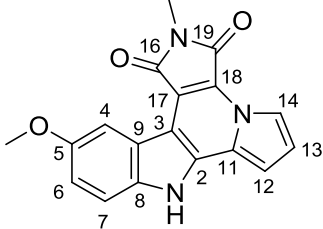
3c	
	3-(5-methyl-2-(1H-pyrrol-2-yl)-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione
$C_{17}H_{15}N_3O_2 \rightarrow M = 293,12 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Un mélange de 2c (60 mg, 0,31 mmol), de maléimide (59 mg, 0,62 mmol) et d'une quantité catalytique de $SnCl_2$ dans du toluène (17 mL) est chauffé à reflux 24h. Après évaporation du toluène, le résidu est purifié par flash chromatographie (Ether de pétrole/AcOEt 90:10 \rightarrow 70:30) pour donner le produit sous forme d'un solide blanc cassé (24,4 mg, rdt 28 %).</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, Acetone-d_6) δ 2,36 (s, 3H, Me); 3,04 (dd, 1H, $J=18,3$ Hz et $J=5,1$ Hz, H_{18a}); 3,28 (dd, 1H, $J=18,3$ Hz et $J=9,9$ Hz, H_{18b}); 4,59 (dd, 1H, $J=5,1$ Hz et $J=9,9$ Hz, H_{17}); 6,25 (td, 1H, $J=2,4$ Hz et 3,6 Hz, H_{14}); 6,49 (ddd, 1H, $J=1,5$ Hz, $J=2,7$ Hz et $J=3,0$ Hz, H_{13}); 6,95 (dd, 1H, $J=1,5$ Hz et 8,1 Hz, H_6); 6,98 (td, 1H, $J=1,5$ Hz et $J=2,7$ Hz, H_{12}); 7,15 (sl, 1H, H_4); 7,29 (d, 1H, $J=8,1$ Hz, H_7); 10,19 (sl, 1H, NH); 10,33 (sl, 1H, NH); 10,41 (sl, 1H, NH).</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) δ 22,7 (Me); 38,5 (C_{18}); 41,4 (C_{17}); 107,9 (C_3); 110,4 (C_{13}); 111,0 (C_{14}); 113,1 (C_7); 119,6 (C_4); 121,4 (C_{12}); 125,0 (C_6), 125,4 (C_{11}); 128,6 (C_9); 130,2 (C_5); 133,0 (C_2); 136,7 (C_8); 179,1 (C_{16} ou C_{19}); 182,0 (C_{16} ou C_{19}).</p>	
SMHR (DCI- CH_4) calculée pour $C_{17}H_{16}N_3O_2$: 294,1243 trouvée 294,1267	
IR (KBr) 731 799 (C-H arom.) 1184 (C-N) 1353 1707 1775 (C=O) 2924 3359 (N-H) cm^{-1}	
Pf 168 °C	

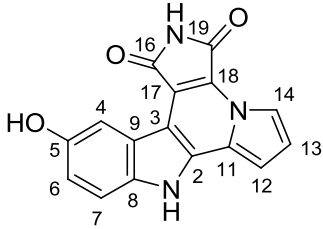
3d	
	3-(5-methoxy-2-(1H-pyrrol-2-yl)-1H-indol-3-yl)-1-methylpyrrolidine-2,5-dione
$C_{18}H_{17}N_3O_3 \rightarrow M = 323,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Un mélange de 2b (120 mg, 0,56 mmol), de Nméthyl-maléimide (124 mg, 1,12 mmol) et d'une quantité catalytique de SnCl₂ dans du toluène (36 mL) est chauffé à reflux 24 h. Après évaporation du toluène, le résidu est purifié par flash chromatographie (éther de pétrole/AcOEt 8:2) pour donner le produit sous forme d'un solide vert pâle (110 mg, rdt 61 %).</p>	
<p>RMN ¹H (300 MHz, Acétone-d₆) δ 3,01 (dd, 1H, J=18,0 Hz et J=4,8 Hz, H_{18a}); 3,04 (s, 3H, NMe); 3,27 (dd, 1H, J=18,0 Hz et J=9,6 Hz, H_{18b}); 3,74 (s, 3H, OMe); 4,55 (dd, 1H, J=4,8 Hz et J=9,6 Hz, H₁₇); 6,24 (td, 1H, J=2,7 Hz et J=3,3 Hz, H₁₂); 6,46 (m, 1H, H₁₃); 6,65 (d, 1H, J=2,4 Hz, H₄); 6,77 (dd, 1H, J=8,7 Hz et J=2,4 Hz, H₆); 6,98 (dt, 1H, J=2,7 Hz et J=1,5 Hz); 7,30 (d, 1H, J=8,7 Hz, H₇); 10,18 (sl, 1H, NH); 10,42 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ¹³C (75 MHz, Acétone-d₆) δ 24,2 (NMe); 35,3 (C₁₈); 38,1 (C₁₇); 55,0 (OMe); 100,2 (C₄); 106,5 (C₃); 108,6 (C₁₃); 109,1 (C₁₂); 111,2 (C₆); 112,1 (C₇); 119,6 (C₁₄); 123,4 (C₁₁); 126,9 (C₈); 131,5 (C₉); 131,7 (C₂); 154,2 (C₅); 176,6 (C₁₆), 179,3 (C₁₉)</p>	
<p>SMHR (DCI-CH₄) calculée pour C₁₈H₁₈N₃O₃ : 324,1348 trouvée 324,1351</p>	
<p>IR (KBr) 1030 1119 1218 1282 (C-O et C-N) 1438 1692 (C=O) 3377 (NH) cm⁻¹</p>	
<p>Pf 132 °C</p>	

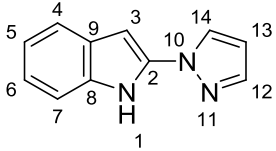
4a	N° CAS 569337-57-7
	11H-3a,5,11-Triaza-benzo[a]trindene-4,6-dione
$C_{16}H_9N_3O_2 \rightarrow M = 275,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Une suspension de 3a (50 mg, 0,179 mmol) et de Pd black (19,0 mg, 0,179 mmol) dans du nitrobenzène (2,5 mL) est irradiée sous micro-onde (300 W) à 190 °C pendant 30 minutes. Après retour à température ambiante, de l'éther de pétrole (5 mL) est ajouté et le milieu réactionnel est filtré sur silice pour éliminer le nitrobenzène (éther de pétrole/AcOEt 1/0 → 0/1) pour obtenir le produit attendu sous la forme d'un solide rouge foncé (21,6 mg, rdt 44 %)</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, Acetone-d_6) δ 7,00 (m, 2H, H_{12} et H_{13}); 7,31 (td, 1H, $J=7,8$ Hz et $J=0,9$ Hz, H_6); 7,41 (td, 1H, $J=7,8$ Hz et $J=1,2$ Hz, H_5); 7,60 (d, 1H, $J=7,8$ Hz, H_4); 8,32 (dd, 1H, $J=2,7$ Hz et $J=1,5$ Hz, H_{14}); 8,67 (d, 1H, $J=7,8$ Hz, H_7); 9,83 (sl, 1H, NH); 11,63 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) δ 99,7; 103,7; 113,2; 116,8; 117,0; 120,8; 121,1; 121,6; 122,2; 122,4; 124,5; 124,8; 133,6; 138,8; 166,4; 169,2</p>	
<p>SM (IE) 275 (M^+ 100 %) 204 (43) 102 (37)</p>	
<p>IR (KBr) 718 742 809 951 1081 1229 1374 (C-N) 1424 1496 1515 1649 (C=C arom.) 1703 (C=O) 3208 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf > 250 °C</p>	

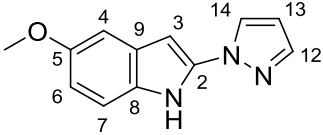
4b	
	8-Methoxy-11 <i>H</i> -3a,5,11-triaza-benzo [a] trindene-4,6-dione
$C_{17}H_{11}N_3O_3 \rightarrow M = 305,08 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Une suspension de 3b (140 mg, 0,45 mmol) et de Pd black (48,0 mg, 0,45 mmol) dans du nitrobenzène (7,0 mL) est irradiée sous micro-onde (300 W) à 190 °C pendant 30 minutes. Après retour à température ambiante, de l'éther de pétrole (15 mL) est ajouté et le milieu réactionnel est filtré sur silice pour éliminer le nitrobenzène (éther de pétrole/AcOEt 1/0 → 0/1) pour obtenir le produit attendu sous la forme d'un solide rouge foncé (82,0 mg, rdt 60 %)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, Acetone-d_6) δ 3,92 (s, 3H, OMe); 7,03 (dd, 1H, $J = 8,7 \text{ Hz}$ et $J = 2,7 \text{ Hz}$, H_6); 7,05 (d, 1H, $J = 1,8 \text{ Hz}$, H_{12} ou H_{13}); 7,05 (d, 1H, $J = 2,4 \text{ Hz}$, H_{12} ou H_{13}); 7,50 (dd, 1H, $J = 8,7 \text{ Hz}$ et $J = 0,6 \text{ Hz}$, H_4); 8,25 (d, 1H, $J = 2,7 \text{ Hz}$, H_7); 8,30 (dd, 1H, $J = 2,4 \text{ Hz}$ et $J = 1,8 \text{ Hz}$, H_{14}); 9,84 (sl, 1H, NH); 11,52 (sl, 1H, NH).</p>	
<p>RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) δ 56,0; 100,2; 104,2; 105,4; 112,9; 114,5 (2C); 116,4; 117,7; 121,3; 122,7; 125,0; 134,1; 134,6; 155,0; 166,9; 169,8</p>	
<p>SM (DCI-CH_4) calculée pour $C_{17}H_{12}N_3O_3$: 306,0879 trouvée 306,0884</p>	
<p>IR (KBr) 1025 1208 (C-O et C-N) 1459 1486 1707 1747 (C=O) 2852 2923 3316 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf > 250 °C</p>	

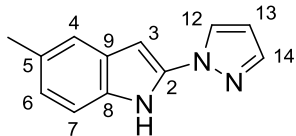
4c	
	8-Methyl-11 <i>H</i> -3a,5,11-triaza-benzo [a] trindene-4,6-dione
$C_{17}H_{11}N_3O_2 \rightarrow M = 289,09 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Une suspension de 3c (50 mg, 0,171 mmol) et de Pd black (18,1 mg, 0,171 mmol) dans du nitrobenzène (2,5 mL) est irradiée sous micro-onde (300 W) à 190 °C pendant 30 minutes. Après retour à température ambiante, de l'éther de pétrole (5 mL) est ajouté et le milieu réactionnel est filtré sur silice pour éliminer le nitrobenzène (éther de pétrole/AcOEt 1/0 → 0/1) pour obtenir le produit attendu sous la forme d'un solide rouge foncé (24 mg, rdt 49 %)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 2,52 (s, 3H, Me); 7,05 (d, 2H, $J=2,1$ Hz,); 7,25 (td, 1H, $J=6,6$ Hz et $J=1,2$ Hz); 7,48 (d, 1H, $J=8,4$ Hz); 8,30 (t, 1H, $J=2,1$ Hz,); 8,48 (dd, 1H, $J=2,4$ Hz, $J=0,9$ Hz)</p>	
<p>RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) δ 22,7; 101,2; 106,2; 113,1; 116,2; 117,8; 120,3; 124,6; 126,8; 130,5; 132,2 (2C); 136,0; 139,3; 167,8; 170,5</p>	
<p>IR (KBr) 1084 1216 (C-N) 1621 1490 (C=C arom.) 1710 (C=O) 3224-3443 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf > 250 °C</p>	

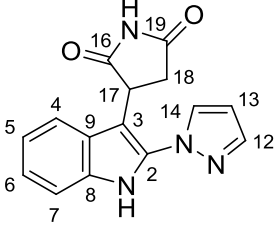
4d	
	8-Methoxy-5-methyl-11 <i>H</i> -3a,5,11-triazabenz[<i>a</i>]trindene-4,6-dione
$C_{18}H_{13}N_3O_3 \rightarrow M = 319,10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Une suspension de 3d (30 mg, 0,094 mmol) et de Pd black (10 mg, 0,094 mmol) dans du nitrobenzène (2 mL) irradié sous micro-onde (300 W) à 190 °C pendant 1h. Après retour à température ambiante, de l'éther de pétrole (5 mL) est ajouté et le milieu réactionnel est filtré sur silice pour éliminer le nitrobenzène (éther de pétrole/AcOEt 1/0 \rightarrow 0/1) pour obtenir le produit attendu sous la forme d'un solide rouge foncé (17,7 mg, rdt 59 %)</p>	
RMN ^1H (300 MHz, Acétone- d_6) δ 3,18 (s, 3H, OMe); 3,93 (s, 3H); 7,04 (m, 3H); 7,50 (d, 1H, $J=8,8$ Hz); 8,26 (d, 1H, $J=2,5$ Hz); 8,29 (m, 1H)	
SM (DCI-NH $_3$) calculée pour $C_{18}H_{14}N_3O_3$: 320,1035 trouvée 320,1040	
IR (KBr) 1043 1222 (C-O et C-N) 1377 1436 1682 (C=O) 3297 (NH) cm^{-1}	
Pf > 250 °C	

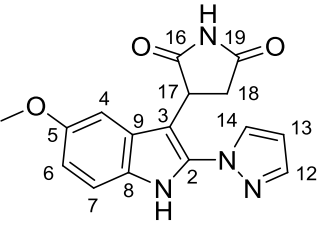
4 ^e	569337-61-7
	8-Hydroxy-11 <i>H</i> -3a,5,11-triaza-benzo [a] trindene-4,6-dione
$C_{16}H_9N_3O_3 \rightarrow M = 291,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
A une solution de composé 4b (15 mg, 0,05 mmol) dans le CH_2Cl_2 (6 mL) est ajoutée une solution 1M de BBr_3 dans le CH_2Cl_2 (2 mL, 2 mmol). Après 4 h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est versé dans une solution aqueuse saturée en $NaHCO_3$ (20 mL). Le produit attendu est isolé quantitativement par filtration (14,5 mg)	
RMN 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 6,89 (dd, 1H, $J=8,6 \text{ Hz}$, $J=2,5 \text{ Hz}$); 7,04 (s, 1H); 7,42 (d, 1H, $J=8,7 \text{ Hz}$); 7,99 (d, 1H, $J=2,4 \text{ Hz}$); 8,22 (dd, 1H, $J=2,7 \text{ Hz}$, $J=1,4 \text{ Hz}$)	
RMN ^{13}C (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ 99,6; 103,5; 107,0; 112,1; 113,8; 114,5; 115,8; 117,4; 120,4; 122,5; 124,5; 132,8; 134,1; 152,2; 166,4; 169,4	
SM (DCI- NH_3) m/z 292,0 ($[M+H]^+$)	
IR (KBr) 1710 1740 (C=O) 3000-3300 (N-H et O-H) cm^{-1}	
Pf > 250 °C	

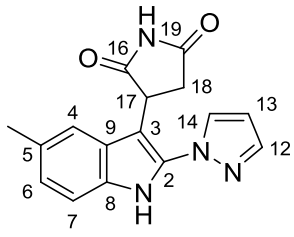
5a	1225068-04-1
	2-pyrazol-1-yl-1H-indole
$C_{11}H_9N_3 \rightarrow M = 183,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de 1a (838,5 mg, 4,3 mmol) dans du dichlorométhane distillé (35 mL) est ajouté du pyrazole (576 mg, 8,6 mmol) puis de l'acide trifluoroacétique (120 μL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. Après retour à pH basique par addition d'ammoniaque, le milieu réactionnel est évaporé à sec puis purifié par chromatographie sur silice (éther de pétrole/EtOAc 85:15) pour donner un solide blanc (480 mg, rdt 61 %)</p>	
<p>RMN ^1H (300MHz, Acétone-d_6) δ 6,53 (dd, 1H, $J=2,4 \text{ Hz}$ et $J=1,8 \text{ Hz}$, H_{13}); 6,59 (sl, 1H, H_3); 7,05 (td, 1H, $J=7,6 \text{ Hz}$ et $J=1,5 \text{ Hz}$, H_6); 7,13 (td, 1H, $J=7,6 \text{ Hz}$ et $J=1,5 \text{ Hz}$, H_5); 7,48 (dd, 1H, $J=7,6 \text{ Hz}$ et $J=0,8 \text{ Hz}$, H_4); 7,55 (dd, 1H, $J=7,6 \text{ Hz}$ et $J=0,6 \text{ Hz}$, H_7); 7,71 (d, 1H, $J=1,8 \text{ Hz}$, H_{14}); 8,31 (d, 1H, $J=2,4 \text{ Hz}$, H_{12}); 10,85 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) δ 88,8; 109,5; 113,2; 121,8; 122,0; 123,3; 129,7; 129,9; 135,9; 138,0; 142,5</p>	
<p>SM (DCI-CH_4) calculée pour $C_{11}H_{10}N_3$: 184,0875 trouvée 184,0882</p>	
<p>IR (KBr) 749 919 (C-H arom.) 1046 1233 1393 (C-N) 1470 1586 (C=C) 1621 1694 (C=N) 3122 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 147°C</p>	

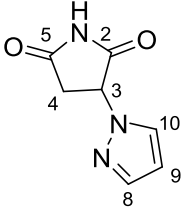
5b	
	5-methoxy-2-pyrazol-1-yl-1H-indole
$C_{12}H_{11}N_3O \rightarrow M = 213,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de 1b (770,0 mg, 3,4 mmol) dans du dichlorométhane distillé (35 mL) est ajouté du pyrazole (460 mg, 6,8 mmol) puis de l'acide trifluoroacétique (100 μL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante 12 heures à l'abri de la lumière. Après retour à pH basique par addition d'ammoniaque aqueux, le milieu réactionnel est évaporé à sec puis purifié par flash chromatographie sur colonne de silice (éther de pétrole/EtOAc 8:2) pour donner un solide blanc (396 mg, rdt 55 %)</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 3,80 (s, 3H, OMe); 6,51 (m, 2H, H₃ et H₁₃); 6,78 (dd, 1H, J=8,7 Hz et J=2,4 Hz, H₆); 7,06 (d, 1H, J=2,4 Hz, H₄); 7,37 (d, 1H, J=8,7 Hz, H₇); 7,70 (d, 1H, J=1,8 Hz, H₁₄); 8,26 (d, 1H, J=2,4 Hz, H₁₂); 10,75 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acetone-d_6) 56,78 (OMe); 89,02 (C₃); 103,89 (C₄); 109,42 (C₁₃); 113,42 (C₆); 113,88 (C₇); 129,60 (C₁₄); 130,48 (C₉); 130,85 (C₈); 138,38 (C₂); 142,41 (C₁₂); 156,62 (C₅)</p>	
<p>SM (IE) calculée pour $C_{12}H_{12}N_3O$: 214,0980 trouvée 214,0979</p>	
<p>IR (KBr) 1226 1236 (C-N et C-O) 1452 1499 1571 1592 (C=N et C=C) 3192 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 117 °C</p>	

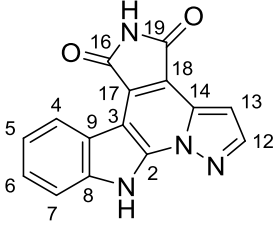
5c	
	5-methyl-2-pyrazol-1-yl-1H-indole
$C_{12}H_{11}N_3 \rightarrow M = 197,10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de 1c (320,0 mg, 1,52 mmol) dans du dichlorométhane distillé (15 mL) est ajouté du pyrazole (211 μL, 3 mmol) puis de l'acide trifluoroacétique (40 μL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante 10 heures. Après retour à pH basique par addition d'ammoniaque aqueux, le milieu réactionnel est concentré puis purifié par flash chromatographie sur silice (éther de pétrole/EtOAc 85:15) pour donner un solide blanc sensible à la lumière (90 mg, rdt 30 %).</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 2,39 (s, 3H); 6,50 (dd, 1H, $J=2,2$ Hz et $J=0,8$ Hz); 6,52 (dd, 1H, $J=2,5$ Hz et $J=1,8$ Hz); 6,95 (dd, 1H, $J=8,2$ Hz, $J=1,2$ Hz); 7,32 (dd, 1H, $J=1,5$ Hz, $J=0,7$ Hz); 7,35 (m, 1H); 7,69 (d, 1H, $J=1,5$ Hz); 8,29 (dd, 1H, $J=2,5$ Hz et $J=0,5$ Hz); 10,72 (sl, 1H)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) 22,6; 88,6; 109,4; 112,9; 121,6; 124,8; 129,6; 130,2; 130,8; 134,2; 138,0; 142,4</p>	
<p>SM (DCI-CH_4) calculée pour $C_{13}H_{12}N_2$: 198,1031 trouvée 198,1026</p>	
<p>IR (KBr) 748 798 (CH arom.) 1048 1390 (C-N) 1471 1597 (C=C) 3382 (NH)</p>	
<p>Pf 153 $^\circ\text{C}$</p>	

6a	
	3-(2-(1H-pyrazol-1-yl)-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione
$C_{15}H_{12}N_4O_2 \rightarrow M = 280,10 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Un mélange de 5a (220 mg, 1,2 mmol), de maléimide (240 mg, 2,5 mmol) et d'une quantité catalytique de $SnCl_2$ dans du toluène (70 mL) est chauffé à reflux 24h. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par flash chromatographie flash (éther de pétrole/AcOEt 80/20) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide orange pâle (20 mg, rdt 17 %)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, Acetone-d_6) δ 2,92 (dd, 1H, $J=18,0$ Hz et $J=5,7$ Hz, H_{18a}); 3,2 (dd, 1H, $J=18,0$ Hz et $J=9,6$ Hz, H_{18b}); 4,69 (dd, 1H, $J=9,6$ Hz et $J=5,7$ Hz, H_{17}); 6,54 (dd, 1H, $J=2,7$ Hz et $J=2,1$ Hz, H_{13}); 7,12 (td, 1H, $J=7,5$ Hz et $J=0,9$ Hz, H_6); 7,21 (td, 1H, $J=7,5$ Hz et $J=1,5$ Hz, H_5); 7,45 (dt, 1H, $J=7,5$ Hz et $J=1,1$ Hz, H_4); 7,49 (ddt, 1H, $J=7,5$ Hz, $J=0,9$ Hz et $J=0,6$ Hz, H_7); 7,74 (dd, 1H, $J=2,1$ Hz et $J=0,3$ Hz, H_{14}); 8,20 (dd, 1H, $J=0,6$ Hz et $J=2,7$ Hz, H_{12}); 10,22 (sl, 1H, NH); 10,98 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) δ 39,0; 39,9; 102,7; 109,0; 113,5; 113,5; 120,2; 122,0; 124,3; 128,2; 132,2; 134,9; 135,4; 143,2; 178,7; 180,6</p>	
<p>SM (DCI-CH_4) calculée pour $C_{15}H_{13}N_4O_2$: 281,1039 trouvée 281,1035</p>	
<p>IR (KBr) 742 (C-H aom.) 1045 1178 (C-N) 1457 1596 (C=C) 1653 1706 (C=O) 3057 3225 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf > 250 °C</p>	

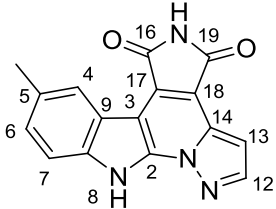
6b	
	3-(5-methoxy-2-(1H-pyrazol-1-yl)-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione
$C_{16}H_{14}N_4O_3 \rightarrow M = 310,11 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Un mélange de 5b (300 mg, 1,41 mmol), de maléimide (276 mg, 2,82 mmol) et d'une quantité catalytique de $SnCl_2$ dans du toluène (90 mL) est chauffé à reflux 24 h. Après évaporation du toluène, le résidu est purifié par chromatographie flash (éther de pétrole/AcOEt 8:2) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide orange pâle (50 mg, rdt 11 %)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 2,92 (dd, 1H, $J=18,0$ Hz et $J=6,0$ Hz, H_{18a}); 3,21 (dd, 1H, $J=18,0$ Hz et $J=9,6$ Hz, H_{18b}); 3,80 (s, 3H, OMe); 4,65 (dd, 1H, $J=9,6$ Hz et $J=6,0$ Hz, H_{17}); 6,53 (dd, 1H, $J=12,4$ Hz et $J=1,8$ Hz, H_{13}); 6,86 (dd, 1H, $J=8,7$ Hz et $J=2,4$ Hz, H_6); 7,00 (d, 1H, $J=2,4$ Hz, H_4); 7,35 (d, 1H, $J=8,7$ Hz, H_7); 7,72 (d, 1H, $J=1,8$ Hz, H_{12}); 8,17 (dd, 1H, $J=2,4$ Hz et $J=0,6$Hz, H_{14}); 10,12 (sl, 1H, NH); 10,74 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acetone-d_6) δ 38,9 (C_{18}); 40,0 (C_{17}); 56,9 (OMe); 102,4 (C_4); 102,8 (C_3); 109,0 (C_{13}); 114,1 (C_6); 114,1 (C_7); 129,0 (C_9); 130,3 (C_8); 132,1 (C_{12}); 135,2 (C_2); 143,1 (C_{14}); 156,6 (C_5); 178,5 (C_{16} ou C_{19}), 180,3 (C_{16} ou C_{19})</p>	
<p>SMHR (DCI-NH$_3$) calculée pour $C_{16}H_{14}N_4O_3$: 311,1144 trouvée 311,1137</p>	
<p>IR (KBr) 1189 (C-N) 1223 (C-O) 1601 (C=C arom.) 1703 (C=O) 3196 (NH) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 186 °C</p>	

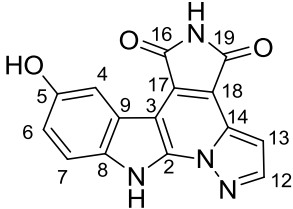
6c	
	3-[5-methyl-2-(pyrazol-1-yl)-1H-indol-3-yl]-pyrrolidine-2,5-dione
$C_{16}H_{14}N_4O_2 \rightarrow M = 294,11 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Un mélange de 5c (60 mg, 0,31 mmol), de maléimide (59 mg, 0,62 mmol) et d'une quantité catalytique de $SnCl_2$ dans du toluène (17 mL) est chauffé à reflux 24 h. Après évaporation du toluène, le résidu est purifié par flash chromatographie (Ether de pétrole/AcOEt 90:10 \rightarrow 70:30) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide blanc cassé (24,4 mg, rdt 28 %)</p>	
<p>RMN 1H (500 MHz, Acétone-d_6) δ 2,40 (sl, 3H); 2,92 (dd, 1H, $J=18,0$ Hz et $J=5,9$ Hz); 3,21 (dd, 1H, $J=18,0$ Hz et $J=9,8$ Hz); 4,66 (dd, 1H, $J=9,8$ Hz et $J=5,9$ Hz); 6,53 (m, 1H); 7,04 (dd, 1H, $J=8,3$ Hz et $J=1,6$ Hz); 7,28 (m, 1H); 7,35 (d, 1H, $J=8,2$ Hz); 7,73 (d, 1H, $J=1,7$Hz); 8,19 (m, 1H); 10,18 (sl, 1H); 10,85 (sl, 1H)</p>	
<p>RMN ^{13}C (125 MHz, Acétone-d_6) δ 20,8; 37,0; 38,1; 100,4; 107,1; 111,4; 111,5; 118,0; 124,0; 126,6; 129,2; 1130,3; 131,7; 141,2; 176,7; 178,7</p>	
<p>SM (DCI-CH_4) calculée pour $C_{16}H_{15}N_4O_2$: 295,1195 trouvée 295,1202</p>	
<p>IR (KBr) 759 1188 (C-N) 1460 1602 (C=C arom.) 1696 (C=O) 3233 (NH) cm^{-1}</p>	
<p>Pf > 250 °C</p>	

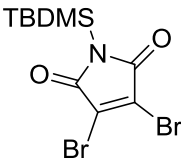
7	
	3-(1H-pyrazol-1-yl)pyrrolidine-2,5-dione
$C_7H_7N_3O_2 \rightarrow M = 165.05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Un mélange de 5a (220 mg, 1,2 mmol), de maléimide (160 mg, 1,7 mmol) et d'une quantité catalytique de SnCl_2 dans du toluène (70 mL) est chauffé à reflux 24 h. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par flash chromatographie flash (éther de pétrole/AcOEt 80:20) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide orange pâle (60,0 mg, rdt 31 %)</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 2,95 (dd, 1H, $J=17,7$ Hz et $J=5,1$ Hz, H_{4a}); 3,20 (dd, 1H, $J=17,7$ Hz et $J=9,3$ Hz, H_{4b}); 5,53 (dd, 1H, $J=9,3$ Hz et $J=5,1$ Hz, H_3); 6,28 (t, 1H, $J=2,1$ Hz, H_9); 7,50 (d, 1H, $J=2,1$ Hz, H_8); 7,92 (t, 1H, $J=2,1$ Hz, H_{10})</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 36,5 (C_4); 59,5 (C_3); 105,4 (C_9); 131,3 (C_{10}); 140,0 (C_8); 175,0/175,8 (C_2/C_5)</p>	
<p>SM (DCI-NH_3) m/z 165 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 100%) 182 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 30%)</p>	
<p>IR (CHCl_3) 1341 (C=N) 1707 1773 (C=O) 2958 3269 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 70 °C</p>	

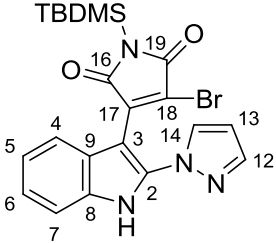
8a	
	11H-1,5,11,11b-Tetraaza-benzo[a]trindene-4,6-dione
$C_{15}H_8N_4O_2 \rightarrow M = 276,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Une solution de 11a (18 mg, 0,050 mmol) dans l'acétonitrile (11 mL) est irradiée à 350 nm pendant 5 h. Le produit attendu est isolé par filtration sous la forme d'une poudre orange (8,1 mg, rdt 58 %).</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 7,11 (d, 1H, $J=2,2\text{Hz}$); 7,40 (t, 1H, $J=7,5 \text{ Hz}$); 7,49 (t, 1H, $J=7,6 \text{ Hz}$); 7,67 (d, 1H, $J=8,2 \text{ Hz}$); 8,45 (d, 1H, $J=2,2 \text{ Hz}$); 8,60 (d, 1H, $J=7,3 \text{ Hz}$); 11,26 (sl, 1H, NH); 13,66 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>SMHR (DCI-CH_4) calculée pour $C_{15}H_9N_4O_2$: 277,0726 trouvée 277,0714</p>	
<p>IR (KBr) 750 1351 1467 1588 (C=C arom.) 1635 (C=N) 1707 1755 3148 3452 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf > 250 °C</p>	

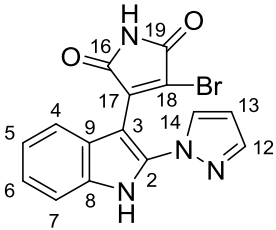
8b	
	3-(5-methoxy-2-(1H-pyrazol-1-yl)-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione
$C_{16}H_{10}N_4O_3 \rightarrow M = 306,08 \text{ g.mol}^{-1}$	
Une solution de 11b (20 mg, 0.052 mmol) dans le toluène (11 mL) est irradiée à 350 nm, pendant 5 h. Le produit attendu est isolé par filtration sous la forme d'un solide orange (12,4 mg, rdt 78%)	
RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 3,38 (s, 3H, OMe); 7,09 (d, 1H, $J=2,5$ Hz, H_{13}); 7,12 (dd, 1H, $J=8,5$ Hz et $J=2,5$ Hz, H_6); 7,57 (d, 1H, $J=8,5$ Hz, H_7); 8,15 (d, 1H, $J=2,5$ Hz, H_4); 8,42 (d, 1H, $J=2,5$ Hz, H_{12}); 11,25 (s, 1H, NH, H_{15}); 13,51 (s, 1H, NH, H_1)	
RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ 56,0 (OMe); 98,5 (C_{13}); 100,2 (C_3); 106,2 (C_4); 112,4 (C_{17}); 113,9 (C_7); 114,8 (C_6); 122,1 (C_9); 129,0 (C_{18}); 131,9 (C_8); 133,8 (C_{14}); 139,5 (C_2); 145,1 (C_{12}); 155,7 (C_5); 169,5 (C_{16} ou C_{19}); 170,2 (C_{19} ou C_{16})	
SMHR (DCI- CH_4) calculée pour $C_{16}H_{11}N_4O_3$: 307,0831 trouvée 307,0819	
IR (KBr) 1488 11590 (C=C arom.) 1629 (C=N) 1701 1751 (C=O) 3250 3446 (NH) cm^{-1}	
Pf > 250°C	

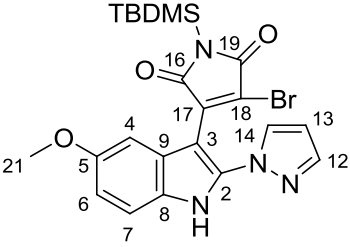
8c	
	3-(5-methyl-2-(1H-pyrazol-1-yl)-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione
$C_{16}H_{10}N_4O_2 \rightarrow M = 290,08 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Une solution de 11c (20 mg, 0,054 mmol) dans le toluène (11 mL) est irradiée à 350 nm, pendant 8 h. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié sur colonne de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$ 95/5 puis $MeOH/CH_3COOH$ 99/1) pour donner le produit sous forme d'un solide orange (10 mg, rdt 63%)</p>	
<p>RMN 1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7,09 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, H_{13}); 7,31 (dd, 1H, $J=8,3$ Hz et $J=2,1$ Hz, H_6); 7,55 (d, 1H, $J=8,3$ Hz, H_7); 8,40 (d, 1H, $J=2,1$ Hz, H_4); 8,43 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, H_{12}); 11,24 (sl, 1H, NH); 13,54 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ^{13}C (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 21,8 (Me); 97,9 (C_{13}); 99,3 (C_3); 112,0 (C_{18} ou C_{17}); 112,2 (C_7); 121,0 (C_9); 122,5 (C_4); 126,9 (C_6); 128,3 (C_{17} ou C_{18}); 130,9 (C_5); 133,2 (C_{14}); 135,0 (C_8); 144,5 (C_{12}); 168,8 (C_{16} ou C_{19}); 1695 (C_{19} ou C_{16})</p>	
<p>SMHR (DCI-CH_4) calculée pour $C_{16}H_{11}N_4O_2$: 291,0882 trouvée 291,0886</p>	
<p>IR (KBr) 795 (C-H arom.) 1079 1171 1280 (C-N) 1457 1485 1589 (C=C arom. C=N) 1702 1752 (C=O) 3443 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf > 250 °C</p>	

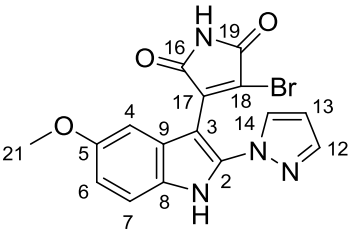
8d	
	3-(5-hydroxy-2-(1H-pyrazol-1-yl)-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione
$C_{15}H_8N_4O_3 \rightarrow M = 292,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de 8b (50 mg, 0,16 mmol) dans le CH_2Cl_2 (15 mL) est ajoutée une solution 1M de BBr_3 dans le CH_2Cl_2 (6 mL, 6 mmol). Après 4h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est plongé dans une solution aqueuse saturée en $NaHCO_3$ (20 mL). Le produit attendu est isolé par filtration (39 mg, rdt 84 %)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 6,88 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz et $J=2,4$ Hz, H_6); 6,97 (d, 1H, $J=2,4$ Hz, H_{13}); 7,42 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, H_7); 8,00 (d, 1H, $J=2,4$ Hz, H_4); 8,29 (d, 1H, $J=2,4$ Hz, H_{12})</p>	
<p>SM (DCI-CH_4) calculée pour $C_{15}H_9N_4O_3$: 293,0675 trouvée 293,0677</p>	
<p>IR (KBr) 771 1193 1483 1585 (C=C arom.) 1636 (C=N) 1701 (C=O) 2976-3500 (N-H et O-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf > 250 °C</p>	

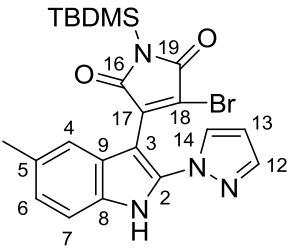
9	N° CAS 211295-23-7
	3,4-dibromo-1-(tert-butyl dimethylsilyl)-1H-pyrrole-2,5-dione
$C_{10}H_{15}Br_2NO_2 \rightarrow M = 366,92 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>A une solution de dibromomaléimide (1,0 g, 3,93 mmol) dans le CH_2Cl_2 distillé (30 mL) est ajoutée la triéthylamine (1,7 mL, 11,79 mmol). Après 30 minutes d'agitation, le TBDMSCl (1,77 g, 11,79 mmol) est ajouté. Après 12 h d'agitation, le milieu réactionnel est lavé à l'eau (3x20 mL). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$. L'évaporation du solvant donne le produit attendu sous forme d'un solide rouge (1,370 g, rdt 95 %)</p>	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0,46 (s, 6H, Si-(CH_3) $_2$); 0,95 (s, 9H, tBu)	
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ -4,6 (Si-(CH_3) $_2$); 18,8 (C_{IV} tBu); 26,0 (CH_3 tBu); 131,5 (C-Br); 168,6 (C=O)	
SM (DCI- NH_3) m/z 385,0 (52 %) 387,0 (100 %) 389,0 (54 %)	
IR (KBr) 681 (C-Br) 792 826 (Si- CH_3) 1079 1311 1711 (C=O) cm^{-1}	
Pf 120 °C	

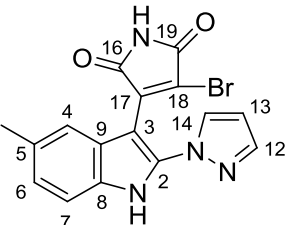
10a	
	3-(2-(1H-pyrazol-1-yl)-1H-indol-3-yl)-4-bromo-1-(tert-butyldimethylsilyl)-1H-pyrrole-2,5-dione
$C_{21}H_{23}BrN_4O_2 \rightarrow M = 470,08 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Méthode 1 : Une solution de composé 5a (120,0 mg, 0,61 mmol) dans le THF (8 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution d'EtMgBr 1M dans le THF (2,4 mL, 2,4 mmol). La solution est agitée sous atmosphère inerte pendant 30 minutes puis une solution du composé 9 (220 mg, 0,61 mmol) dans le THF (2 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité 12 h. Après un traitement avec une solution aqueuse à 10% de NH₄Cl (10 mL), le milieu réactionnel est extrait à l'AcOEt (2x15 mL). Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄ puis évaporées à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (éther de pétrole/CH₂Cl₂/MeOH 8:2:0 → 0:95:5) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide jaune (15 mg, rdt 6 %) et le composé 11a</p>	
<p>Méthode 2 : A une solution de 5a (65 mg, 0,36 mmol) dans le THF (1 mL) est ajoutée goutte à goutte à - 15 °C, une solution de LiHMDS 1M dans le THF (1,08 mL, 1,08 mmol). Après 45 minutes d'agitation, une solution du composé 9 (140 mg, 0,38 mmol) dans le THF (1 mL) est ajoutée avant de laisser le milieu réactionnel revenir à température ambiante en 12 h. Le milieu réactionnel est versé dans de l'HCl 10 % (10 mL) à 0 °C. Après extraction à l'AcOEt (3x20 mL), les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de NaHCO₃ puis une solution saturée de NaCl, Après séchage sur MgSO₄ et évaporation sous pression réduite, le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie (éther de pétrole/AcOEt 8:2 → 1:1) pour donner le produit attendu sous la forme d'un solide jaune (60 mg, rdt 36 %) et le composé 11a</p>	
<p>RMN ¹H (300 MHz, Acétone-d₆) δ 0,44 (s, 6H); 0,97 (s, 9H); 6,50 (dd, 1H, J=2,5 Hz et J=1,8 Hz); 7,23 (m, 2H); 7,56 (m, 2H); 7,71 (m, 1H); 8,16 (m, 1H); 11,50 (sl, 1H)</p>	
<p>RMN ¹³C (75 MHz, Acétone-d₆) δ -3,4; 20,5; 27,6; 93,7; 109,8; 113,7; 122,6; 122,8; 124,7; 127,1; 127,6; 132,0; 135,6; 137,3; 142,2; 143,6; 172,3; 174,6</p>	
<p>SM (DCI-CH₄) calculée pour C₂₁H₂₄BrN₄O₂ : 471,0852 trouvée 471,0854</p>	
<p>IR (KBr) 746 1032 1310 1459 1611 (C=C arom.) 1706 (C=O) 3233 3451 (N-H) cm⁻¹</p>	
<p>Pf 149 °C</p>	

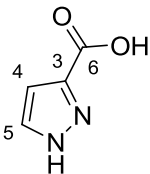
11a	
	3-(2-(1H-pyrazol-1-yl)-1H-indol-3-yl)-4-bromo-1H-pyrrole-2,5-dione
$C_{15}H_9BrN_4O_2 \rightarrow M = 355,99 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
Depuis la méthode 1 : solide rouge (30 mg, rdt 14 %) Depuis la méthode 2 : solide rouge (30 mg, rdt 24 %)	
RMN 1H (300 MHz, Acétone- d_6) δ 6,51 (dd, 1H, $J=2,5$ Hz et $J=1,8$ Hz); 7,18 (m, 1H); 7,26 (m, 1H); 7,57 (m, 2H); 7,73 (d, 1H, $J=1,8$ Hz); 8,24 (d, 1H, $J=2,5$ Hz); 10,15 (sl, 1H); 11,57 (sl, 1H)	
RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) 91,2; 108,1; 111,9; 120,4; 120,6; 122,5; 123,0; 125,2; 130,6; 133,2; 134,9; 138,5; 141,8; 167,0; 169,1	
SM (DCI- CH_4) calculée pour $C_{15}H_9BrN_4O_2$: 356,9987 trouvée 356,9998	
IR (KBr) 1022 1331 (C-N) 1460 1564 1628 (C=C) 1723 (C=O) 3304 (NH) cm^{-1}	
Pf 114 °C	

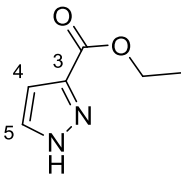
10b	
	<p>3-bromo-1-(tert-butyldimethylsilyl)-4-(5-methoxy-2-(1H-pyrazol-1-yl)-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione</p>
$C_{22}H_{35}BrN_4O_3Si \rightarrow M = 500,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Même méthode 1 que pour le composé 10a avec 5b (60,0 mg, 0,28 mmol), THF (4 mL), EtMgBr 1M dans le THF (2,4 mL, 2,4 mmol), 9 (100 mg, 0,28 mmol)/THF (2 mL) est ajouté goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité 12 h. Chromatographie sur colonne d'alumine (éther de pétrole/CH₂Cl₂/MeOH 8:2:0 → 0:95:5) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide orange (60 mg, rdt 43 %) et le composé 11b</p>	
<p>Même méthode 2 que pour le composé 10a avec 5b (410 mg, 1,92 mmol), THF (7 mL), LiHMDS 1M dans le THF (5,76 mL, 5,76 mmol), 9 (740 mg, 2,0 mmol) /THF (10 mL), l'HCl 10 % (35 mL). Après traitement, le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie (éther de pétrole/AcOEt 8/2 → 1/1) pour donner le produit attendu sous la forme d'un solide rouge (420 mg, rdt 44 %) et le composé 11b</p>	
<p>RMN ¹H (300 MHz, Acétone-d₆) δ 0,45 (s, 6H); 0,98 (s, 9H); 3,82 (s, 3H); 6,50 (dd, 1H, J=2,6 Hz et J=1,8 Hz); 6,91 (dd, 1H, J=8,8 Hz et J=2,5 Hz); 7,07 (d, 1H, J=2,5 Hz); 7,45 (dd, 1H, J=8,8 Hz et J=0,6 Hz); 7,71 (dd, 1H, J=1,8Hz et J=0,5 Hz); 8,15 (dd, 1H, J=2,6 Hz et J=0,6 Hz); 11,38 (sl, 1H)</p>	
<p>RMN ¹³C (100 MHz, Acétone-d₆) δ -3,4; 20,5; 27,6; 56,8; 94,1; 104,8; 109,7; 114,5; 114,7; 126,3; 128,2; 130,3; 132,0; 137,5; 142,4; 143,5; 157,0; 172,5; 174,8</p>	
<p>SM (DCI-CH₄) calculée pour C₂₂H₂₆BrN₄O₃Si : 501,0958 trouvée 501,0956</p>	
<p>IR (KBr) 975 1026 1211 1331 (C-O, C-N et C-Si) 1480 1574 (C=C arom.) 1638 1721 (C=O) 3210 (N-H) cm⁻¹</p>	
<p>Pf 234 °C</p>	

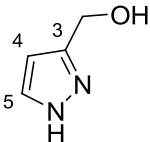
11b	
	<p>3-bromo-4-(5-methoxy-2-(1H-pyrazol-1-yl)-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione</p>
$C_{16}H_{11}BrN_4O_3 \rightarrow M = 386,00 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Depuis la méthode 1 : solide orange (8 mg, rdt 1 %)</p> <p>Depuis la méthode 2 : solide rouge (200 mg, rdt 27 %)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 3,83 (s, 3H); 6,51 (dd, 1H, J=2,6 Hz et J=1,8 Hz); 6,91 (dd, 1H, J=8,8 Hz et J=2,5 Hz); 7,12 (d, 1H, J=2,5 Hz); 7,46 (dd, 1H, J=0,6Hz et J=8,8 Hz); 7,73 (dd, 1H, J=1,8 Hz et J=0,5 Hz); 8,20 (dd, 1H, J=2,6 Hz et J=2,6 Hz); 10,11 (sl, 1H); 11,36 (sl, 1H)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) δ 56,8; 93,7; 104,8; 109,8; 114,5; 114,7; 125,2; 128,3; 130,3; 132,0; 137,3; 141,1; 143,5; 157,0; 167,9; 170,2</p>	
<p>SM (DCI-CH_4) calculée pour $C_{16}H_{12}BrN_4O_3$: 387,0093 trouvée 387,0087</p>	
<p>IR (KBr) 654 (C-Br) 1023 1211 (C-O) 1329 (C-N) 1491 1617 (C=C) 1717 (C=O) 3213 3435 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 105 °C</p>	

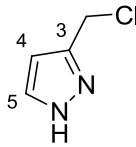
10c	
	<p>3-bromo-1-(tert-butyl dimethylsilyl)-4-(5-methyl-2-(1H-pyrazol-1-yl)-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione</p>
$C_{22}H_{25}BrN_4O_2Si \rightarrow M = 484,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Même méthode 1 que pour le composé 10a avec 5c (120,0 mg, 0,61 mmol), THF (8 mL), EtMgBr 1M dans le THF (2,4 mL, 2,4 mmol), 9 (220 mg, 0,61 mmol)/THF (2 mL), solution aqueuse à 10 % de NH₄Cl (10 mL), AcOEt (2x15 mL). Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine (éther de pétrole/CH₂Cl₂/MeOH 8:2:0 → 0:95:5) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide rouge (40 mg, rdt 20 %) et le composé 11c</p> <p>Même méthode 2 que pour le composé 10a avec 5c (40 mg, 0,20 mmol), THF (1 mL), LiHMDS 1M dans le THF (0,60 mL, 0,60 mmol), 9 (82 mg, 0,22 mmol) /THF (1 mL), l'HCl 10 % (3 mL). Après traitement, le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie (éther de pétrole/AcOEt 8/2 → 1/1) pour donner le produit attendu sous la forme d'un solide rouge (8 mg, rdt 8 %) et le composé 11b</p>	
<p>RMN ¹H (300 MHz, Acétone-d₆) δ 0,20 (s, 6H); 0,89 (s, 9H); 3,82 (s, 3H); 6,50 (dd, 1H, J=2,6 Hz et J=1,8 Hz); 6,91 (dd, 1H, J=8,8 Hz et J=2,6 Hz); 7,07 (d, 1H, J=2,5 Hz); 7,45 (dd, 1H, J=8,8 Hz et J=0,6 Hz); 7,71 (dd, 1H, J=1,8 Hz et J=0,5 Hz); 8,15 (dd, 1H, J=2,6 Hz, J=0,6Hz); 11,38 (sl, 1H)</p>	
<p>RMN ¹³C (125 MHz, Acétone-d₆) -3,3; 17,7; 21,3; 25,7; 90,8; 108,0; 111,6; 120,0; 122,8; 124,0; 125,4; 129,4; 130,5; 131,5; 134,9; 138,7; 141,7; 167,0; 169,1</p>	
<p>SMHR (DCI-CH₄) calculée pour C₂₂H₂₆BrN₄O₂Si : 485,1008 trouvée 485,1004</p>	
<p>IR (KBr) 740 768 (C-H arom.) 805 (Si-CH₃) 1030 1332 1398 (C-N) 1617 (C=C) 1717 (C=O) 3118 (N-H) cm⁻¹</p>	
<p>Pf 198 °C</p>	

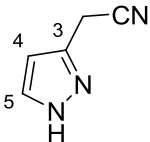
11c	
	3-bromo-4-(5-methyl-2-(1H-pyrazol-1-yl)-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione
$C_{16}H_{11}BrN_4O_2 \rightarrow M = 370,01 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Depuis la procédure 1 : solide rouge (50 mg, rdt 22 %)</p> <p>Depuis la procédure 2 : solide rouge (20 mg, rdt 27 %)</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 2,42 (s, 3H, Me); 6,50 (dd, 1H, $J=4,5$ Hz et $J=1,8$ Hz); 7,10 (dd, 1H, $J=8,0$ Hz et $J=1,2$Hz); 7,38 (s, 1H); 7,43 (d, 1H, $J=8,4$ Hz); 7,72 (d, 1H, $J=1,2$ Hz); 8,20 (d, 1H, $J=2,7$ Hz); 10,14 (sl, 1H, NH); 11,41 (sl, 1H, NH)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) δ 20,9; 91,3, 108,0; 111,6; 120,5; 123,8; 124,4 126,2 130,15 130,23; 132,0; 135,4 141,7; 166,2; 168,5</p>	
<p>SMHR (DCI-CH_4) calculée pour $C_{16}H_{11}BrN_4O_2$: 371,0144 trouvée 371,0151</p>	
<p>IR (KBr) 651 (C-Br) 1031 1336 (C-N) 1396 1496 1619 (C=C) 1718 (C=O) 2927 3322 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 148 °C</p>	

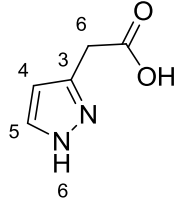
13	N° CAS 1621-91-6
	1H-pyrazole-3-carboxylic acid
$C_4H_4N_4O_2 \rightarrow M = 112,03 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de 3-méthylpyrazole (5,39 g, 65,7 mmol) dans l'eau (250 mL), on ajoute du $KMnO_4$ (22,77 g, 144,1 mmol). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 4 h puis filtré. Le volume du filtrat est réduit à 100 mL, acidifié à pH=2 puis mis à +4 °C pendant 1 h. Après filtration on obtient le produit attendu sous forme d'une poudre blanche (6,14 g, rdt 84 %)</p>	
RMN 1H (300 MHz, D_2O) δ 6,61 (d, 1H, J=2,1 Hz, H ₄); 7,59 (d, 1H, J=2,1 Hz, H ₅)	
RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) δ 106,8 (C ₄); 138,0 (C ₅); 145,2 (C ₃); 168,6 (C ₆)	
SM (DCI-NH ₃) m/z 113,0 ([M+H] ⁺ 10%) 130,0 ([M+NH ₄] ⁺ 100 %)	
IR (KBr) 1580 (C=C) 1629 (C=O) 3500-2800 (N-H) cm^{-1}	
Pf 208 °C	

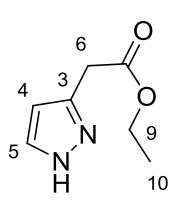
14	N° CAS 5932-27-4
	Ethyl 1H-pyrazole-3-carboxylate
$C_6H_8N_2O_2 \rightarrow M = 140,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>13 (4,52 g, 40,3 mmol) est dissout dans l'éthanol absolu (100 mL) et la solution est saturée en acide chlorhydrique sec. Après une nuit sous agitation, le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le solide blanc obtenu est repris dans une solution aqueuse saturée en $NaHCO_3$ (50 mL) puis extrait avec de l'acétate d'éthyle. L'évaporation des phases organiques rassemblées fournit le produit attendu sous forme d'un solide blanc (4,35 g, rdt 77 %)</p>	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,41 (t, 3H, $J=7,1$ Hz, $-CH_3$); 4,42 (q, 2H, $J=7,1$ Hz, $-CH_2-$); 6,86 (d, 1H, $J=2,2$ Hz, H_4); 7,73 (d, 1H, $J=2,2$ Hz, H_5)	
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 14,4 (CH_3); 61,0 (CH_2); 107,8 (C_4); 132,5 (C_5); 141,6 (C_3); 162,0 (CO)	
SM (DCI- NH_3) m/z 141,0 ($[M+H]^+$ 35%) 158,0 ($[M+NH_4]^+$ 100 %)	
IR ($CHCl_3$) 1305 1374 (C-O) 1699 (C=O) 3245 (N-H) cm^{-1}	
Pf 160 °C	

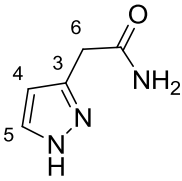
15	N° CAS 23585-49-1
	(1H-pyrazol-3-yl)methanol
$C_4H_6N_2O \rightarrow M = 98,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>LiAlH₄ (3,75 g, 98,6 mmol) est additionné au THF sec (150 mL) puis porté à reflux 5 minutes. L'addition de 14 (8,37 g, 59,8 mmol) se fait de manière à maintenir le reflux. Après 4 h de reflux, le milieu réactionnel est refroidi à l'aide d'un bain de glace. L'addition de KOH 10 % (4,5 mL) et d'eau (6 mL) neutralise LiAlH₄ en une nuit. Après filtration, l'évaporation du solvant fournit le produit sous la forme d'une huile marron (4,00 g, rdt 69 %)</p>	
RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) δ 4,66 (s, 2H, CH ₂); 6,16 (d, 1H, J=2,1 Hz, C ₄); 7,41 (d, 1H, J=2,1 Hz, C ₅)	
RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) δ 57,9 (CH ₂); 103,6 (C ₄); 132,8 (C ₅); 149,2 (C ₃)	
SM (DCI-NH ₃) m/z 99,0 ([M+H] ⁺ 100%) 116,0 ([M+NH ₄] ⁺ 43 %)	
IR (CDCl ₃) 1374 (C-O) 1698 3245 (N-H) cm ⁻¹	

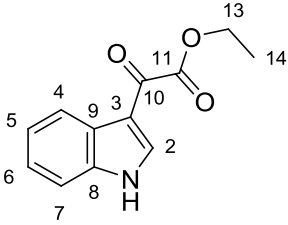
16	N° CAS 23784-89-6
	3-(chloromethyl)-1H-pyrazole
$C_4H_5ClN_2 \rightarrow M = 116,01 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
Additionner le chlorure de thionyle (50 mL) sur 15 (2,00 g, 20,4 mmol). Chauffer le milieu réactionnel à reflux 15 minutes. Après évaporation du solvant, le produit attendu est obtenu sous forme d'une poudre jaune pâle (2,88 g, quantitatif)	
RMN 1H (300 MHz, DMSO) δ 4,73 (s, 2H, CH_2); 6,35 (d, 1H, $J=2,1$ Hz, H_4); 7,70 (d, 1H, $J=2,1$ Hz, H_5)	
RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO) δ 38,2 (CH_2); 104,9 (C_4); 131,5 (C_5); 145,9 (C_3)	
SM (DCI- NH_3) m/z 117,0 ($[M+H]^+$ 100%) 134,0 ($[M+NH_4]^+$ 84 %)	
IR (KBr) 1423 1500 1582 2389 3131 cm^{-1}	
Pf 158 °C	

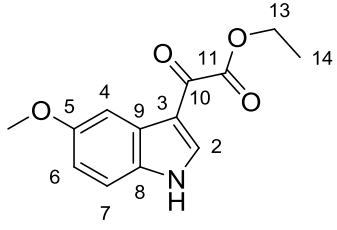
17	N° CAS 135237-01-3
	2-(1H-pyrazol-3-yl)acetonitrile
$C_5H_5N_3 \rightarrow M = 107,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution aqueuse de KCN (24,10 g dans 26 mL) est ajoutée une solution de 16 (2,88 g, 40,8 mmol) dans 80 mL d'éthanol. Après 4 h d'agitation, le milieu réactionnel est filtré et le volume du filtrat est réduit à 30 mL. L'extraction de ce filtrat par le chloroforme fournit le produit attendu sous la forme d'une huile marron (2,80 g, rdt 64 %)</p>	
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 3,82 (s, 2H, CH_2); 6,31 (d, 1H, $J=2,4 \text{ Hz}$, H_4); 7,63 (d, 1H, $J=2,4 \text{ Hz}$, H_5)	
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 17,5 (CH_2); 104,7 (C_4); 114,9 (CN); 130,2 (C_5); 142,0 (C_3)	
SM (DCI- NH_3) m/z 108,0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 16 %) 125,0 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 100 %)	
IR (CHCl_3) 1375 1414 1471 1534 2259 3197 cm^{-1}	

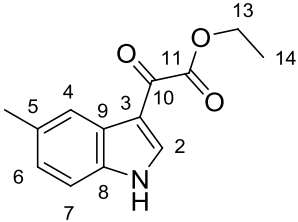
18	N° CAS 102737-63-8
	2-(1H-pyrazol-3-yl)acetic acid
$C_5H_6N_2O_2 \rightarrow M = 126,04 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Dissoudre le 17 (1,32 g, 12,3 mmol) dans une solution de soude 12N (7 mL). Chauffer à reflux 16 h, acidifier jusqu'à pH 2 et évaporer à sec. L'extraction à l'acétone permet d'obtenir le produit attendu sous forme d'une huile jaune (1,98 g, quantitatif).</p>	
RMN ^1H (300 MHz, D_2O) δ 3,97 (s, 2H, H_6); 6,63 (d, 1H, $J=2,7$ Hz, H_4); 8,01 (d, 1H, $J=2,7$ Hz, H_5)	
RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) δ 31,3 (C_6); 107,5 (C_4); 133,7 (C_5); 141,9 (C_3); 172,7 (CO)	
SM (DCI- NH_3) m/z 127,0 ($[M+H]^+$ 100 %) 144,0 ($[M+NH_4]^+$ 30 %)	
IR ($CHCl_3$) 1397 (C-O) 1718 (C=O) 2852 3128 (N-H) cm^{-1}	

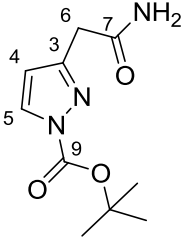
19	N° CAS 82668-50-6
	ethyl 2-(1H-pyrazol-3-yl)acetate
$C_7H_{10}N_2O_2 \rightarrow M = 154,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>18 (1,55 g, 12,3 mmol) est dissout dans l'éthanol absolu (100 mL) et la solution est saturée en acide chlorhydrique sec. Après une nuit sous agitation, le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le solide blanc obtenu est repris dans une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 (50 mL) puis extrait avec de l'éther éthylique. L'évaporation des phases organiques rassemblées fournit le produit attendu sous forme d'une huile jaune (850 mg, rdt 45 %)</p>	
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 1,25 (t, 1H, $J=7,1$ Hz, H_{10}); 3,74 (s, 2H, H_6); 4,17 (q, 2H, $J=7,1$ Hz, H_9); 6,25 (d, 1H, $J=1,7$ Hz, H_4); 7,54 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, H_5)	
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 14,0 (C_{10}); 33,4 (C_6); 61,1 (C_9); 105,0 (C_4); 132,7 (C_5); 141,9 (C_3); 170,5 (CO)	
SM (DCI- NH_3) m/z 155,0	
IR (CHCl_3) 769 1021 1180 1303 (C-O) 1374 1699 (C=O) 3248 (N-H) cm^{-1}	

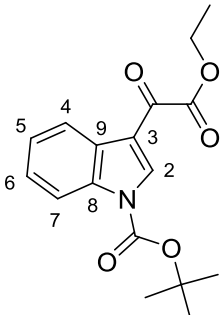
20	N° CAS 626605-59-2
	2-(1H-pyrazol-3-yl)acetamide
$C_5H_7N_3O \rightarrow M = 125,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
Additionner 19 (180 mg, 1,17 mmol) à l'ammoniaque 7N dans le méthanol et agiter 72 h. Après évaporation à sec, la cristallisation du produit attendu se fait à l'aide de CH_2Cl_2 (83,1 mg, rdt 57 %)	
RMN 1H (300 MHz, D_2O) δ 3,68 (s, 2H, H_6); 6,36 (s, 1H, H_4); 7,70 (s, 1H, H_5)	
RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) δ 34,4; 105,4; 131,2; 145,9; 176,3	
SM (DCI- NH_3) m/z 126,0 ($[M+H]^+$ 100 %) 143,0 ($[M+NH_4]^+$ 24 %)	
IR (KBr) 1162 1415 1623 1670 3198 3382 cm^{-1}	
Pf 146 °C	

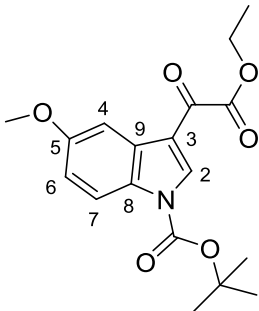
21a	51079-10-8
	ethyl 2-(1H-indol-3-yl)-2-oxoacetate
$C_{12}H_{11}NO_3 \rightarrow M = 217,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution d'indole (4 g, 34,2 mmol) dans de l'éther éthylique (155 mL) est ajouté goutte à goutte du chlorure d'oxalyle (3,84 mL, 44,4 mmol) sous atmosphère inerte. Après 4 h d'agitation, l'évaporation du solvant donne une poudre orange reprise dans de l'éthanol (75 mL). Après addition de triéthylamine (5,5 mL, 40,7 mmol), le milieu réactionnel est chauffé à reflux 5 h puis agité à température ambiante 12 h. Le produit attendu est isolé par filtration sous forme d'une poudre rose pâle (6,18 g, rdt 88 %)</p>	
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 1,48 (t, 3H, $J=7,2$ Hz); 4,45 (q, 2H, $J=7,2$ Hz); 7,34 (m, 2H); 7,45 (m, 1H); 8,45 (m, 1H); 8,49 (d, 1H, $J=3,3$ Hz)	
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 14,1; 62,1; 111,6; 114,4; 122,6; 123,5; 124,4; 126,2; 136,5; 162,8; 178,2	
SM (DCI- NH_3) m/z 218,0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 100 %) 235,1 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 49 %)	
IR (KBr) 1613 1630 1720 3429 cm^{-1}	
Pf 180 °C	

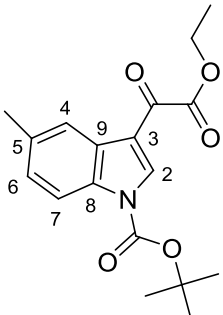
21b	14771-33-6
	ethyl 2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetate
$C_{13}H_{13}NO_4 \rightarrow M = 247,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
Même procédure que pour 21a avec 5-méthoxyindole (150 mg, 1,02 mmol), éther éthylique sec (5 mL), chlorure d'oxalyle (0,115 mL, 1,32 mmol), EtOH (2,5 mL), Et ₃ N (0,17 mL, 1,22 mmol). Le produit attendu est isolé par filtration sous forme d'une poudre jaune (235 mg, rdt 93 %)	
RMN ¹ H (300 MHz, Acétone-d ₆) δ 1,38 (t, 3H, J=7,1 Hz); 3,86 (s, 1H); 4,38 (q, 2H, J=7,1 Hz); 6,93 (dd, 1H, J=8,8Hz et J=2,5Hz); 7,47 (d, 1H, J=8,9 Hz); 7,83 (d, 1H, J=2,5 Hz); 8,37 (t, 1H, J=1,6Hz); 11,23 (sl, 1H)	
RMN ¹³ C (75 MHz, Acétone-d ₆) δ 13,9; 55,2; 61,5; 103,0; 112,2; 113,3; 113,4.; 126,3; 131,3; 138,0; 156,0; 163,3; 178,9	
SMHR (DCI-CH ₄) calculée pour C ₁₃ H ₁₂ NO ₄ : 248,0923 trouvée 248,0923	
IR (KBr) 1025 1129 1208 (C-O et C-N) 1475 1621 (C=C) 1721 (C=O) 3159 (NH) cm ⁻¹	
Pf 218 °C	

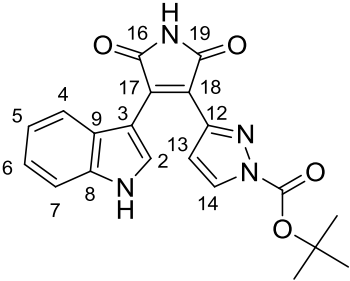
21c	
	ethyl 2-(5-methyl-1H-indol-3-yl)-2-oxoacetate
$C_{13}H_{13}NO_3 \rightarrow M = 231,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Même procédure que pour 21a avec 5-méthylindole (200 mg, 1,52 mmol) éther éthylique sec (7 mL), chlorure d'oxalyle (0,17 mL, 1,97 mmol) EtOH (3,5 mL) Et₃N (2,4 mL, 1,82 mmol). Le produit attendu est isolé par filtration sous forme d'une poudre blanche (340 mg, rdt 97 %)</p>	
<p>RMN ¹H (300 MHz, Acétone-d₆) δ 1,37 (t, 3H, J=7,1 Hz); 2,46 (s, 1H); 4,38 (q, 2H, J=7,2 Hz); 7,14 (dd, 1H, J=8,3 Hz et J=1,5 Hz); 7,45 (d, 1H, J=8,3 Hz); 8,12 (m, 1H); 8,38 (s, 1H); 11,24 (sl, 1H)</p>	
<p>RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 13,9; 21,2; 61,5; 111,9; 112,3; 120,8; 125,2; 125,7; 131,8; 134,9; 138,0; 163,6; 178,9</p>	
<p>SMHR (DCI-CH₄) calculée pour C₁₃H₁₄NO₃ : 232,0974 trouvée 232,0977</p>	
<p>IR 1135 1266 (C-N et C-O) 1429 1503 1610 (C=C) 1626 1723 (C=O) 3236 (NH) cm⁻¹</p>	
<p>Pf 202 °C</p>	

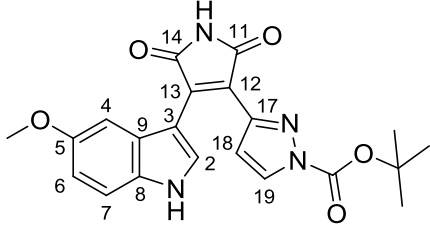
23	
	tert-butyl 3-(2-amino-2-oxoethyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate
$C_{10}H_{15}N_3O_3 \rightarrow M = 225,11 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>A une solution du composé 20 (750 mg, 6 mmol) dans CH_2Cl_2 anhydre (20 mL) est ajouté le di-terbutyl-di-carbonate (2.830 g, 13 mmol) et la diméthyleaminopyridine (15 mg, 0.12 mmol). Après 4h d'agitation, le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite pour donner une huile marron (1,5 g) utilisée sans purification pour l'étape suivante</p>	
RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.57 (s, 9H) 3.44 (s, 2H) 6.42 (d, 1H, $J=2.8\text{Hz}$) 8.15 (d, 1H, $J=2.8\text{Hz}$)	
RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 27.4; 35.2; 84.5; 109.4; 131.6; 147.1; 152.1; 170.4	
SM (DCI- CH_4) calculée pour $C_{10}H_{16}N_3O_3$ 226,1192 trouvée 226,1181	

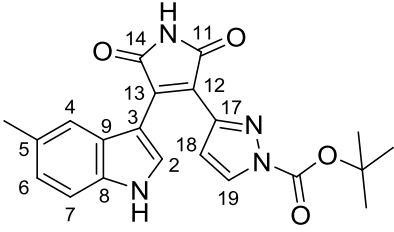
24a	
	tert-butyl 3-(2-ethoxy-2-oxoacetyl)-1H-indole-1-carboxylate
$C_{17}H_{19}NO_5 \rightarrow M = 317.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de 21a (500 mg, 2,30 mmol) dans CH_2Cl_2 anhydre (2 mL) est ajouté le di-terbutyl-di-carbonate (990 mg, 4,60 mmol) et la diméthyleaminopyridine (5,6 mg, 0,46 mmol). Après 30 minutes d'agitation, une solution d'HCl 1N (2 mL) est ajoutée au milieu réactionnel. La phase organique est récupérée, séchée sur $MgSO_4$ puis évaporée à sec pour donner le produit attendu sous la forme d'un solide rose pâle (670 mg, rdt 92 %).</p>	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.45 (t, 3H, $J=7.1\text{Hz}$) 1.71 (s, 9H) 4.44 (q, 2H, $J=7.1\text{Hz}$) 7.40 (m, 1H) 8.17 (m, 1H) 8.39 (m, 1H) 8.79 (s, 1H)	
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 13.6; 27.4 (3C tBu) 62.1; 86.0; 114.97; 115.00; 121.5; 124.6; 126.0; 126.7; 134.6; 137.1; 148.0; 161.5; 179.2	
SMHR (DCI- CH_4) calculée pour $C_{17}H_{19}NO_5$ 317,1263 trouvée 317,1265	
IR (KBr) 1141 1258 1365 (C-N et C-O) 1481 1543 (C=C) 1659 1723 1747 (C=O) cm^{-1}	
Pf 130 °C	

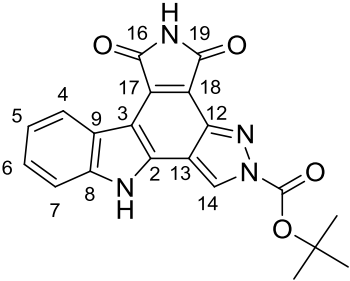
24b	
	tert-butyl 3-(2-ethoxy-2-oxoacetyl)-5-methoxy-1H-indole-1-carboxylate
$C_{18}H_{21}NO_6 \rightarrow M = 347.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Même procédure que pour le composé 24 a avec 21b (190 mg, 0,84 mmol), CH_2Cl_2 anhydre (2 mL), di-terbutyl-di-carbonate (370 mg, 1,68 mmol), diméthyleaminopyridine (2 mg, 0,017 mmol), HCl 1N (2 mL). Le produit attendu est obtenu sous la forme d'un solide jaune (270 mg, rdt 93 %).</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 1.41 (t, 3H, J=7.1Hz) 1.72 (s, 9H) 3.88 (s, 3H) 4.43 (q, 2H, J=7.1Hz) 7.06 (dd, 1H, J=2.6Hz, J=9.1Hz) 7.82 (d, 1H, J=2.6Hz) 8.08 (d, 1H, J=9.1Hz) 8.70 (s, 1H)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 15.3; 28.4 (3C tBu); 57.0; 63.8; 87.6; 106.0; 116.6; 117.9; 130.2; 131.7; 139.0; 148.6; 150.1; 159.5; 164.1; 181.6</p>	
<p>SMHR (DCI-CH_4) calculée pour $C_{18}H_{21}NO_6$ 347,1369 trouvée 347,1374</p>	
<p>IR (KBr) 1101 1147 1269 (C-O) 1368 1454 (CH_3) 1481 1587 (C=C) 1611 1662 1742 (C=O) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 164 °C</p>	

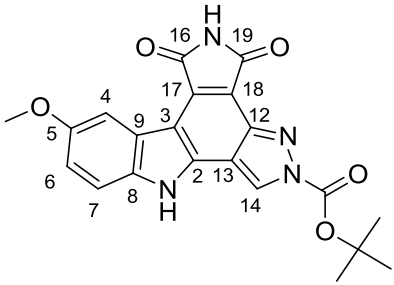
24c	
	tert-butyl 3-(2-ethoxy-2-oxoacetyl)-5-methyl-1H-indole-1-carboxylate
$C_{18}H_{21}NO_5 \rightarrow M = 331.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Même procédure que pour 24a avec 21c (530 mg, 2,3 mmol), CH_2Cl_2 anhydre (3 mL), di-terbutyl-di-carbonate (1,01 g, 4,6 mmol), diméthyleaminopyridine (5,6 mg, 0,46 mmol), HCl 1N (3 mL). Le produit attendu est obtenu sous la forme d'un solide blanc (760 mg, quantitatif)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 1,41 (t, 1H, $J=7,7$ Hz); 1,73 (s, 9H); 2,47 (s, 3H); 4,43 (q, 2H, $J=7,1$ Hz); 7,29 (dd, 1H, $J=8,6$ Hz, $J=1,7$ Hz); 8,07 (d, 1H, $J=8,6$ Hz); 8,12 (m, 1H); 8,69 (s, 1H)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) δ 15,3; 22,5; 29,1 (3C tBu); 63,8; 87,5; 116,7; 117,4; 123,6; 129,0; 129,3; 135,5; 136,2; 138,8; 150,4; 164,1; 181,5</p>	
<p>SMHR (DCI-CH_4) calculée pour $C_{18}H_{22}NO_5$ 332,1498 trouvée 332,1485</p>	
<p>IR (KBr) 1150 1264 1365 (C-N et C-O) 1457 1479 (C=C arom.) 1657 1725 1745 (C=O) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 186 °C</p>	

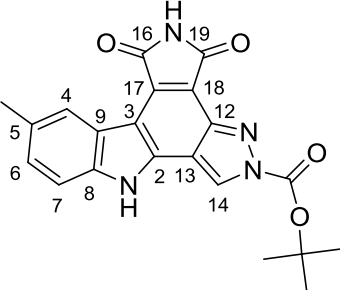
26a	
	<p>tert-butyl 3-(4-(1H-indol-3-yl)-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)-1H-pyrazole-1-carboxylate</p>
<p>$C_{20}H_{18}N_4O \rightarrow M = 378.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$</p>	
<p>A une solution du composé 23 (225 mg, 1,0 mmol) et du composé 24a (350 mg, 1,1 mmol) dans le THF (5 mL) est ajouté, à 0 °C, du tBuOK (336 mg, 3,0 mmol). Après 12 h d'agitation à température ambiante, de l'HCl 37 % (1,2 mL) et 10 mL d'AcOEt sont ajoutés au milieu réactionnel. La phase organique est récupérée, lavée à l'eau et évaporée à sec. La purification du brut par flash chromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) permet d'obtenir le produit attendu sous la forme d'un solide jaune (38 mg, rdt 10 %)</p>	
<p>RMN ¹H (300 MHz, Acétone-d₆) δ 1,69 (s, 9H); 6,79 (m, 1H); 6,95 (d, 1H, J=8,3 Hz); 7,09 (t, 1H, J=7,5 Hz); 7,33 (t, 1H, J=7,2 Hz); 7,84 (s, 1H); 8,10 (d, 1H, J=9,0 Hz); 8,20 (s, 1H); 11,25 (sl, 1H); 13,26 (sl, 1H)</p>	
<p>SM (DCI-NH₃) m/z 379,1 ([M+H]⁺ 100 %) 279,1 (13,5 %)</p>	
<p>IR (KBr) 1090 1150 1350 (C-N et C-O) 1454 1542 (C=C) 1642 1701 1730 (C=O) 3322 (NH) cm⁻¹</p>	

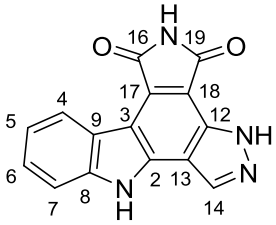
26b	
	tert-butyl 3-(4-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)-1H-pyrazole-1-carboxylate
$C_{21}H_{20}N_4O_5 \rightarrow M = 408,14 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Même procédure que pour le composé 26a avec 23 (131 mg, 0,58 mmol), 24b (222 mg, 0,64 mmol), tBuOK (195 mg, 1,74 mmol), THF (2 mL). Le brut réactionnel n'est pas purifié et est engagé tel quel dans l'étape suivante. Un échantillon est prélevé pour effectuer une analyse de masse afin de s'assurer de l'obtention de l'intermédiaire</p>	
SM (DCI-NH ₃) m/z 409,0 ([M+H] ⁺ 100 %)	

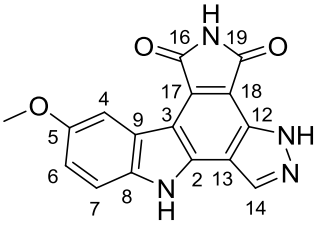
26c	
	tert-butyl 3-(4-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)-1H-pyrazole-1-carboxylate
$C_{21}H_{20}N_4O_5 \rightarrow M = 392,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Même procédure que pour le composé 26a avec 23 (171 mg, 0,76 mmol), 24b (171 mg, 0,84 mmol), tBuOK (255 mg, 2,28 mmol), THF (5 mL). Le brut réactionnel n'est pas purifié et est engagé tel quel dans l'étape suivante</p>	

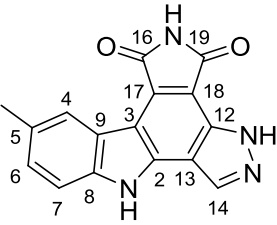
27a	
	
$C_{20}H_{16}N_4O_4 \rightarrow M = 376.12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Une solution de 26c (35 mg, 0,092 mmol) dans l'acétonitrile (20 mL) est irradiée à 350 nm, pendant 8 h. Après évaporation du solvant, le résidu est utilisé sans purification dans l'étape suivante. Un échantillon est prélevé pour effectuer une analyse de masse afin de s'assurer de l'obtention de l'intermédiaire</p>	
SMHR (DCI-CH ₄) calculée pour C ₂₀ H ₁₇ N ₄ O ₄ : 377,1250 trouvée 377,1238	

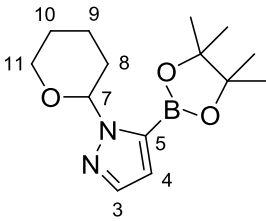
27b	
	
$C_{20}H_{16}N_4O_4 \rightarrow M = 376.12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Même procédure que pour le composé 27a avec 26b (30 mg, 0,74 mmol), acétonitrile (20 mL). Un échantillon est prélevé pour effectuer une analyse de masse afin de s'assurer de l'obtention de l'intermédiaire</p>	
SM (DCI-NH ₃) m/z 407,1 ([M+H] ⁺ 100 %) 424,1 ([M+NH ₄] ⁺ 23 %)	

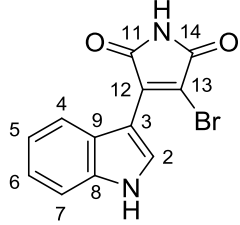
27c	
	<p>tert-butyl 8-methyl-4,6-dioxo-4,5,6,11-tetrahydro-2H-pyrazolo[4,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-2-carboxylate</p>
$C_{21}H_{18}N_4O_4 \rightarrow M = 390.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Même procédure que pour le composé 27a avec 26c (0,76 mmol), acétonitrile (15 mL). Le produit attendu est obtenu après purification sur flash chromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) sous forme d'un solide jaune (8,0 mg, rdt 3 %)</p>	
<p>RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1,79 (s, 9H); 7,40 (d, 1H, J=9,0 Hz); 8,03 (d, 1H, J=8,1 Hz); 8,79 (s, 1H); 8,91 (s, 1H); 11,37 (sl, 1H); 14,20 (sl, 1H)</p>	
<p>SM (DCI-NH₃) m/z 408,1 ([M+NH₄]⁺ 22 %) 391,1 ([M+H]⁺ 70 %) 308,0 ([M-BOC+NH₄]⁺ 100 %) 291,1 ([M-BOC+]⁺ 70 %)</p>	
<p>IR (KBr) 760 800 (C-H arom.) 1079 1223 1309 (C-N et C-O) 1492 1599 (C=C arom.) 1636 1708 1740 1757 (C=O amide et ester) 2980 3348 (NH) cm⁻¹</p>	

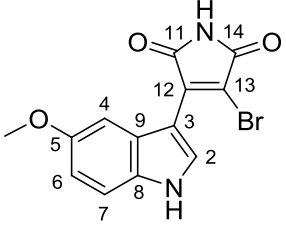
28a	
	3H-pyrazolo[4,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-4,6(5H,11H)-dione
$C_{15}H_8N_4O_2 \rightarrow M = 276.06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Méthode 1 : A une solution de 27a (9 mg, 0,023 mmol) dans du CH_2Cl_2 (1 mL) est ajouté du TFA (1 mL, 12,9 mmol). Après 4 h d'agitation, le milieu réactionnel est évaporé à sec puis repris par une solution saturée de $NaHCO_3$ (2 mL). Le produit attendu est isolé par filtration sous forme d'un solide jaune (6,0 mg, quantitatif)</p> <p>Une solution de 31a (21 mg, 0,058 mmol) dans l'acétonitrile (20 mL) est irradiée à 350 nm, pendant 8 h. Après évaporation du solvant, le résidu est repris par une solution de l'HCl 1M dans le MeOH (7 mL) et agité 2 h. Après évaporation, le résidu est purifié par flash chromatographie (Ether de pétrole/AcOEt 6:4) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide jaune (5 mg, rdt 31 %)</p>	
RMN 1H (300 MHz, Acétone- d_6) δ 7,34 (t, 1H, J=7,8 Hz); 7,51 (d, 1H, J=7,8 Hz); 7,69 (d, 1H, J=7,8 Hz); 8,55 (s, 1H); 8,90 (d, 1H, J=7,8 Hz)	

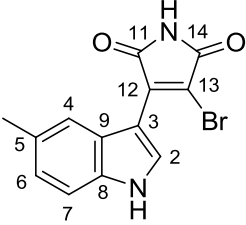
28b	
	8-methoxy-3H-pyrazolo[4,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-4,6(5H,11H)-dione
$C_{16}H_{10}N_4O_3 \rightarrow M = 306.06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Même procédure que pour le composé 27a avec 26b (0,58 mmol), acétonitrile (15 mL). Après plusieurs purifications par flash chromatographie ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95/5) le produit attendu est obtenu sous forme d'un solide jaune (5,0 mg, rdt 3 %)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 3,82 (s, 3H); 6,25 (d, 1H, $J=2,4$ Hz); 6,91 (dd, 1H, $J=9,0$ Hz et $J=2,4$ Hz); 7,96 (d, 1H, $J=9,0$ Hz); 8,13 (s, 1H); 11,24 (sl, 1H); 13,27 (sl, 2H)</p>	
<p>SM ($DCI-CH_4$) calculée pour $C_{16}H_{11}N_4O_3$: 307,0831 trouvée 307,0846</p>	

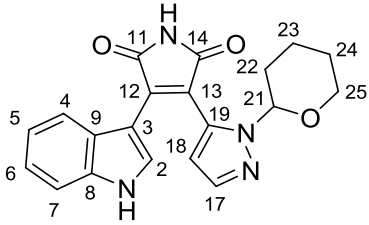
28c	
	8-methyl-3H-pyrazolo[4,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-4,6(5H,11H)-dione
$C_{16}H_{10}N_4O_2 \rightarrow M = 296.06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de 27c (5 mg, 0,013 mmol) dans du CH_2Cl_2 (1 mL) est ajouté du TFA (1 mL, 12,9 mmol). Après 4 h d'agitation, le milieu réactionnel est évaporé à sec puis repris dans une solution saturée de $NaHCO_3$ (2 mL). Le produit attendu est isolé par filtration sous forme d'un solide jaune (3,8 mg, quantitatif)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 2,50 (s, 3H); 7,31 (d, 1H, $J=8,7$ Hz); 7,56 (d, 1H, $J=8,7$ Hz); 8,53 (s, 1H); 8,67 (s, 1H); 11,06 (sl, 1H); 12,76 (sl, 1H); 14,07 (sl, 1H)</p>	

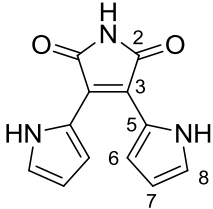
29	
	<p>1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazole</p>
$C_{14}H_{23}BN_2O_3 \rightarrow M = 278.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de pyrazole (6 g, 88 mmol) dans le toluène (10 mL) est ajouté du TFA (0,34 mL, 4,41 mmol). Le milieu réactionnel est porté à 80 °C puis du dihydropyran (8,5 mL, 92 mmol) est ajouté goutte à goutte en évitant une élévation de température. A la fin de l'addition, l'agitation est maintenue 1 h puis le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le brut est repris dans du THF sec (100 mL) et du nBuLi 1,6 M dans le THF, (57,8 mL, 92 mmol) est ajouté à -50 °C en 10 minutes. Après 10 minutes d'agitation, le B(OiPr)₃ (22,5 mL, 97 mmol) est ajouté en 5 minutes de façon à ce que la température ne s'élève pas au dessus de -30 °C. Après retour à température ambiante, du pinacol (11,5 g, 97 mmol) et de l'acide acétique (10 mL, 176 mmol) sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité pendant 12 h. Il est ensuite versé dans une solution saturée de NH₄Cl (100 mL) et d'éther de pétrole (120 mL). Après récupération de la phase organique et extraction de la phase aqueuse à l'éther de pétrole (3x150 mL), les phases organiques rassemblées sont lavées par une solution saturée de NaHCO₃, puis par une solution saturée de NaCl et sont séchées sur MgSO₄. Après évaporation, le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie (CH₂Cl₂) pour donner le produit attendu sur forme d'un solide jaune (13,1 g, rdt 53 %)</p>	
<p>RMN ¹H (300 MHz, Acétone-d₆) δ 1,31 (s, 12 H); 1,48-1,58 (m, 1H); 1,59-1,76 (m, 2H); 1,90-1,99 (m, 1H); 2,00-2,10 (m, 1H); 2,35-2,50 (m, 1H); 3,59-3,70 (m, 1H); 3,97-4,07 (m, 1H); 5,83 (dd, J=10,0 Hz et J=2,4 Hz, 1H); 6,72 (d, J=1,6 Hz, 1H); 7,58 (d, J=1,6 Hz, 1H)</p>	
<p>RMN ¹³C (75 MHz, Acétone-d₆) δ 24,5; 25,8; 26,2; 26,9; 30,9; 68,8; 85,7; 87,9; 117,7; 139,9</p>	
<p>SM (DCI NH₃) m/z 279.2 ([M+H]⁺)</p>	
<p>IR (KBr) cm⁻¹</p>	
<p>Pf 76 °C</p>	

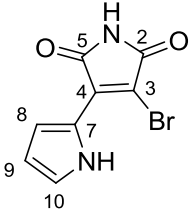
30a	125314-92-6
	3-bromo-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione
$C_{12}H_7BrN_2O_2 \rightarrow M = 289.97 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution d'indole (200 mg, 1,71 mmol) dans le THF (4 mL) est ajoutée goutte à goutte à -15°C, une solution de LiHMDS 1M dans le THF (5,13 mmol, 5,13 mL). Après 45 minutes d'agitation, une solution de dibromomaléimide (291 mg, 1,14 mmol) dans le THF (2 mL) est ajoutée. On laisse le milieu réactionnel revenir à température ambiante sous agitation pendant 12h. Il est ensuite versé à 0°C, dans de l'HCl 10 % (15 mL). La phase organique est récupérée et la phase aqueuse est extraite à l'AcOEt (3x20 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de NaHCO_3 puis une solution saturée de NaCl et séchées sur MgSO_4. Après évaporation, le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie (éther de pétrole/AcOEt : 9/1 \rightarrow 1/1) pour donner le produit attendu sous la forme d'un solide rouge (272 mg, rdt 82 %)</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 7,18 (td, 1H, $J=8,1 \text{ Hz}$ et $J=1,5 \text{ Hz}$); 7,25 (td, 1H, $J=8,1 \text{ Hz}$ et $J=1,5 \text{ Hz}$); 7,55 (m, 1H); 8,03 (dd, 1H, $J=7,9 \text{ Hz}$ et $J=0,6 \text{ Hz}$); 8,14 (d, 1H, $J=3,0 \text{ Hz}$); 10,10 (sl, 1H); 11,21 (sl, 1H)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) δ 103,6; 112,2; 114,5; 120,3; 122,2; 122,4; 124,4; 130,9; 136,4; 137,9; 167,4; 170,2</p>	
<p>SM (DCI-NH_3) 307.9/309.9 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (100 %))</p>	
<p>IR (KBr) 740 (C-Br) 123 1328 (C-N) 1489 1606 (C=C arom.) 1697 (C=O) 3330 (NH) cm^{-1}</p>	
<p>Pf $> 250^\circ\text{C}$ (décomposition)</p>	

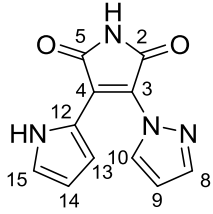
30b	125314-95-6
	3-bromo-4-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione
$C_{13}H_9BrN_2O_3 \rightarrow M = 319.98 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Même procédure que pour le composé 30b avec 5-méthoxyindole (172 mg, 1,17 mmol), THF (4 mL), LiHMDS 1M dans le THF (3,5 mmol, 3,5 mL), dibromomaléimide (200 mg, 0,78 mmol), THF (2 mL), HCl 10 % (8 mL) à 0 °C. AcOEt (3x10 mL). Le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie (éther de pétrole/AcOEt 9/1 \rightarrow 1/1) pour donner le produit attendu sous la forme d'un solide rouge (200 mg, rdt 80 %)</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 3,87 (s, 3H); 6,92 (dd, 1H, $J=8,9$ Hz et $J=2,4$ Hz); 7,47 (d, 1H, $J=8,9$ Hz); 7,58 (d, 1H, $J=2,4$ Hz); 8,13 (m, 1H); 10,09 (sl, 1H); 11,14 (sl, 1H)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) δ 55,1; 103,5; 104,4; 112,2; 112,9; 113,6; 125,1; 131,3; 138,0; 154,0; 167,7; 170,5</p>	
<p>SM (DCI-NH_3) 337.9/339.9 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (100 %))</p>	
<p>IR 486 (C-Br), 1490, 1614 (C=C), 1727, 1775 (C=O), 3171 (C-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf > 250 °C (décomposition)</p>	

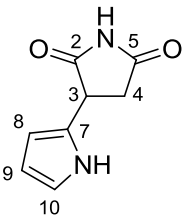
30c	
	3-bromo-4-(5-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione
$C_{13}H_9BrN_2O_2 \rightarrow M = 303.98 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Même procédure que pour le composé 30a avec 5-methylindole (154 mg, 1,17 mmol), THF (4 mL), LiHMDS 1M dans le THF (3,5 mmol, 3,5 mL), dibromomaléimide (200 mg, 0,78 mmol), THF (2 mL), HCl 10% (8 mL), AcOEt (3 x 10 mL), Le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie (éther de pétrole/AcOEt 90/10 \rightarrow 50/50) pour donner le produit attendu sous la forme d'un solide rouge (161 mg, rdt 68 %)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 2.44 (s, 3H) 7.08 (d, 1H, J=8.3Hz) 7.43 (d, 1H, J=8.3Hz) 7.83 (s, 1H) 8.09 (s, 1H) 10.08 (sl, 1H) 11.09 (sl, 1H)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) δ 21.4; 103.2; 111.9; 114.1; 121.8; 123.9; 124.7; 129.0; 130.9; 134.7; 138.1; 167.4; 170.1</p>	
<p>SMHR (DCI-CH_4) calculée pour $C_{13}H_{10}BrN_2O_2$ 304,9926 trouvée 304,9921</p>	
<p>IR 491 (C-Br), 1478, 1596 (C=C), 1714, 1773 (C=O), 2915 (C-H), 3306 (NH) cm^{-1}</p>	
<p>Pf > 250 °C (Décomposition)</p>	

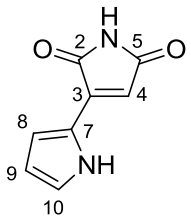
31a	
	<p>3-((1H-indol-3-yl)-4-(1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazol-5-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione</p>
$C_{20}H_{18}N_4O_3 \rightarrow M = 362.14 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>A une solution de composé 30a (50 mg, 0,17 mmol) dans le toluène (4 mL), sont ajoutés, sous atmosphère inerte, le composé 29 (52,5 mg, 0,19 mmol) et le palladium tetrakis(triphénylphosphine) (10 mg, 9 μmol) puis le NaHCO_3 (28,6 mg, 0,34 mmol) en solution dans l'éthanol (2 mL). Le milieu réactionnel est alors dégazé avant d'être chauffé à reflux 12 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau (5 mL) puis extrait à l'AcOEt (3x15 mL). Les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO_4 puis évaporées à sec. Le brut obtenu est purifié par flash chromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide orange (20,5 mg, rdt 34 %)</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 1,13-1,46 (m, 4H); 1,78-1,87 (m, 1H); 2,10-2,20 (m, 1H); 3,31-3,41 (m, 1H); 3,70-3,80 (m, 1H); 5,17-5,25 (m, 1H); 6,39 (d, 1H, $J=1,7$ Hz); 6,61 (d, 1H, $J=8,1$ Hz); 6,81 (ddd, 1H, $J=8,1$ Hz, $J=7,1$ Hz et $J=1,0$ Hz); 7,13 (ddd, 1H, $J=8,2$ Hz, $J=7,1$ Hz et $J=1,1$ Hz); 7,49 (d, 1H, $J=8,2$ Hz); 7,56 (d, 1H, $J=1,5$ Hz); 8,19 (d, 1H, $J=3,0$ Hz); 9,98 (sl, 1H); 11,20 (sl, 1H)</p>	
<p>RMN ^{13}C (125 MHz, Acétone-d_6) 24,2; 25,9; 26,2; 26,8; 68,8; 75,8; 87,0; 107,5; 111,6; 113,8; 122,6; 123,1; 124,6; 126,8; 133,7; 135,3; 138,8; 140,7; 172,6; 173,0</p>	
<p>SM (DCI-CH_4) calculée pour $C_{20}H_{18}N_4O_3$: 362,1379 trouvée 362,1398</p>	

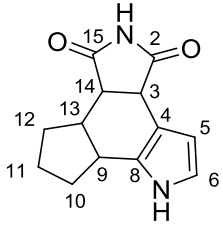
33	
	3,4-di(1H-pyrrol-2-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione
$C_{12}H_9N_3O_2 \rightarrow M = 227,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de pyrrole (421 μL, 6,5 mmol) dans du toluène anhydre (10 mL) est ajoutée à température ambiante, sous atmosphère inerte, une solution commerciale d'EtMgCl 3M dans le THF (2,17 mL, 6,5 mmol). Après 45 minutes d'agitation à 45 °C, une solution de dibromomaléimide (370 mg, 1,45 mmol) dans du toluène anhydre (10 mL) est ajoutée. Après 12 h d'agitation à reflux, le milieu est dilué avec 20 mL d'AcOEt puis lavé successivement avec une solution aqueuse d'HCl 1N (40 mL), de l'eau (40 mL) et une solution saturée de NaCl (40 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée. La purification du brut sur colonne de silice (Ether de pétrole/AcOEt 7/3 \rightarrow 1/1) donne le produit attendu sous forme d'un solide rouge foncé (53 mg, rdt 16 %)</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 6,22 (td, 2H, $J=3,7$ Hz et $J=2,4$ Hz); 6,84 (ddd, 2H, $J=3,8$ Hz, $J=2,5$Hz et $J=1,4$Hz); 7,03 (dt, 2H, $J=2,7$ Hz et $J=1,4$ Hz); 10,97 (sl, 1H); 11,12 (sl, 2H)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) δ 109,5; 113,0; 120,2; 121,2; 122,9; 172,6</p>	
<p>SM (DCI-CH_4) calculée pour $C_{12}H_{10}N_3O_2$: 228,0773 trouvée 228,0779</p>	
<p>IR (KBr) 1406 1608 (C=C arom.) 1702 (C=O) 3220 3368 3387 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 210 °C</p>	

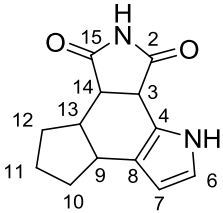
34	253161-42-1
	3-bromo-4-(1H-pyrrol-2-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione
$C_8H_5Br_2N_2O_2 \rightarrow M = 239.95 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de pyrrole (1 g, 14,9 mmol) dans le toluène sec (35 mL) est ajoutée goutte à goutte, à -15°C, une solution de LiHMDS 1M dans le toluène (45 mmol, 45 mL). Après 45 minutes d'agitation, une solution de dibromomaléimide (2,53 g, 9,95 mmol) dans le THF sec (17 mL) est ajoutée. On laisse le milieu réactionnel revenir à température ambiante en 12 h. Il est ensuite versé à 0°C dans de l'HCl 10 % (150 mL). La phase organique est récupérée et la phase aqueuse est extraite à l'AcOEt (4 x 100 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de NaHCO_3 puis une solution saturée de NaCl et séchées sur MgSO_4. Après évaporation du solvant, le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1/0 \rightarrow 97/3) pour donner le produit attendu sous la forme d'un solide marron (1,30 g, rdt 55 %)</p>	
<p>RMN ^1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 6,44 (td, 1H, $J=3,9$ Hz et $J=2,5$ Hz); 7,32 (dt, 1H, $J=3,0$ Hz et $J=1,4$ Hz); 7,47 (ddd, 1H, $J=3,9$ Hz, $J=2,5$Hz et $J=1,4$ Hz)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone-d_6) δ 112,8; 112,9; 118,7; 123,5; 127,5; 132,0; 168,2; 172,4</p>	
<p>SM (DCI-NH_3) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 257,9 et 259,9</p>	
<p>IR (KBr) 495 (C-Br) 1114 1337 (C-N) 1453 1605 (C=C) 1725 1768 (C=O) 3229 3365 (NH) cm^{-1}</p>	
<p>Pf $> 250^\circ\text{C}$</p>	

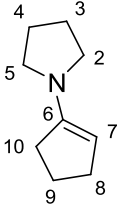
37	
	3-(1H-pyrazol-1-yl)-4-(1H-pyrrol-2-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione
$C_{11}H_8N_4O_2 \rightarrow M = 228,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Un tube scellé contenant une suspension de composé 34 (50 mg, 0,21 mmol) dans le DMF (0,2 mL), du CuI (7,6 mg, 0,04 mmol), de la 1-10 phénanthroline (15 mg, 0,8 mmol) et du Cs_2CO_3 (270 mg, 0,83 mmol) est chauffé à 90 °C, pendant 12 h. Une solution aqueuse de NH_4Cl 10 % (5 mL). Le milieu réactionnel est extrait à l'AcOEt (3x10 mL). Les phases organiques sont Après séchées sur $MgSO_4$. L'évaporation du solvant donne le produit sous la forme d'un solide marron (38 mg, rdt 80 %)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, Acétone-d_6) δ 6,36 (td, 1H, $J=3,8$ Hz et $J=2,4$ Hz); 6,66 (dd, 1H, $J=2,7$ Hz et $J=1,9$Hz); 7,23 (m, 1H); 7,51 (ddd, 1H, $J=3,8$ Hz, $J=2,3$Hz et $J=1,4$Hz); 8,01 (dd, 1H, $J=1,9$ Hz et $J=0,5$Hz); 8,70 (dd, 1H, $J=2,7$ Hz et $J=0,6$ Hz); 10,03 (s, 1H) 12,94 (s, 1H)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) δ 107,8; 111,0; 117,0; 120,5; 121,8; 125,0; 132,7; 141,8; 167,7; 169,9</p>	
<p>SM (DCI-CH_4) calculée pour $C_{11}H_9N_4O_2$: 229,0726 trouvée 229,0727</p>	
<p>IR (KBr) 748 1047 1429 1630 (C=C arom. ou C=N) 1704 1766 (C=O) 3224 3444 (N-H) cm^{-1}</p>	
<p>Pf 214 °C</p>	

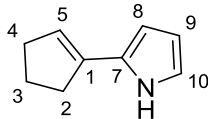
39	
	3-(1H-pyrrol-2-yl)pyrrolidine-2,5-dione
$C_8H_8N_2O_2 \rightarrow M = 164,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de composé 34 (210 mg, 0,87 mmol) dans du méthanol (16,7 mL) est ajouté du Pd/C (210 mg). Le milieu est saturé en H₂ puis agité pendant 2 h. Après filtration sur célite, le brut est purifié par flash chromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 99:1) pour donner le produit sous forme d'un solide marron (114 mg, rdt 80%).</p>	
<p>RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,06 (dd, 1H, J=18,4 Hz et J=5,7Hz); 3,21 (dd, 1H, J=18,3 Hz et J=9,2Hz); 4,13 (dd, 1H, J=8,9 Hz et J=5,6 Hz); 6,02 (ddd, 1H, J=4,8 Hz, J=2,7 Hz et J=1,4 Hz); 6,18 (dd, 1H, J=6,2 Hz et J=2,7 Hz); 6,80 (dt, 1H, J=3,0 Hz et J=1,0Hz); 8,67 (sl, 1H); 9,07 (sl, 1H)</p>	
<p>RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 35,4; 39,9; 105,8; 108,4; 118,9; 124,9; 176,4; 178,4</p>	
<p>SM (DCI-NH₃) 164,9 [M+H]⁺ (73) 182,0 [M+NH₄]⁺ (100)</p>	
<p>IR (KBr) 726 1191 1687 (C=O) 3360 (N-H) cm⁻¹</p>	
<p>Pf > 250 °C</p>	

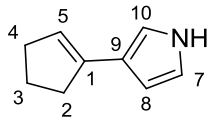
40	1159426-85-3
	3-(1H-pyrrol-2-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione
$C_8H_6N_2O_2 \rightarrow M = 162,04 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de composé 39 (110 mg, 0,67 mmol) dans du chloroforme (6,6 mL) est ajouté du dioxyde de manganèse (494 mg, 5,68 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux durant 2 h. Après filtration, le brut obtenu est purifié par flash chromatographie sur silice ($CH_2Cl_2/MeOH$ 99:1) pour donner le composé attendu sous la forme d'un solide blanc (10 mg, rdt 9%).</p>	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6,51 (m, 1H); 6,58 (s, 1H); 7,84 (d, 1H, $J=1,5$ Hz); 8,62 (d, 1H, $J=2,7$ Hz)	
SM (DCI- NH_3) 179.0 ($[M+NH_4]^+$ 100 %)	

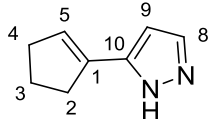
41a	
	6a,6b,7,8,9,9a-hexahydro-1H-cyclopenta[g]pyrrolo[3,4-e]indole-4,6(3bH,5H)-dione
$C_{13}H_{14}N_2O_2 \rightarrow M = 230,26 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Un mélange de composé 45b (0,5 g, 3,7 mmol) et de maléimide (0,73 g, 7,5 mmol) est chauffé à 190°C sous N₂ pendant 3 h. Après retour à température ambiante, le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 99:1) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide orange (15 mg, rdt 2 %)</p>	
<p>RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1,10 (m, 1H); 1,40 (m, 4H); 1,83 (m, 1H); 2,08 (m, 1H); 3,05 (t, 1H, J=2,7 Hz, H₄); 3,28 (dd, 1H, J=8,1 Hz et J=6,0 Hz, H₁₂); 3,85 (dd, 1H, J=8,4 Hz et J=1,8 Hz, H₁₁); 6,02 (t, 1H, J=2,4 Hz); 6,62 (t, 1H, J=2,4 Hz)</p>	
SM (IC) 231 ([M+H] ⁺ 100 %)	
IR (CHCl ₃) 1210 1412 1699 1768 2963 3369 cm ⁻¹	

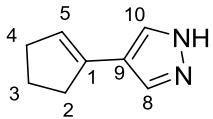
41b	
	4,5,6,6a,8,9a-hexahydro-1H-cyclopenta[e]pyrrolo[3,4-g]indole-7,9(3bH,6bH)-dione
$C_{13}H_{14}N_2O_2 \rightarrow M = 230,11 \text{ g.mol}^{-1}$	
<p>Même procédure que pour le composé 41a avec 45b (77 mg, 0,6 mmol) maléimide (0,11 g, 1,2 mmol) est chauffé à 190°C sous N₂ durant 3 heures. Le brut est purifié par flash chromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 99:1) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide orange (20 mg, rdt 46 %)</p>	
RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) δ 1,2–2,2 (m, 6H); 2,66 (m, 1H, H ₅); 3,09 (t, 1H, J=5,4 Hz, H ₄); 3,50 (dd, 1H, J=9,7 Hz et J=6,3 Hz, H ₁₂); 3,92 (dd, 1H, J=9,7 Hz et J=1,2 Hz, H ₁₁); 6,05 (t, 1H, J=2,7 Hz); 6,78 (t, 1H, J=2,7 Hz, H ₈)	
RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) δ 21,4; 24,2; 31,1; 36,8; 37,9; 40,2; 42,8; 105,9; 118,7; 120,4; 134,4; 177,4; 178,8	
SM (IC) m/z 231.1 ([M+H] ⁺)	
IR (CHCl ₃) 1341 1707 1773 2958 3269 cm ⁻¹	

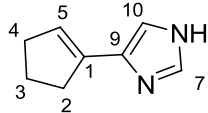
43	N° CAS 7148-07-4
	1-cyclopentenylpyrrolidine
$C_9H_{15}N \rightarrow M = 137,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de cyclopentanone (30 g, 350 mmol) dans le toluène (110 mL) est ajoutée sous N_2, de la pyrrolidine (30 mL, 367 mmol) ainsi que quelques cristaux d'APTS. Cette solution jaunâtre est chauffée à 130 °C pendant 2 h avec un appareil de Dean-Stark. Après évaporation du toluène, le produit attendu est obtenu sous forme d'une huile jaune par distillation sous une pression de 13 mBar, t_{eb} 80 °C (36,94 g, rdt 77 %)</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3-d_3$) δ 1,82 (m, 4H); 2,13 (m, 2H); 2,51 (m, 2H); 2,61 (m, 2 H); 3,04 (m, 4H); 4,02 (sl, 1H)</p>	
<p>IR ($CHCl_3$) 1386 1630 1747 2949 3061 cm^{-1}</p>	

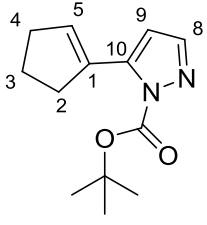
45a	N° CAS 374071-79-1
	2-cyclopentenyl-1H-pyrrole
$C_9H_{11}N \rightarrow M = 133,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Un mélange de composé 43 (3,6 g, 26 mmol) et de pyrrole (3,49 g, 52 mmol) est chauffé à 145 °C sous agitation pendant 5 h. Après évaporation sous vide, une distillation Kugelrohr (115 °C, 1 mbar) du brut conduit à un solide blanc dont la purification par flash chromatographie sur silice (EP/AcOEt 9:1) donne le produit sous la forme d'un solide marron (645 mg, rdt 26 %)</p>	
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 1,98 (quint, 2H, $J=7,2$ Hz); 2,50 (m, 2H); 2,64 (m, 2H); 5,72 (m, 1H); 6,16 (m, 1H); 6,19 (m, 1H); 6,75 (m, 1H)	
SM (DCI- CH_4) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 227	
IR (CHCl_3) 1404 1634 1713 2959 3343 cm^{-1}	

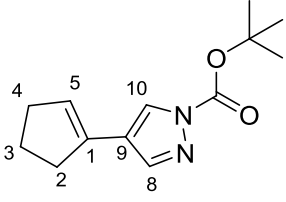
45b	N° CAS 374071-80-4
	3-cyclopentenyl-1H-pyrrole
$C_9H_{11}N \rightarrow M = 133,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
Même procédure que pour le composé 45a avec 43 (3,6 g, 26 mmol), pyrrole (3,49 g, 52 mmol). La purification par flash chromatographie sur silice (EP/AcOEt 9:1) donne le produit sous la forme d'un solide marron (155 mg, rdt 5 %).	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,97 (quint, 2H, $J=7,8$ Hz); 2,43-2,51 (m, 2H); 2,57-2,63 (m, 2H); 5,83 (m, 1H); 6,38 (m, 1H); 6,75 (m, 1H); 6,76 (m, 1H)	
SM (IC) m/z 277 ($[M+H]^+$)	
IR ($CHCl_3$) 1342 1420 1497 1637 1715 2954 3358 cm^{-1}	

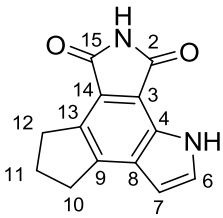
46a	
	5-cyclopentenyl-1H-pyrazole
$C_8H_{10}N_2 \rightarrow M = 134,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Un mélange de composé 43 (3,75 g, 27 mmol) et de pyrazole (3,72 g, 54 mmol) est chauffé à 145 °C sous agitation pendant 5 h. Ce brut est purifié par flash chromatographie sur silice ($CH_2Cl_2/MeOH$ 99:1) pour donner le composé 46a sous la forme d'une huile marron (90 mg, rdt 3 %) et le composé 46b</p>	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,98 (quint, 2H, $J = 8,1 \text{ Hz}$, H_2); 2,49 (m, 2H); 2,57 (m, 2H); 6,21 (dd, 1H, $J = 2,4 \text{ Hz}$ et $J = 1,8 \text{ Hz}$, H_5); 7,50 (dd, 1H, $J = 2,4 \text{ Hz}$ et $J = 0,6 \text{ Hz}$); 7,56 (dd, 1H, $J = 2,4 \text{ Hz}$ et $J = 0,6 \text{ Hz}$)	
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 23,4 28,0 33,0 112,6 124,2 134,6 136,0 139,9.	
SM (EI) m/z 135 ($[M+H]^+$)	
IR ($CHCl_3$) 1638 1703 2956 3389 cm^{-1}	

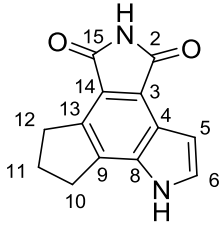
46b	
	4-cyclopentenyl-1H-pyrazole
$C_8H_{10}N_2 \rightarrow M = 134,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
huile marron (40 mg, rdt 2 %).	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,98 (quint, 2H, $J=7,5$ Hz, H_2); 2,48 (m, 2H, H_3); 2,60 (m, 2 H_1); 5,90 (m, 1H); 7,61 (s, 2H, H_7/H_{10})	
SM (EI) m/z 135 ($[M+H]^+$)	
IR ($CHCl_3$) 1397 1645 1722 2977 3152 cm^{-1}	

47	
	4-cyclopentenyl-1H-imidazole
$C_8H_{10}N_2 \rightarrow M = 134,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>Un mélange de composé 43 (4 g, 29 mmol) et d'imidazole (3,97 g, 58 mmol) est chauffé à 145 °C sous agitation pendant 5 h. Après concentration à 15 mBar, le produit est purifié par flash chromatographie sur silice ($CH_2Cl_2/MeOH : 97/3$) pour donner le produit attendu sous forme d'une huile marron (4 mg, rdt 1 %).</p>	
<p>RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,01 (quint, 2H, $J=7,2$ Hz, H_2); 2,51 (m, 2H); 2,62 (m, 2H); 6,22 (m, 1H, H_5); 6,92 (d, 1H, $J=1,2$ Hz, H_{10}); 7,59 (d, 1H, $J=1,2$ Hz, H_8)</p>	
<p>RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 23,7 34,0 34,9 128,0 128,9 131,1 138,3 157,5</p>	
<p>SM (EI) m/z 135 ($[M+H]^+$)</p>	
<p>IR ($CHCl_3$) 1510 1637 1700 2958 3389 cm^{-1}</p>	

53a	
	tert-butyl 5-cyclopentenyl-1H-pyrazole-1-carboxylate
$C_{13}H_{18}N_2O_2 \rightarrow M = 230,11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution d'un mélange des composés 46a et 46b (0,6 g, 4,4 mmol) dans du THF (15 mL), est ajouté à 0 °C, sous N₂, du NaH 60 % en suspension dans de l'huile (0,15 g, 6,4 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 5 min puis du Boc₂O (1,4 g, 6,4 mmol) est ajouté. L'agitation est continuée pendant 30 min et de l'éthanol (7 mL), du CH₂Cl₂ (25 mL) et de l'eau (25 mL) sont ajoutés. La phase organique est récupérée puis lavée à l'eau (3x25 mL). Après séchage sur MgSO₄ et évaporation du solvant, le brut est purifié par flash chromatographie sur silice (EP/CH₂Cl₂ 8:2) pour donner le produit 53 a sous forme d'une huile jaune (123 mg, rdt 11 %) et le composé 53b</p>	
RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) δ 1,10 (m, 1H); 1,40 (m, 4H); 1,83 (m, 1H); 2,08 (m, 1H); 3,05 (t, 1H, J=2,7 Hz, H ₄); 3,28 (dd, 1H, J=8,1 Hz et J=6,0 Hz, H ₁₂); 3,85 (dd, 1H, J=8,4 Hz et J=1,8 Hz, H ₅); 6,02 (t, 1H, J=2,4 Hz); 6,62 (t, 1H, J=2,4 Hz)	
SM (IC) m/z 235 ([M+H] ⁺)	
IR (CHCl ₃) 1372 1557 1747 2968 cm ⁻¹	

53b	
	tert-butyl 4-cyclopentenyl-1H-pyrazole-1-carboxylate
$C_{13}H_{18}N_2O_2 \rightarrow M = 234,14 \text{ g.mol}^{-1}$	
huile jaune. (28 mg, rdt 3 %)	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,64 (s, $9H_{Boc}$); 1,98 (quint, 2H, $J=7,5 \text{ Hz}$, H_2); 2,48 (m, 2H, H_3); 2,56 (m, 2H, H_1); 6,38 (dd, 1H, $J=2,7 \text{ Hz}$ et $J=1,5 \text{ Hz}$, H_5); 7,71 (m, 1H); 8,10 (m, 1H)	
SM (IC) m/z 235 ($[M+H]^+$)	
IR ($CHCl_3$) 1372 1557 1756 2980 3142 cm^{-1}	

54a	
	8,9-dihydro-1H-cyclopenta[g]pyrrolo[3,4-e]indole-4,6(5H,7H)-dione
$C_{13}H_{10}N_2O_2 \rightarrow M = 226,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
<p>A une solution de composé 51a (237 mg, 1,03 mmol) dans du toluène (20 mL) est ajouté du DDQ (467 mg, 2,06 mmol). Le milieu réactionnel rouge est agité à température ambiante pendant 22 h. Après évaporation du solvant, le brut est purifié par flash chromatographie sur silice (EP/AcOEt 7:3) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide jaunâtre (9 mg, rdt 2%).</p>	
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 2,31 (quint, 2H, $J = 7,5 \text{ Hz}$, H_2); 3,17 (t, 2H, $J = 6,9 \text{ Hz}$); 3,30 (t, 2H, $J = 7,5 \text{ Hz}$); 6,58 (dd, 1H, $J = 3,3 \text{ Hz}$ et $J = 2,1 \text{ Hz}$, H_8); 7,47 (t, 1H, $J = 3,3 \text{ Hz}$, H_9)	
SM (IC) m/z 227 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)	
IR (CHCl_3) 1694 2922 3269 cm^{-1}	

54b	N° CAS 374070-95-8
	5,6-dihydro-1H-cyclopenta[e]pyrrolo[3,4-g]indole-7,9(4H,8H)-dione
$C_{13}H_{10}N_2O_2 \rightarrow M = 226,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	
Même procédure que pour le composé 54a avec 51b (20 mg, 0,09 mmol), toluène (2 mL), DDQ (22 mg, 0,09 mmol). Agitation 30 h. Après purification par flash chromatographie sur silice ($CH_2Cl_2/MeOH$ 97:3) le produit attendu est obtenu sous forme de solide jaune (9 mg, rdt 45 %)	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,31 (quint, 2H, $J=7.5$ Hz, H_2); 3,17 (t, 2H, $J=7,5$ Hz, H_3); 3,30 (t, 2H, $J=7,5$ Hz); 6,58 (dd, 1H, $J=3,3$ Hz et $J=1,8$ Hz, H_8); 7,47 (t, 1H, $J=3,3$ Hz, H_7)	
RMN ^{13}C (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ 25,0; 30,0; 30,8; 100,7; 121,8; 128,4; 130,6; 130,8; 131,1 (2C); 142,9; 169,8; 170,9	
SM (IC) m/z 227 ($[M+H]^+$ 86%) 244 ($[M+NH_4]^+$ 100%)	
IR ($CHCl_3$) 1694 2922 3269 cm^{-1}	

Partie expérimentale pour les évaluations biologiques

1) Test de prolifération cellulaire

Au cours de ces tests, 7 lignées cellulaires de diverses origines ont été utilisées :

- A549 cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC)
- HS683 oligodendrogliome (cancer du cerveau)
- LoVo cancer du colon
- OE21 cancer de l'œsophage
- PC-3 cancer de la prostate
- U373 glioblastome (cancer du cerveau)
- MCF-7 cancer du sein

Le test colorimétrique indirect MTT a été réalisé selon le protocole suivant : les cellules sont ensemencées dans des micro-plaques de 96 puits à fond plat avec 100 μL de suspension cellulaire à raison de 1000 à 8000 cellules par puits selon le type de cellule utilisée. Un milieu de culture adapté à chaque lignée cellulaire a été utilisé.

Après 24 h d'incubation à 37 °C, le milieu de culture est remplacé par 100 μL de milieu frais contenant des concentrations croissantes de produit à analyser allant de 10^{-8} à 10^{-4} M. Chaque expérience a été réalisée en sextuplicat (6 fois).

Après 72 h d'incubation à 37 °C en présence des composés à tester (conditions expérimentales) ou sans (conditions de contrôle), le milieu est remplacé par 100 μL de réactif MTT dissous dans du RPMI 1640 sans rouge phénol à une concentration de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les micro-plaques sont alors incubées pendant 3h30 à 37 °C puis centrifugées à 1300 rotations par minute (rpm). Le MTT est alors éliminé et les cristaux de formazan sont dissous dans 100 μL de DMSO. Les micro-plaques sont ensuite agitées pendant 5 minutes puis l'absorbance du milieu est mesurée par spectrophotométrie UV-Vis à 570 nm, longueur d'onde d'absorption maximale du formazan (appareil microplate Reader, Bio-Rad).

La visualisation directe des effets des composés testés a été réalisée par vidéomicroscopie en utilisant un microscope en contraste de phase assisté par ordinateur.

2) Videomicroscopie Quantitative

La lignée cellulaire utilisée est le modèle U373 car c'est un modèle qui résiste à divers types de stimuli pro-apoptotiques tout comme les cancers de l'œsophage, les mélanomes, le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) ainsi que les cancers métastatiques.

La vidéomicroscopie assistée par ordinateur permettant de visionner le devenir des cellules traitées (ou non – contrôle) pendant toute la durée de l'expérience, les cellules sontensemencées dans des flasques de 25 cm² et placées sous des microscopes qui sont reliés à des ordinateurs. Un logiciel permet de numériser l'image transmise par le microscope chaque 4 minutes pendant les 72 heures et constitue à la fin de l'expérience un film en accéléré d'1 minute (avec les 1080 images numérisées en 72 hrs).

1) Inhibition du checkpoint G2

Ce test a été réalisé sur des cellules U2OS (Osteosarcome humain), cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) avec 10 % de sérum et des antibiotiques (Serum de veau fœtal, avec Pénicilline et streptomycine). La veille de l'expérience, les plaques 6 puits à fond plat sontensemencées à raison de 300 000 cellules/puits, le nombre exact de cellules est déterminé par comptage, puis incubées 24 h dans l'étuve de culture cellulaire (37 °C, 5 % CO₂, humidité saturante).

Après ce délai, les cellules sont traitées, grâce à un renouvellement du milieu, par l'étoposide (agent génotoxique) à une concentration de 40 µM (concentration largement supérieure à son IC₅₀), puis incubées 1 h. S'en suit un lavage des cellules avec un tampon phosphate salin (PBS) afin d'éliminer toute trace d'étoposide. Un mélange de milieu de culture identique à celui utilisé précédemment contenant l'analogue à tester en solution dans du DMSO et du nocodazole (agent de dépolymérisation de la tubuline qui bloque les cellules en mitose) à une concentration de 200 ng.mL⁻¹, est ajouté.

Les plaques sont alors incubées 16 h dans l'étuve de culture cellulaire. L'addition de trypsine permet de décrocher les cellules des parois des puits, ces dernières sont alors centrifugées pour enlever le milieu. Elles sont ensuite fixées dans de l'éthanol froid à 70 % puis conservées à -20 °C.

En dernier lieu vient la détermination de l'index mitotique par analyse FACS (appareillage Facscalibur – Becton Dickinson). Pour cela, les cellules fixées sont marquées à l'aide d'un anticorps anti-mitose (anti-phospho Ser 10 Histone H3 ou l'anticorps 3.12.I.22 élaboré par

l'équipe du Dr. B. Ducommun) alors que l'ADN est coloré avec l'intercalant iodure de propidium.

Partie expérimentale pour les études *in silico*

Structures cristallographiques des enzymes

Les coordonnées cristallographique de l'ensemble des complexes ligand/protéine utilisés pour cette étude sont issues de la banque PDB⁸⁸, à l'exception de la structure cristallographique du complexe isogranulatimide/Chk1 dont les coordonnées nous ont été transmises par l'équipe de Michel Roberge⁴⁸ (entrée 1) (Tableau 13).

Les structures cristallographiques peuvent être corrigées 'à la main' (éditeur de texte ASCII) pour éviter de provoquer des erreurs d'interprétation par les logiciels qui vont les traiter et sont utilisées au format PDB⁹⁵.

Visualisation moléculaire

Deux programmes de visualisation moléculaire ont été utilisés: (i) UCSF Chimera^{96,97} pour les études structurales et (ii) Molegro Molecular Viewer 2008.1.2.0⁹⁸ pour l'analyse des résultats d'arrimage moléculaire.

Génération des ligandothèques

Les formules développées des ligands à docker ont été dessinées avec CambridgeSoft ChemDraw Ultra 11.0⁹⁹ et enregistrées au format .MDL/Mol¹⁰⁰.

Les formules développées des ligands ont été transformées en structures tridimensionnelles sous Accelrys ViewerPro 5.0 (AVP5) après correction de géométrie et d'hybridation, chaque structure ayant été minimisée jusqu'à convergence (vide infra) en utilisant le champ de force intégré (DREIDING)¹⁰¹. Compte tenu du caractère rigide et plan des ligands concernés par cette étude, les structures ainsi minimisées ont été supposées compatibles avec une utilisation immédiate pour le docking moléculaire.

La combinaison de scripts Python (transformation de formats moléculaires, de noms de fichiers, d'identification de ligands) et de scripts dans le langage de commande d'AVP5 (hydrogénation, minimisation ...) nous permettent d'obtenir sans erreurs de manipulation des ligandothèques (de l'ordre d'une centaine de molécules) aux formats PDB ou SDF pour exploitation ultérieure par le logiciel de docking.^{100,102}

Alignements structuraux

Les structures cristallographiques des complexes ligands/Chk1 ont été alignées à l'aide du module Matchmaker¹⁰³ du programme UCSF Chimera. Ce module combine différentes méthodes d'alignements basées sur des calculs de RMSD, de structures secondaires, d'alignement de séquences du type Needleman-Wunsch¹⁰⁴ ou Smith-Waterman¹⁰⁵ utilisant différentes matrices de similitude type PAM ou BLOSUM¹⁰⁶ (que nous avons utilisé).

Arrimage (docking) moléculaire

Les calculs de docking moléculaire ont été effectués avec la version 2.2 du logiciel Molegro Virtual Docker.⁹⁸ Ce logiciel utilise différentes méthodes de recherche : MolDock Optimizer et MolDock SE (Simplex Evolution).¹⁰⁷ Nous avons utilisé MolDock Optimizer qui est un algorithme évolutionnaire inspiré de la théorie darwinienne de l'évolution..^{108,109} A partir d'un site de liaison théorique, défini de différentes manières (volume sphérique, détection de cavités, sélection de résidus ...), cet outil explore un nombre important de positions et de conformations pour conduire aux résultats énergétiquement les plus favorables. Molegro permet de réaliser des calculs avec une flexibilité limitée de l'ensemble de la structure protéique et une flexibilité élevée des chaînes latérales des résidus impliqués dans le site de liaison. Ces calculs sont longs et une étude a montré que, dans notre cas, ils n'apportaient pas d'informations supplémentaires par rapport à un site de liaison théorique dont les chaînes latérales sont maintenues rigides (calculs rapides).

Le ligand a été toujours utilisé en tant que molécule flexible.

Lors de notre étude, seules les 10 poses (une conformation d'un complexe protéine ligand après calcul d'arrimage) les plus favorables ont été conservées et analysées.

La méthode de score utilisée pour classifier l'ensemble des poses est MolDock Score GRID. Cette méthode est identique à MolDock Score,^{101,110} mais accélère les calculs par une interpolation des paramètres d'énergie sur chaque point d'une grille cubique englobant le site de liaison théorique et des calculs de liaisons hydrogènes sans directionnalité.

Il faut noter que l'ensemble des choix (méthodes de recherche, scores) possibles est souvent lié à une réussite des calculs sur un complexe protéine ligand donné. L'étude d'arrimage présentée ici étant exploratoire, les ligands macrocycliques relativement rigides et les données d'inhibition enzymatiques à venir, nous n'avons effectué qu'une démarche méthodologique limitée, en particulier au niveau de la comparaison de différentes fonctions de scores et de la stabilité des complexes protéine-ligands (dynamique moléculaire).

BIBLIOGRAPHIE

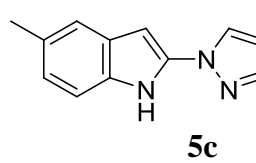
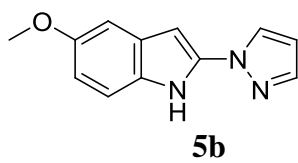
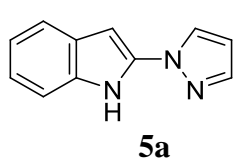
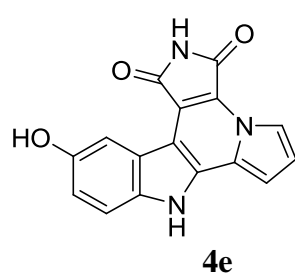
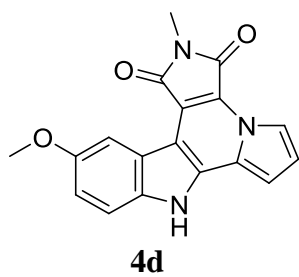
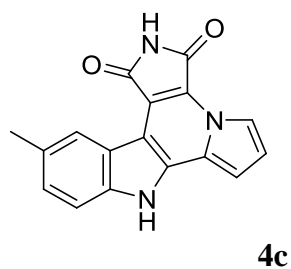
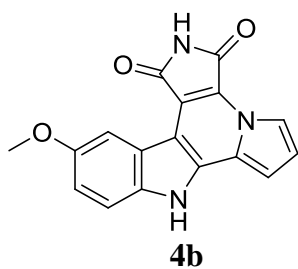
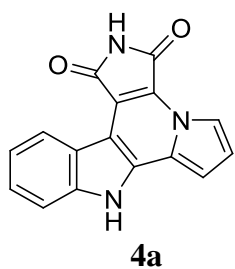
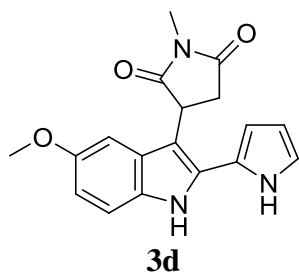
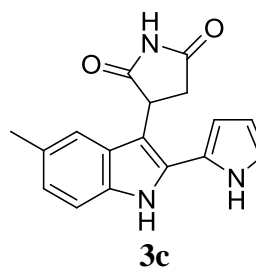
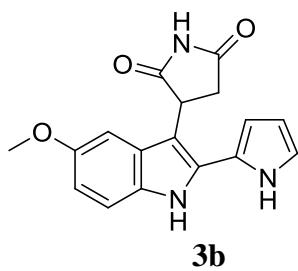
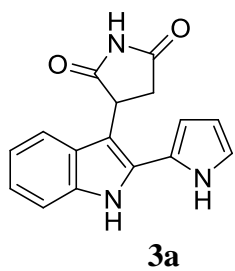
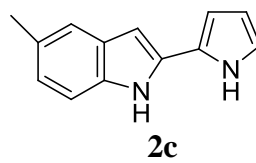
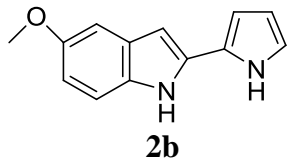
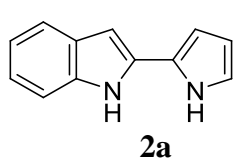
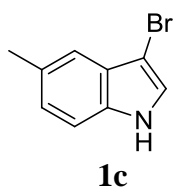
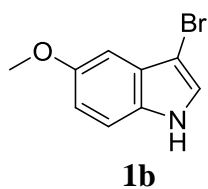
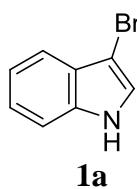
- (1) Callen, J. *Biologie cellulaire: des molécules aux organismes*; Dunod, 2003.
- (2) Meijer, L. *Oncologie* **2003**, 5, 311-326.
- (3) Murray, A. W.; Hunt, T. *The cell cycle: an introduction*; Oxford University Press, 1993.
- (4) Viallard, J. F.; Lacombe, F.; Belloc, F.; Pellegrin, J. L.; Reiffers, J. *Cancer/Radiothérapie* **2001**, 5, 109-129.
- (5) Alberts, B.; Wilson, J.; Collectif; Hunt, T. *Biologie moléculaire de la cellule, 2 volumes : Livre de cours, Livre: d'exercices*; Flammarion Médecine-Sciences, 2004.
- (6) Delcourt, J. *Science et Vie* **1998**, 968, 100-106.
- (7) Weinberg, R. *Pour la science* **1996**, 229, 34-46.
- (8) Delcourt, J. *Science et Vie* **1998**, 968, 109-113.
- (9) Hellman, S.; Vokes, E. *Pour la science* **1996**, 229, 86-90.
- (10) Wood, A. K.; Ansaloni, S.; Ziemer, L. S.; Lee, W. M.; Feldman, M. D.; Sehgal, C. M. *Ultrasound in Medicine & Biology* **2005**, 31, 1403-1410.
- (11) Neal, M. *Pharmacologie médicale*; De Boeck, 2003.
- (12) Moulin, M.; Coquerel, A. *Pharmacologie*; Elsevier Masson, 2002.
- (13) Avendaño, C.; Menéndez, J. C. *Medicinal chemistry of anticancer drugs*; Elsevier, 2008.
- (14) Sielecki, T. M.; Boylan, J. F.; Benfield, P. A.; Trainor, G. L. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 1-18.
- (15) Roberge, M.; Berlinck, R. G. S.; Xu, L.; Anderson, H. J.; Lim, L. Y.; Curman, D.; Stringer, C. M.; Friend, S. H.; Davies, P.; Vincent, I.; Haggarty, S. J.; Kelly, M. T.; Britton, R.; Piers, E.; Andersen, R. J. *Cancer Research* **1998**, 58, 5701-5706.
- (16) Zhao, B.; Bower, M. J.; McDevitt, P. J.; Zhao, H.; Davis, S. T.; Johanson, K. O.; Green, S. M.; Concha, N. O.; Zhou, B. S. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 46609-46615.
- (17) Jiang, X.; Zhao, B.; Britton, R.; Lim, L. Y.; Leong, D.; Sanghera, J. S.; Zhou, B. S.; Piers, E.; Andersen, R. J.; Roberge, M. *Molecular Cancer Therapeutics* **2004**, 3, 1221-1227.
- (18) Berlinck, R. G. S.; Britton, R.; Piers, E.; Lim, L.; Roberge, M.; Moreira da Rocha, R.; Andersen, R. J. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 9850-9856.
- (19) Faul, M. M.; Winneroski, L. L.; Krumrich, C. A. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 6053-6058.
- (20) Yoshida, T.; Nishiyachi, M.; Nakashima, N.; Murase, M.; Kotani, E. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2002**, 50, 872-876.
- (21) Hugon, B.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Prudhomme, M. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 3927-3930.
- (22) Bocchi, V.; Palla, G. *Synthesis* **1982**, 12, 1096-1103.
- (23) Bocchi, V.; Foia, D.; Pochini, A.; Ungaro, R.; Andreetti, G. D. *Tetrahedron* **1982**, 38, 373-378.
- (24) Curman, D.; Cinel, B.; Williams, D. E.; Rundle, N.; Block, W. D.; Goodarzi, A. A.; Hutchins, J. R.; Clarke, P. R.; Zhou, B.; Lees-Miller, S. P.; Andersen, R. J.; Roberge, M. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 17914-17919.
- (25) Piers, E.; Britton, R.; Andersen, R. J. *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, 65, 530-535.
- (26) Yoshida, T.; Nishiyachi, M.; Nakashima, N.; Murase, M.; Kotani, E. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2002**, 51, 872-876.
- (27) Hugon, B.; Pfeiffer, B.; Renard, P.; Prudhomme, M. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 3935-3937.
- (28) Bergman, J.; Janosik, T.; Koch, E.; Pelcman, B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 2615-2621.
- (29) Hugon, B.; Anizon, F.; Bailly, C.; Golsteyn, R. M.; Pierré, A.; Léonce, S.; Hickman, J.; Pfeiffer, B.; Prudhomme, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, 15, 5965-5980.

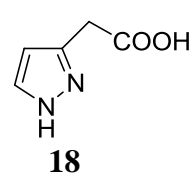
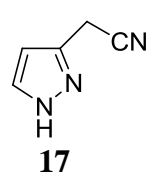
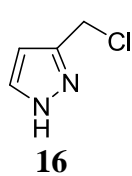
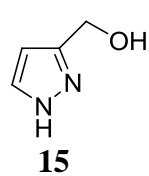
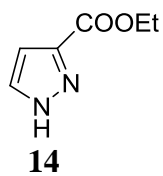
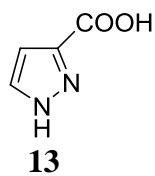
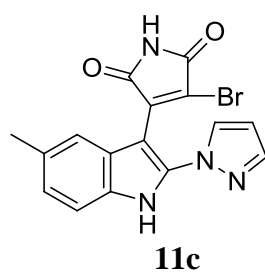
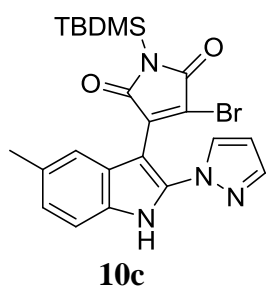
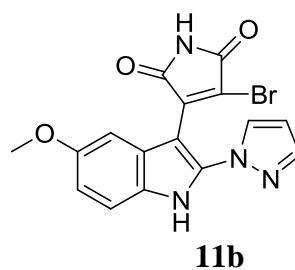
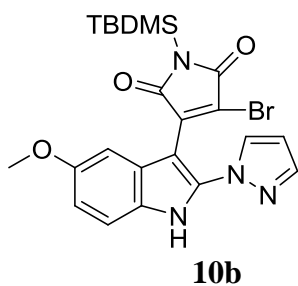
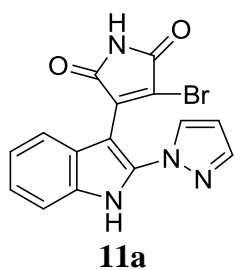
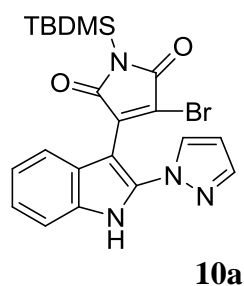
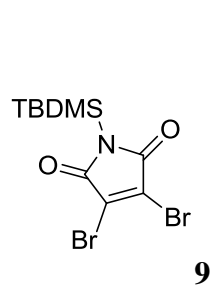
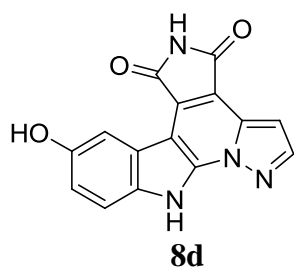
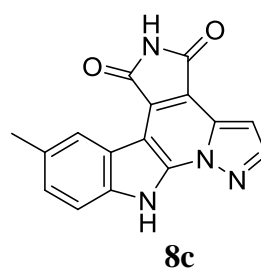
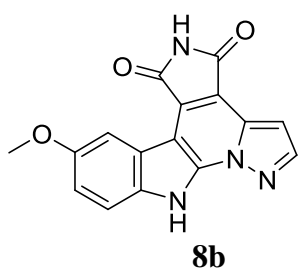
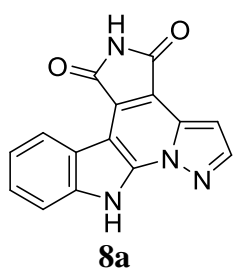
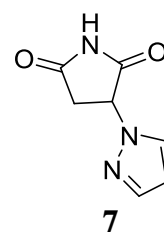
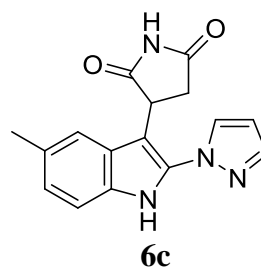
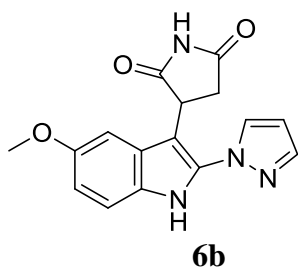
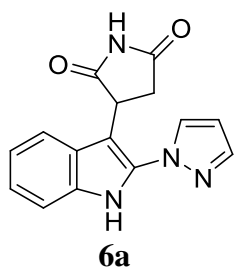
- (30) Hénon, H.; Messaoudi, S.; Anizon, F.; Aboab, B.; Kucharczyk, N.; Léonce, S.; Golsteyn, R. M.; Pfeiffer, B.; Prudhomme, M. *European Journal of Pharmacology* **2007**, *554*, 106-112.
- (31) Conchon, E.; Anizon, F.; Aboab, B.; Golsteyn, R. M.; Léonce, S.; Pfeiffer, B.; Prudhomme, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 4419-4430.
- (32) Conchon, E.; Anizon, F.; Aboab, B.; Golsteyn, R. M.; Léonce, S.; Pfeiffer, B.; Prudhomme, M. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *43*, 282-292.
- (33) Conchon, E.; Anizon, F.; Aboab, B.; Prudhomme, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 4669-4680.
- (34) Tao, M.; Park, C. H.; Bihovsky, R.; Wells, G. J.; Husten, J.; Ator, M. A.; Hudkins, R. L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 938-942.
- (35) Wells, G. J.; Bihovsky, R.; Hudkins, R. L.; Ator, M. A.; Husten, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 1151-1155.
- (36) Sanchez-Martinez, C.; Shih, C.; Faul, M. M.; Zhu, G.; Paal, M.; Somoza, C.; Li, T.; Krumrich, C. A.; Winneroski, L. L.; Xun, Z.; Brooks, H. B.; Patel, B. K.; Schultz, R. M.; DeHahn, T. B.; Spencer, C. D.; Watkins, S. A.; Considine, E.; Dempsey, J. A.; Ogg, C. A.; Campbell, R. M.; Anderson, B. A.; Wagner, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 3835-3839.
- (37) Faul, M. M.; Winneroski, L. L.; Krumrich, C. A. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 1109-1112.
- (38) Zhu, G.; Conner, S.; Zhou, X.; Shih, C.; Brooks, H. B.; Considine, E.; Dempsey, J. A.; Ogg, C.; Patel, B.; Schultz, R. M.; Spencer, C. D.; Teicher, B.; Watkins, S. A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 1231-1235.
- (39) Bregman, H.; Williams, D. S.; Atilla, G. E.; Carroll, P. J.; Meggers, E. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 13594-13595.
- (40) Bregman, H.; Williams, D. S.; Meggers, E. *Synthesis* **2005**, *9*, 1521-1527.
- (41) Bregman, H.; Carroll, P. J.; Meggers, E. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 877-884.
- (42) Bregman, H.; Meggers, E. *Organic Letters* **2006**, *8*, 5465-5468.
- (43) Atilla-Gokcumen, G. E.; Williams, D. S.; Bregman, H.; Pagano, N.; Meggers, E. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1443-1450.
- (44) Atilla-Gokcumen, G. E.; Pagano, N.; Streu, C.; Maksimoska, J.; Filippakopoulos, P.; Knapp, S.; Meggers, E. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2933-2936.
- (45) Prudhomme, M. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents* **2004**, *4*, 509-521.
- (46) Prudhomme, M. *Anticancer Agents from Natural Products* **2005**, 499-517.
- (47) Deslandes, S.; Chassaing, S.; Delfourne, E. *Marine Drugs* **7**, 754-786.
- (48) Jiang, X.; Zhao, B.; Britton, R.; Lim, L. Y.; Leong, D.; Sanghera, J. S.; Zhou, B. S.; Piers, E.; Andersen, R. J.; Roberge, M. *Molecular Cancer Therapeutics* **2004**, *3*, 1221-1227.
- (49) Henon, H.; Conchon, E.; Hugon, B.; Messaoudi, S.; Golsteyn, R. M.; Prudhomme, M. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, *8*, 577-597.
- (50) Henon, H.; Messaoudi, S.; Anizon, F.; Aboab, B.; Kucharczyk, N.; Léonce, S.; Golsteyn, R.; Pfeiffer, B.; Prudhomme, M. *European Journal of Pharmacology* **2007**, *554*, 106-112.
- (51) Khazaei, A.; Zolfigol, M.; Kolvari, E.; Koukabi, N.; Soltani, H.; Komaki, F. *Synthesis* **2009**, *2009*, 3672-3676.
- (52) Chhattise, P. K.; Ramaswamy, A.; Waghmode, S. B. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 189-194.
- (53) Terent'ev, A. P.; Belen'kii, L. I.; Yanovskaya, L. A. *Zhurnal Obshchei Khimii* **1954**, *24*, 1251-1256.
- (54) Bellesia, F.; Ghelfi, F.; Pagnoni, U.; Pinetti, A. *Journal of Chemical Research, Synopses* **1989**, 182-185.
- (55) Hugon, B.; Anizon, F.; Bailly, C.; Golsteyn, R. M.; Pierré, A.; Léonce, S.; Hickman, J.; Pfeiffer, B.; Prudhomme, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 5965-5980.
- (56) Bocchi, V.; Palla, G. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3251-3256.

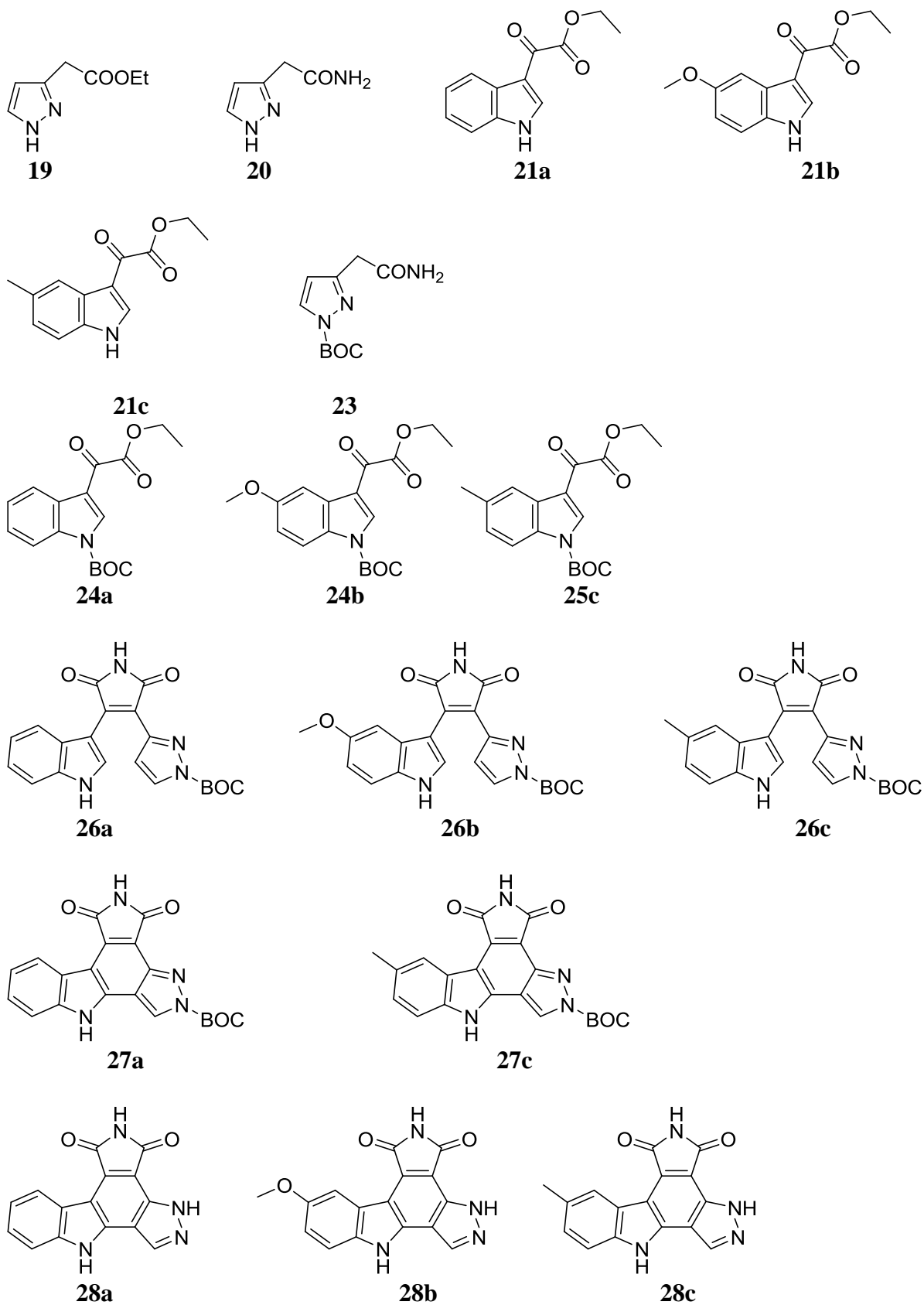
- (57) Barry, J. F.; Wallace, T. W.; Walshe, N. D. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12797-12806.
- (58) Hugon, B.; Anizon, F.; Bailly, C.; Golsteyn, R. M.; Pierré, A.; Léonce, S.; Hickman, J.; Pfeiffer, B.; Prudhomme, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 5965-5980.
- (59) Hudkins, R. L.; Johnson, N. W. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2001**, *38*, 591-595.
- (60) Bourderioux, A.; Kassis, P.; Mérour, J.; Routier, S. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11012-11019.
- (61) Pagano, N.; Maksimoska, J.; Bregman, H.; Williams, D. S.; Webster, R. D.; Xue, F.; Meggers, E. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2007**, *5*, 1218.
- (62) Braun, A.; Maurette, M.; Oliveros, E. *Technologie photochimique*; Presses Polytechniques Romandes.; 1986.
- (63) Faul, M. M.; Winneroski, L. L.; Krumrich, C. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6053-6058.
- (64) Fatin-Rouge, N.; Tóth, É.; Perret, D.; Backer, R. H.; Merbach, A. E.; Bünzli, J. G. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 10810-10820.
- (65) Jones, R. G. *Journal of the American Chemical Society* **1949**, *71*, 3994-4000.
- (66) Jones, R. G.; Mann, M. J. *Journal of the American Chemical Society* **1953**, *75*, 4048-4052.
- (67) Contour-Galcéra, M.; Sidhu, A.; Plas, P.; Roubert, P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 3555-3559.
- (68) Faul, M. M.; Winneroski, L. L.; Krumrich, C. A. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 1109-1112.
- (69) Marminon, C.; Pierré, A.; Pfeiffer, B.; Pérez, V.; Léonce, S.; Joubert, A.; Bailly, C.; Renard, P.; Hickman, J.; Prudhomme, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 609-622.
- (70) McLaughlin, M.; Marcantonio, K.; Chen, C.; Davies, I. W. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 4309-4312.
- (71) Bourderioux, A.; Routier, S.; Bénéteau, V.; Mérour, J. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9465-9475.
- (72) Teller, S.; Eluwa, S.; Koller, M.; Uecker, A.; Beckers, T.; Baasner, S.; Böhmer, F.; Mahboobi, S. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *35*, 413-427.
- (73) Conchon, E.; Anizon, F.; Aboab, B.; Prudhomme, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 4669-4680.
- (74) Lin, Z.; Chen, H. C.; Sun, S.; Hsu, C.; Chow, T. J. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5216-5221.
- (75) Kuduk, S. D.; Marco, C. N. D.; Cofre, V.; Pitts, D. R.; Ray, W. J.; Ma, L.; Wittmann, M.; Veng, L.; Seager, M. A.; Koeplinger, K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 1334-1337.
- (76) Hénon, H.; Messaoudi, S.; Hugon, B.; Anizon, F.; Pfeiffer, B.; Prudhomme, M. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5599-5614.
- (77) Hekmatshoar, R.; Sajadi, S.; Heravi, M. M. *Journal of the Chinese Chemical Society (Taipei, Taiwan)* **2008**, *55*, 616-618.
- (78) Tao, M.; Park, C. H.; Bihovsky, R.; Wells, G. J.; Husten, J.; Ator, M. A.; Hudkins, R. L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 938-942.
- (79) Chatterjee, S.; Diebold, J. L.; Dunn, D.; Hudkins, R. L.; Dandu, R.; Wells, G. J.; Zulli, A. L. Preparation of novel multicyclic compounds and their amino acid derivatives as inhibitors of enzymes such as poly(ADP-ribose) polymerase.
- (80) Tsuge, O.; Tashiro, M.; Kiryu, Y. *Heterocycles* **1974**, *2*, 575.
- (81) Kuehne, M. E. *Journal of the American Chemical Society* **1959**, *81*, 5400-5404.
- (82) Tashiro, M.; Kiryu, Y.; Tsuge, O. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1975**, *48*, 616-618.
- (83) Weinstein, J.; Kohn, K.; Grever, M.; Viswanadhan, V.; Rubinstein, L.; Monks, A.; Scudiero, D.; Welch, L.; Koutsoukos, A.; Chiausa, A.; et, A. *Science* **1992**, *258*, 447-451.
- (84) Capra, M.; Nuciforo, P. G.; Confalonieri, S.; Quarto, M.; Bianchi, M.; Nebuloni, M.; Boldorini, R.; Pallotti, F.; Viale, G.; Gishizky, M. L.; Draetta, G. F.; Di Fiore, P. P. *Cancer Research* **2006**, *66*, 8147-8154.
- (85) Ashwell, S.; Zabludoff, S. *Clinical Cancer Research* **2008**, *14*, 4032-4037.

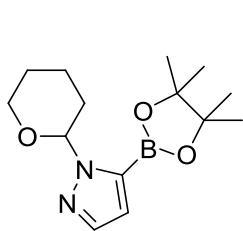
- (86) Chen, P.; Luo, C.; Deng, Y.; Ryan, K.; Register, J.; Margosiak, S.; Tempczyk-Russell, A.; Nguyen, B.; Myers, P.; Lundgren, K.; Kan, C.; O'Connor, P. M. *Cell* **2000**, *100*, 681-692.
- (87) La structure comporte des délétions qui ont été supposées comme peu influentes s.
- (88) RCSB Protein Data Bank.
- (89) Janetka, J. W.; Ashwell, S.; Zabludoff, S.; Lyne, P. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **2007**, *10*, 473.
- (90) Fraley, M. E.; Steen, J. T.; Brnardic, E. J.; Arrington, K. L.; Spencer, K. L.; Hanney, B. A.; Kim, Y.; Hartman, G. D.; Stirdivant, S. M.; Drakas, B. A.; Rickert, K.; Walsh, E. S.; Hamilton, K.; Buser, C. A.; Hardwick, J.; Tao, W.; Beck, S. C.; Mao, X.; Lobell, R. B.; Sepp-Lorenzino, L.; Yan, Y.; Ikuta, M.; Munshi, S. K.; Kuo, L. C.; Kretsoulas, C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 6049-6053.
- (91) Huang, S.; Garbaccio, R. M.; Fraley, M. E.; Steen, J.; Kretsoulas, C.; Hartman, G.; Stirdivant, S.; Drakas, B.; Rickert, K.; Walsh, E.; Hamilton, K.; Buser, C. A.; Hardwick, J.; Mao, X.; Abrams, M.; Beck, S.; Tao, W.; Lobell, R.; Sepp-Lorenzino, L.; Yan, Y.; Ikuta, M.; Murphy, J. Z.; Sardana, V.; Munshi, S.; Kuo, L.; Reilly, M.; Mahan, E. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 5907-5912.
- (92) Tong, Y.; Claiborne, A.; Stewart, K. D.; Park, C.; Kovar, P.; Chen, Z.; Credo, R. B.; Gu, W.; Gwaltney II, S. L.; Judge, R. A.; Zhang, H.; Rosenberg, S. H.; Sham, H. L.; Sowin, T. J.; Lin, N. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 2759-2767.
- (93) Lin, N.; Xia, P.; Kovar, P.; Park, C.; Chen, Z.; Zhang, H.; Rosenberg, S. H.; Sham, H. L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 421-426.
- (94) Vanderpool, D.; Johnson, T. O.; Ping, C.; Bergqvist, S.; Alton, G.; Phonephaly, S.; Rui, E.; Luo, C.; Deng, Y.; Grant, S.; Quenzer, T.; Margosiak, S.; Register, J.; Brown, E.; Ermolieff, J. *Biochemistry* **2009**, *48*, 9823-9830.
- (95) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acid Research* **2000**, *28*, 235-242.
- (96) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1605-1612.
- (97) UCSF Chimera Home Page.
- (98) Molegro - Products.
- (99) CambridgeSoft Desktop Software – ChemDraw.
- (100) ctfiler.pdf (Objet application/pdf).
- (101) Mayo, S. L.; Olafson, B. D.; Goddard, W. *Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 8897-8909.
- (102) Python Programming Language – Official Website.
- (103) Meng, E. C.; Pettersen, E. F.; Couch, G. S.; Huang, C. C.; Ferrin, T. E. *BMC Bioinformatics* **2006**, *7*, 339.
- (104) Needleman, S. B.; Wunsch, C. D. *Journal of Molecular Biology* **1970**, *48*, 443-453.
- (105) Smith, T. F.; Waterman, M. S. *Journal of Molecular Biology* **1981**, *147*, 195-197.
- (106) Henikoff, S.; Henikoff, J. G. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **1992**, *89*, 10915.
- (107) Thomsen, R.; Christensen, M. H. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 3315-3321.
- (108) Michalewicz, Z. *Genetic algorithms + data structures*; Springer, 1996.
- (109) Michalewicz, Z.; Fogel, D. B. *How to solve it: modern heuristics*; Springer, 2004.
- (110) Yang, J.; Chen, C. *Proteins* **2004**, *55*, 288-304.

LISTE DES MOLECULES DECRITES

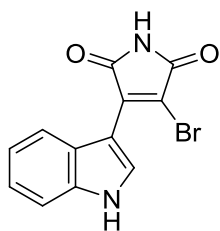




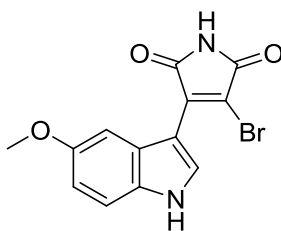




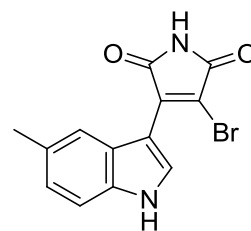
29



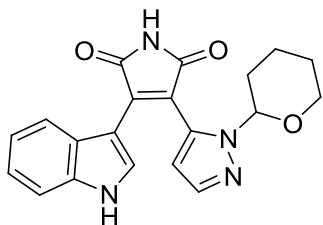
30a



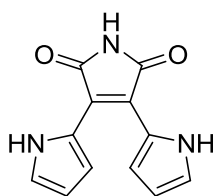
30b



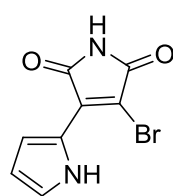
30c



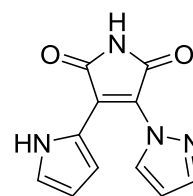
31a



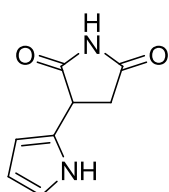
33



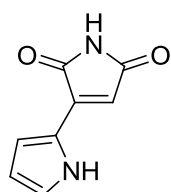
34



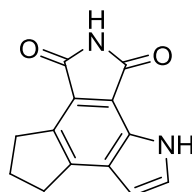
37



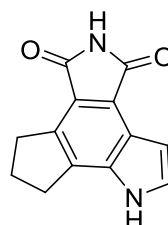
39



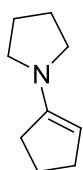
40



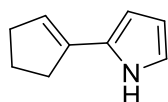
41a



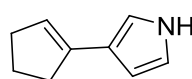
41b



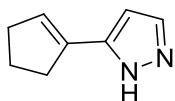
43



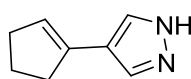
45a



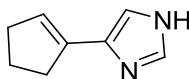
45b



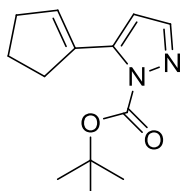
46a



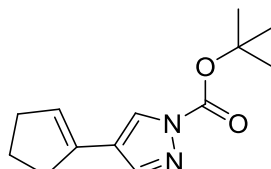
46b



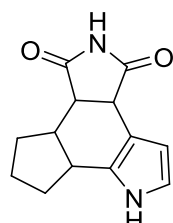
47b



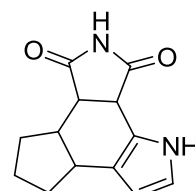
53a



53b



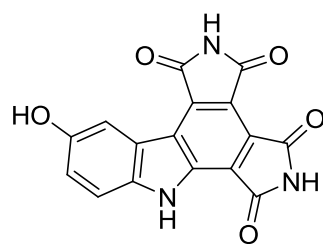
54a



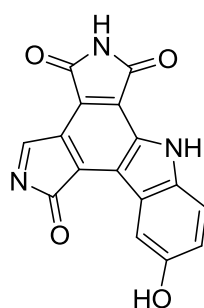
54b

ANNEXES

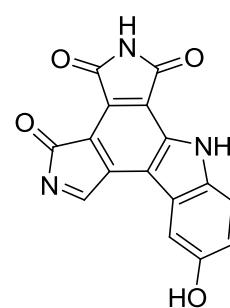
Structure des ligands virtuels utilisés pour l'arrimage moléculaire



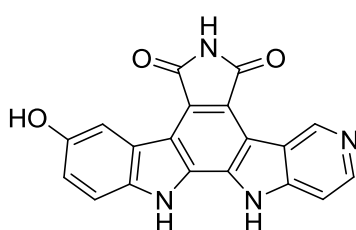
D31_731



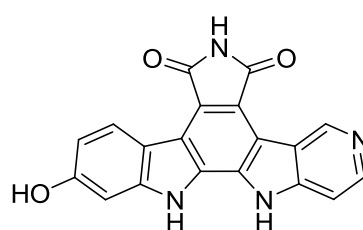
D33_733



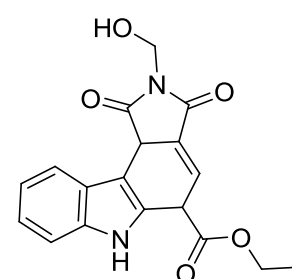
D34_734



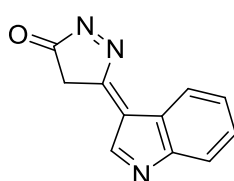
D35_735



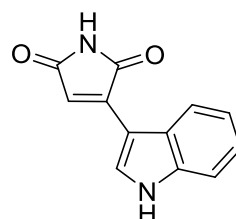
D36_736



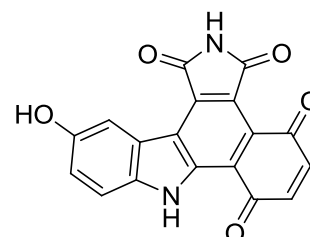
D38_738



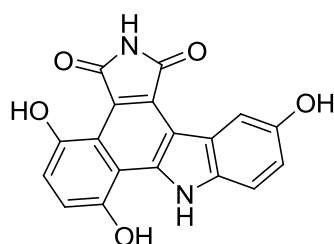
D39_739



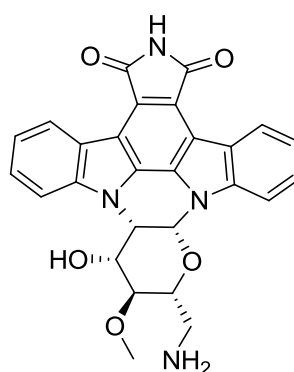
D41_741



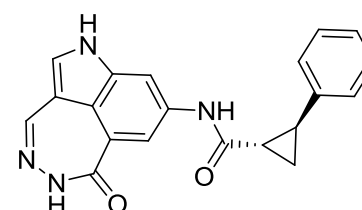
D42_742



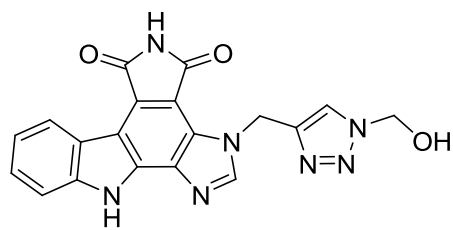
D43_743



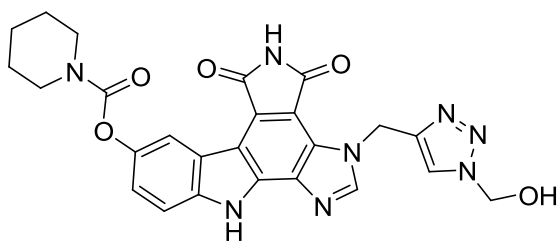
D44_744



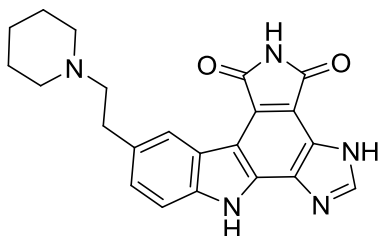
D46_746



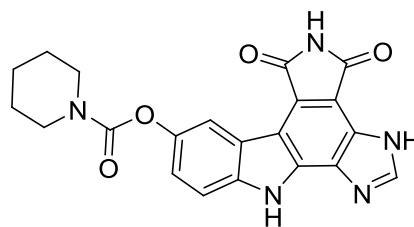
D59_759



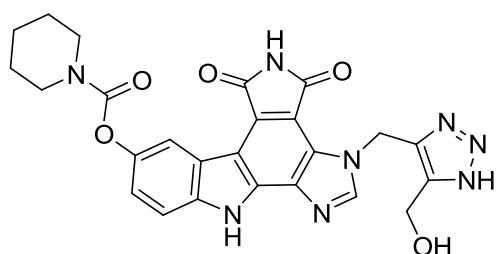
D60_760



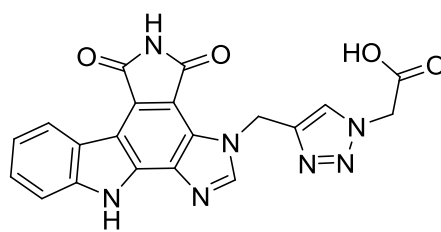
D62_762



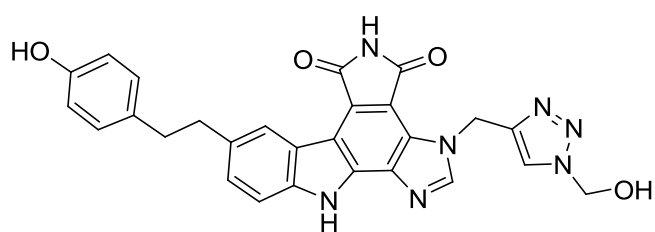
D63_763



D65_765



D66_766



D78_778

Synthesis and anticancer evaluation of analogues of the marine alkaloids granulatinide and isogranulatinide as potential inhibitors of the G2 checkpoint

Granulatinide and isogranulatinide are two imidazo[4,5*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazole marine alkaloids reported as checkpoint G2 inhibitors targeting specifically the checkpoint kinase 1. One proposes that such inhibitors used in association with a genotoxic treatment should enhance it resulting in a reduction of side effects.

Two types of new potential checkpoint G2 inhibitors have been studied. The first one is an analogue of the natural product variously substituted on the indole moiety and in which the imidazole ring has been replaced either by a pyrrol or a pyrazol ring. The second type of analogue consists on a tetracyclic structure where the indole ring is replaced by a cyclopentene.

All the compounds prepared by the adaptation of methods of the literature, have been evaluated regarding both their cytotoxicity and the inhibition of the checkpoint G2.

Keywords: granulatinide, isogranulatinide, pyrrolocarbazoles, checkpoint G2 inhibitor, Chk1 inhibitor

AUTEUR : Sébastien DESLANDES

TITRE : *Synthèses et évaluations biologiques anti-cancéreuses d'analogues des alcaloïdes marins granulaticide et isogranulaticide, inhibiteurs potentiels du checkpoint G2*

DIRECTEUR DE THESE : Evelyne Delfourne

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Univ. Toulouse III Paul Sabatier le 8 Octobre 2010

La granulaticide et l'isogranulaticide sont deux alcaloïdes marins de structure imidazo[4,5a]pyrrolo[3,4-c]carbazole décrits comme inhibiteurs du checkpoint G2 agissent spécifiquement sur la checkpoint kinase 1. De tels inhibiteurs utilisés en association avec un génotoxique pourraient potentialiser l'action de celui-ci permettant ainsi d'en réduire les doses et de diminuer ses effets secondaires.

Deux types d'analogues inhibiteurs potentiels du checkpoint G2 ont été étudiés. Le premier correspond à une structure pentacyclique diversement substituées au niveau du cycle indole dans laquelle le cycle imidazole a été remplacé par un cycle pyrrole ou pyrazole et. Le second type est une structure tetracyclique ou le noyau indole a été substitué par un cyclopentène. Les différents composés, préparés en adaptant des méthodes de la littérature, ont été évalués autant d'un point de vue de leur cytotoxicité que d'un point de vue de leur inhibition du checkpoint G2.

Mots clés : granulaticide, isogranulaticide, pyrrolocarbazoles, inhibiteur checkpoint G2, inhibiteur Chk1

Chimie Biologie Santé

Laboratoire de Synthèse et physicochimie de molécules d'intérêt biologique - UMR 5068
118, route de Narbonne
31062 Toulouse Cedex 09