HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation pharmacologique de nouveaux inhibiteurs de la Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) potentiellement utilisables dans le traitement des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'intestin (MICI)

Virginie Andrzejak Lucas-Andrzejak

To cite this version:

Virginie Andrzejak Lucas-Andrzejak. Conception, synthèse et évaluation pharmacologique de nouveaux inhibiteurs de la Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) potentiellement utilisables dans le traitement des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'intestin (MICI). Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT : 2010LIL2S044 . tel-00590867

HAL Id: tel-00590867

https://theses.hal.science/tel-00590867v1

Submitted on 5 May 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.

UNIVERSITE DE LILLE NORD DE FRANCE – DROIT ET SANTE

INSTITUT DE CHIMIE PHARMACEUTIQUE ALBERT LESPAGNOL – EA 4481

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE NORD DE FRANCE

Spécialité : Sciences du Médicament

Présentée et soutenue publiquement le 9 Décembre 2010

par

Virginie **LUCAS-ANDRZEJAK**

CONCEPTION, SYNTHESE ET EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA FATTY ACID AMIDE HYDROLASE (FAAH) POTENTIELLEMENT UTILISABLES DANS LE TRAITEMENT DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN (MICI)

Membres du jury

Directeurs de thèse :	- Dr. Régis MILLET	**Maître de Conférences**, Université de Lille Nord de France
	- Pr. Philippe CHAVATTE	**Professeur**, Université de Lille Nord de France
Rapporteurs :	- Pr. Pascal SONNET	**Professeur**, Université d'Amiens
	- Pr. Dominique GUILLAUME	**Professeur**, Université de Reims
Examinateurs :	- Pr. Giulio MUCCIOLI	**Professeur**, Université Catholique de Louvain
	- Pr. Michel VIDAL	**Professeur**, Université Descartes, Paris
	- Dr. Emmanuelle LIPKA	**Maître de Conférences**, Université de Lille Nord de France

« Un monde sans la Science, ça serait aussi absurde qu'un poisson sans bicyclette… »

P. Desproges

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol, au sein de l'équipe 4481, sous la co-direction du Docteur Régis Millet et du Professeur Philippe Chavatte. Ce projet a été financé par l'Université de Lille Nord de France et la région Nord Pas-de-Calais.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements :

- A mes directeurs de thèse : Monsieur le Docteur Régis Millet et Monsieur le Professeur Philippe Chavatte.

Je tiens à vous remercier de m'avoir fait confiance en acceptant d'être mes directeurs de thèse. Nous avons beaucoup échangé autour du sujet. Vos conseils et suggestions ont toujours été entendus. Vous avez accordé beaucoup d'importance et de temps à mon travail et je vous en suis reconnaissante. Je souhaite sincèrement que notre collaboration perdure au-delà de cette thèse.

- Aux membres du jury, et en premier lieu, à mes rapporteurs : Monsieur le Professeur Dominique Guillaume et Monsieur le Professeur Pascal Sonnet. Je suis très sensible à l'intérêt que vous avez porté à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Soyez assurés de toute ma gratitude.

- A mes examinateurs :

Monsieur le Professeur Michel Vidal. Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de siéger dans ce jury. Qu'il me soit permis de vous remercier pour l'intérêt que vous portez à ce travail.

Madame le Docteur Emmanuelle Lipka. C'est avec une joie immense que j'ai appris que tu siègerais dans mon jury. Je sais que sans toi ce travail ne serait pas ce qu'il est puisque la séparation des alcools a été à l'origine de la fameuse publication nécessaire à la soutenance. Tu m'as également beaucoup apporté sur le plan relationnel (ça fait du bien de travailler avec une fille au milieu de tous ces garçons) et j'espère sincèrement continuer notre collaboration.

Monsieur le Professeur Giulio Muccioli. C'est pour moi, un immense honneur que de te compter parmi les membres du jury. Au cours de ces trois années de thèse, tu m'as appris beaucoup sur le monde mystérieux de la pharmaco et tu as toujours su répondre à mes questions. Tes connaissances sur le sujet sont sans limites et même si j'ai un peu peur de me faire cuisiner aujourd'hui, je suis très fière d'accueillir un spécialiste des cannabinoïdes au sein de mon jury.

- Aux personnes ayant contribué de près ou de loin à ce travail :

Monsieur le Professeur Patrick Depreux. Vous m'avez accueillie au sein de l'Institut Albert Lespagnol et je vous en remercie. Je tiens également à vous exprimer toute ma reconnaissance pour la qualité des enseignements que vous m'avez dispensés au cours des mes années de MASTER (et de MASTERE).

Monsieur le Professeur Jean-Paul Bonte. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe de recherche.

Monsieur le Professeur Pierre Desreumeaux. Je vous remercie d'avoir accepté de collaborer avec notre équipe. Grâce à vous, des perspectives prometteuses sont venues étoffer ce travail.

Monsieur le Professeur Didier Lambert. Vous m'avez accueillie au sein de votre équipe pour m'immerger dans le monde de la pharmacologie et je vous en remercie. Les discussions que nous avons eues ont toujours été constructives et je vous en suis reconnaissante.

Madame le Docteur Mathilde Body-Malapel et Monsieur Madjid Djouina. Merci à vous d'avoir réalisé les évaluations pharmacologiques *in vivo* présentées dans ce mémoire. Vous avez toujours été très disponibles et très agréables à côtoyer.

Monsieur le futur Docteur Nicolas Renault. Tu as réalisé les études de modélisation moléculaire et je t'en remercie. Au-delà des relations de travail, tu es un vrai ami sur qui on peut compter et je suis vraiment heureuse de te connaître. Je te souhaite bonne chance pour la suite (qui a lieu demain…). Sûre qu'on se retrouvera autour d'un bon verre pendant que nos enfants joueront dans le bac à sable (ou que Robin sera occupé à manger le crâne d'Axel…)

Monsieur Guillaume Drugmanne et Mademoiselle Emilie Cyran. Vous avez activement participé aux synthèses présentées dans ce mémoire et je vous en remercie. Je vous souhaite bonne chance pour la suite de vos futures (grandes) carrières.

Monsieur le Docteur Jamal El Bakali. Que te dire à part merci ? Au cours de mes trois ans de thèse (et de mes deux années de MASTER), tu es devenu un véritable ami, ma CHDI à moi et j'ai été vraiment heureuse de travailler avec toi. Tes remarques (bien que nombreuses) ont toujours été appréciées, entendues et écoutées. Tu es sûrement celui qui m'a le plus aidée et je t'en suis infiniment reconnaissante. Mais je n'en dirai pas plus car tu as déjà un gros nez, je ne voudrais pas qu'en plus tu ais la grosse tête…

Mademoiselle Barbara Bosier. Tu m'as formée aux tests de binding et je te remercie de la patience dont tu as fait preuve.

Madame le Docteur Roxane Mansouri. Tu as réalisé une grande partie des tests de binding que je présenterai à l'oral et je t'en remercie.

Mademoiselle Perrine Six. Ma chère petite Perrin, au cours de mes trois ans de thèse, tu as réalisé presque quotidiennement les analyses de mes composés et je t'en remercie. Grâce à toi, je suis devenue incollable

sur la vie des « People », le tuning et les tortues carnivores. Et surtout si tu crois que j'ai recopié ça dans la thèse de Tonio, tu te trompes…

Monsieur le Docteur Christophe Furman. Merci de l'aide que tu m'as apportée dans la compréhension des tests biologiques.

Madame le Docteur Pauline Gilleron. Je tiens à te remercier tout particulièrement pour avoir accepté de corriger ce mémoire. Ce ne fut pas une mince affaire et j'en suis consciente. Maintenant, je te souhaite le meilleur avec ton petit bout à venir.

Madame Amélie Barczyk. Merci à toi la vieille pour m'avoir supporté pendant toutes ces années. Tu m'as appris beaucoup sur la biologie et travailler (enfin jouer à tlmpsp) avec toi a toujours été agréable. Ensemble, on forme une super équipe au Cranium et c'est bien pour ça qu'on gagne (même si certaines mauvaises langues diront que c'est parce qu'on a de la chance…) !

Madame Frédérique Klupsh. Tu es un peu notre maman à tous. Tu es toujours là quand on a besoin de toi et tu nous apprends beaucoup (et pas que sur la chimie). Merci à toi Maman !

Monsieur Antonio Garofalo. Tu as d'abord été un collègue. Puis, tu es devenu un véritable ami. Aujourd'hui tu es le parrain de mon fils et j'en suis très fière. Je suis certaine qu'avec un parrain comme ça, à 10 ans, Axel saura reconnaître un bonnet D d'un bonnet C en moins de 10 secondes… Plus sérieusement, je tiens à te remercier pour tous les bons moments passés à tes côtés (au labo ou à la vie) et je te souhaite le meilleur pour ta vie future avec Madame Garofalo !

Madame Isabelle Garofalo. Si je devais choisir mon meilleur moment passé à l'ICPAL, ça serait sûrement celui où l'on m'a annoncé que tu allais venir travailler avec moi. Tu es une amie chère à mes yeux, une chimiste hors pair, une partenaire de belote et de times'up exceptionnelle et tu es très importante pour moi. Je te remercie d'être passée outre nos différends et d'être, à ce jour, l'une des personnes qui occupe la plus grande place dans mon cœur. Merci coupine !

Madame Delphine Le Broc. Merci à toi d'avoir toujours été là pour m'accompagner dans mes délires. Je te souhaite le meilleur pour la suite que ce soit pour la thèse ou dans la vie avec ton homme et ton petit bout.

Madame le Docteur Laurence Goossens. Je te remercie pour tes conseils avisés, ta sympathie et pour la qualité des enseignements que tu m'as dispensés au cours des mes années d'études.

Madame Frédérique Lebègue. Tu apportes quotidiennement joie et bonne humeur au labo et je t'en remercie. Les pauses café ne seraient pas ce qu'elles sont sans tes nombreuses anecdotes. Un conseil Fred : démissionne et monte un One Man Show. Je le produis !

- A mes parents :

Monsieur l'adjudant-chef ER Didier Andrzejak, Sy Love, Madame Christine Doriot et Doudou. Merci à vous tous de m'avoir soutenue au cours de mes longues années d'études. Vous avez toujours été là quand j'avais besoin de vous et je vous en remercie de tout cœur. Et non Papa, je ne vais pas mettre une photo de Louloute en trame de fond de mon diaporama…

- A mes frères et sœurs : Louphilie, Pedrito, Marco et Gauth-Nouille.

On forme une super famille recomposée et ça c'est la classe. Un grand merci à vous tous pour les bons moments passés à vos côtés.

- A ma belle-famille et particulièrement à Martine et Yves Lucas. Merci à vous de m'avoir accueillie au sein de la famille. Les dimanches en familles sont et seront toujours appréciés surtout si en plus il y a du pot-au-feu et du gâteau au chocolat…

Je n'oublie pas pour autant mes beaux-frères, belles-sœurs, neveux et nièces qui participent à la bonne ambiance au sein de la famille. Merci à vous les loulous !

- A mes amis et notamment à :

Eglantine (ma poupoulette des îles d'amour), Sam (son mari Jedi), 'Aphi (mon colocataire p'éféré), Delphine (l'alcoolique), Clel (merci d'avoir corrigé mes nombreuses fôtes d'aurthograf), Emeline (la future belle-maman d'Axelou), Ludo, Thomas, Mag (prend l'étoile poulette^^), Francois, mon coupain Rémi, Akim l'ours et tous ceux que j'ai oubliés…

Enfin, je ne pourrais terminer ces remerciements sans évoquer celui qui partage mon quotidien depuis plus de trois ans, qui a commencé par devenir mon fiancé, puis qui est devenu mon mari et qui est aujourd'hui le père de mon enfant : Monsieur Damien Lucas, mon Bébounours. Tu es la personne qui compte le plus pour moi (avec notre fils, ne sois pas jaloux, quand on est gentil, on prête…). Tu es mon souffle, mon soutien au quotidien et je t'aime plus que tout. Tu m'as apporté le meilleur et je t'en remercie. Je souhaite sincèrement que nos chemins ne se séparent jamais et que nos vies soient remplies de beaux enfants, de beaux Border Collies et surtout de beaux poneys…

Et je n'oublie pas mon fils Axel qui est le bonheur au quotidien et ses « frères et sœurs » : Fantomas, Michel, Polnareff et Arwen…

- SOMMAIRE -

Remerciements
Liste des abréviations

Partie A : Généralités sur les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin et sur le système endocannabinoïde

A. I) Généralités sur les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)…… 1

I. 1) Epidémiologie, étiologie et aspects lésionnels de la maladie de Crohn et de la RCH……. 1

I. 2) Symptômes et complications associés aux MICI…….. 4

I. 3) Prise en charge et traitements des MICI…… 4

A. II) Généralités sur le système endocannabinoïde……. 9

II. 1) Le cannabis : de l'utilisation ancestrale à l'utilisation thérapeutique……. 9

II. 2) Le système endocannabinoïde…… 10

2. 1) Les récepteurs aux cannabinoïdes…….. 10

1. a) Le récepteur CB1…… 11

a. α) Structure bidimensionnelle…….. 11

a. β) Structure tridimensionnelle et domaines de fixation du ligand……. 12

a. γ) Distribution du récepteur CB1…… 14

1. b) Le récepteur CB2…… 15

b. α) Structure bidimensionnelle……. 15

b. β) Structure tridimensionnelle et domaines de fixation du ligand……. 16

b. γ) Distribution du récepteur CB2…… 18

2. 2) Les endocannabinoïdes…….. 18

2. a) L'anandamide…… 18

2. b) Le 2-arachidonoylglycérol…… 20

2. c) Le noladin éther…… 22

2. d) La virodhamine…… 23

2. e) La *N*-arachidonoyldopamine…… 24

2. f) La *N*-arachidonoylsérine…… 25

2. g) Le 7,10,13,16-docosatétraénoyléthanolamide et l'homo-γ-linoléoyléthanolamide…… 26

2. 3) Les molécules endogènes associées aux endocannabinoïdes…… 27

3. a) Le palmitoyléthanolamide…… 27

3. b) Le 2-linoléoylglycérol et le 2-palmitoylglycérol…… 28

3. c) Le stéaroyléthanolamide…… 28

3. d) L'oléoyléthanolamide…… 29

3. e) L'oléamide…… 30

3. f) Les *N*-acyl taurines…… 31

2. 4) Les voies de biosynthèse des endocannabinoïdes et des molécules endogènes associées aux endocannabinoïdes…… 32

4. a) Les voies de biosynthèse de l'anandamide et du palmitoyléthanolamide…… 32

4. b) Les voies de biosynthèse du 2-AG…… 34

4. c) Les voies de biosynthèse de l'oléamide…… 36

2. 5) Les voies de signalisation intracellulaire modulées par les endocannabinoïdes…… 37

5. a) Les voies de transduction associées au récepteur CB1…… 37

5. b) Les voies de transduction associées au récepteur CB2…… 41

2. 6) Les voies de signalisation intracellulaire modulées par les molécules associées aux endocannabinoïdes…… 44

6. a) Les voies de transduction modulées par l'oléamide…… 44

6. b) Les voies de transduction modulées par le palmitoyléthanolamide…… 47

2. 7) Les systèmes impliqués dans la biodégradation des endocannabinoïdes et des molécules endogènes associées aux endocannabinoïdes…… 49

7. a) Les systèmes de biodégradation impliqués dans le transport des endocannabinoïdes…… 49

7. b) La « fatty acid amide hydrolase » (FAAH)…… 53

b. α) Structure…… 53

b. β) Distribution et spécificité de substrat…… 55

b. γ) Propriétés catalytiques…… 56

b. δ) Les inhibiteurs de la FAAH…… 57

7. c) La « monoacylglycerol lipase » (MAGL)…… 71

c. α) Structure…… 71

c. β) Distribution et spécificité de substrat…… 73

c. γ) Propriétés catalytiques…… 74

c. δ) Les inhibiteurs de la MAGL…… 75

7. d) La « *N*-acyléthanolamine acyl amidase » (NAAA)…… 78

d. α) Structure…… 78

d. β) Distribution et spécificité de substrat…… 80

d. γ) Propriétés catalytiques…… 80

d. δ) Les inhibiteurs de la NAAA…… 80

A. III) Intérêt de l'inhibition de la FAAH dans le traitement des MICI…… 82

Partie B : Conception des composés

B. I) Conception d'inhibiteurs de type 4-aminopipéridine urée : série A…… 84

I. 1) Etude des relations structure-activité des inhibiteurs de type pipérazine et pipéridine urée…… 84

I. 2) Conception d'inhibiteurs de type 4-aminopipéridine urée…… 87

2. 1) Remplacement du connecteur…… 87

2. 2) Remplacement des groupements interagissant avec l'ABP…… 88

2. 3) Pharmacomodulations autour du groupement partant…… 89

B. II) Conception d'inhibiteurs de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole : série B…… 90

II. 1) Etude des relations structure-activité des α-cétohétérocyles…… 90

II. 2) Conception d'inhibiteurs de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole…… 98

2. 1) Remplacement de l'hétérocycle central…… 98

2. 2) Remplacement de la fonction cétone…… 99

2. 3) Remplacement de la pyridine…… 99

2. 4) Remplacement du motif phénylhéxyle…… 100

II. 3) De la conception de nouveaux inhibiteurs de la FAAH vers la conception de molécules mixtes, inhibitrices de FAAH, agonistes des récepteurs CB2…… 102

B. III) Sélection de composés par criblage virtuel : série C…… 105

III. 1) Choix de la chimiothèque…… 105

III. 2) Docking…… 105

III. 3) Scoring…… 106

Partie C : Stratégies de synthèse

C. I) Stratégies de synthèse employées pour la série A…… 107

I. 1) Sous-série A1 : fonction urée portée par l'azote intra-cyclique…… 107

1. 1) Schéma général…… 107

1. 2) Addition de la 4-*N*-boc aminopipéridine sur l'isocyanate…… 108

1. 3) Déprotection de la fonction amine par une solution isopropylique saturée en acide chlorhydrique…… 109

1. 4) Réaction d'amination réductrice entre les amines **4** à **6** et le 1-naphtaldéhyde…… 110

I. 2) Sous-série A2 : fonction urée portée par l'azote extra-cyclique…… 111

2. 1) Schéma général…… 111

2. 2) Débenzylation du composé **10**…… 112

2. 3) Substitution nucléophile de type 2 (SN_2)…… 113

C. II) Stratégies de synthèse employées pour la série B…… 114

II. 1) Schéma général…… 114

*II. 2) Synthèse des composés **18** et **19** par coulage de Suzuki*…… 115

*II. 3) Réaction de O-alkylation : synthèse des composés **20** à **26**……* 117

*II. 4) Synthèse des composés **27** à **45** par réaction de Claisen*…… 117

*II. 5) Cyclisation en isoxazole : obtention des produits **46** à **64**……* 120

*II. 6) Saponification et obtention des acides **65** à **83**……* 125

*II. 7) Couplage de type peptidique, obtention des amides finaux **84** à **123**……* 126

-Partie D : Evaluations pharmacologiques-

D. I) Evaluations pharmacologiques *in vitro*…… 133

I. 1) Mesure de l'activité inhibitrice vis-à-vis de la FAAH…… 133

1. 1) Description du protocole…… 133

1. 2) Evaluation des composés de la série A…… 134

2. a) Résultats obtenus pour les composés de la sous-série A1…… 134

2. b) Résultats obtenus pour les composés de la sous-série A2…… 135

1. 3. Evaluation des composés de la série B…… 137

3. a) Résultats obtenus pour les composés de la sous-série B1…… 137

3. b) Résultats obtenus pour les composés de la sous-série B2…… 139

3. c) Résultats obtenus pour les composés des sous-série B3 et B'…… 141

3. d) Résultats obtenus pour les composés issus du criblage virtuel…… 142

I. 2) Mesure de l'affinité des composés de la série B' vis-à-vis du récepteur CB2…… 148

2. 1) Description du protocole…… 148

2. 2) Résultats obtenus pour les composés de la sous-série B'…… 149

D. II) Evaluations pharmacologiques *in vivo*……. 151

II. 1) Généralités sur le modèle murin de colite induite par le TNBS……. 151

II. 2) Description du protocole……. 152

II. 3) Résultats obtenus…… 153

3. 1) Le composé **95** prévient la perte de poids……. 153

3. 2) Evaluation des dégâts coliques et effet protecteur du composé **95**…… 154

3. 3) Quantification des cytokines pro-inflammatoires : TNF-α et IL1-β……. 156

D. III) Etude de la stabilité du composé 95 en présence de microsomes hépatiques…… 158

III. 1) Description du protocole…… 158

III. 2) Résultats obtenus……. 158

Conclusion et perspectives……. 160

-Partie Expérimentale-

Indications générales……. 164

Synthèse des composés 1 à 3……. 165

N-{1-[(3-anilino)carbonyl]-4-pipéridyl}carbamate de tert-butyle ***(1)***……. 166

N-{1-[(3-trifluorométhylanilino)carbonyl]-4-pipéridyl}carbamate de tert-butyle ***(2)***…… 166

N-{1-[(3-nitroanilino)carbonyl]-4-pipéridyl}carbamate de tert-butyle ***(3)***……. 167

Synthèse des composés 4 à 6……. 168

Chlorhydrate de N-phényl-4-amino-1-pipéridinecarboxamide ***(4)***…… 169

Chlorhydrate de N1-[3(trifluorométhyl)phényl]-4-amino-1-pipéridinecarboxamide ***(5)***…… 169

Chlorhydrate de N1-(3-nitrophényl)-4-amino-1-pipéridinecarboxamide ***(6)***…… 170

Synthèse des composés 7 à 9……. 171

Chlorhydrate de N1-phényl-4-[(1-naphtylméthyl)amino]-1-pipéridinecarboxamide ***(7)***……. 172

Chlorhydrate de N1-[3(trifluorométhyl)phényl]-4-[(1-naphtylméthyl)amino]-1-pipéridinecarboxamide ***(8)*** 172

Chlorhydrate de N1-(3-nitrophényl)-4-[(1-napthylméthyl)amino]-1-pipéridinecarboxamide ***(9)*** 173

Synthèse des composés 10 à 14..... 174

N-(1-Benzyl-3-pipéridyl)-N'-phénylurée ***(10)*** 175

N-(1-Benzyl-3-pipéridyl)-N'-[3-(trifluorométhyl)phényl]urée ***(11)*** 175

N-(1-Benzyl-3-pipéridyl)-N'-[3-(nitro)phényl]urée ***(12)*** 176

N-(1-Benzyl-3-pipéridyl)-N'-[4-(méthoxy)phényl]urée ***(13)*** 176

N-(1-Benzyl-3-pipéridyl)-N'-(2-naphtyl)urée ***(14)*** 177

Synthèse du composé 15..... 178

1-Phényl-3-pipéridine-4-ylurée ***(15)*** 178

Synthèse des composés 16 et 17..... 179

1-(1-Pentyl-pipéridine-4-yl)-3-phénylurée ***(16)*** 180

1-(1-Napht-2-yl méthyl-pipéridine-4-yl)-3-phénylurée ***(17)*** 180

Synthèse des composés 18 et 19..... 181

1-(Biphenyl-2-yl)éthanone ***(18)*** 182

1-(Biphenyl-3-yl)éthanone ***(19)*** 182

Synthèse des composés 20 à 26..... 183

1-(2-Ethoxyphényl)éthanone ***(20)*** 184

1-(2-Propoxyphényl)éthanone ***(21)*** 184

1-(2-Butoxyphényl)éthanone ***(22)*** 185

1-(2-Pentyloxyphényl)éthanone ***(23)*** 185

1-(2-Hexyloxyphényl)éthanone ***(24)*** 186

1-(3-Pentyloxyphényl)éthanone ***(25)*** 186

1-(4-Pentyloxyphényl)éthanone ***(26)*** 187

Synthèse des composés 27 à 45..... 188

(Z)-4-(Biphenyl-2-yl)-2-hydroxy-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(27)*** 189

(Z)-4-(Biphenyl-3-yl)-2-hydroxy-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(28)*** 189

(Z)-2-Hydroxy-4-(2-méthoxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(29)*** 190

(Z)-2-Hydroxy-4-(2-éthoxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(30)*** 190

(Z)-2-Hydroxy-4-(2-propoxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(31)*** 191

(Z)-2-Hydroxy-4-(2-butoxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(32)*** 191

(Z)-2-Hydroxy-4-(2-pentyloxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(33)*** 192

(Z)-2-Hydroxy-4-(2-hexyloxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(34)*** 192

(Z)-2-Hydroxy-4-(3-pentyloxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(35)*** 193

(Z)-2-Hydroxy-4-(4-pentyloxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(36)*** 193

(Z)-2-Hydroxy-4-oxo-2-nonénoate d'éthyle ***(37)*** 194

(Z)-2-Hydroxy-4-oxo-4-phényl-2-butènoate d'éthyle ***(38)*** 194

(Z)-4-(4-Bromophényl)-2-hydroxy-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(39)*** 195

(Z)-4-(Biphényl-4-yl)-2-hydroxy-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(40)*** 195

(Z)-2-Hydroxy-4-oxo-4-(phénantren-2-yl)-2-butènoate d'éthyle ***(41)*** 196

(Z)-2-Hydroxy-4-(naphtalen-2-yl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(42)*** 196

(Z)-2-Hydroxy-4-oxo-4-p-tolyl-2-butènoate d'éthyle ***(43)*** 197

(Z)-2-hydroxy-4-oxo-4-(4-(trifluorométhyl)phényl)-2-butènoate d'éthyle ***(44)*** 197

(Z)-4-Adamantan-1-yl-2-hydroxy-4-oxo-2-butènoate d'éthyle ***(45)*** 198

Synthèse des composés 46 à 64..... 199

5-(Biphényl-2-yl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(46)*** 200

5-(Biphényl-3-yl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(47)*** 200

5-(2-Méthoxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(48)*** 201

5-(2-Ethoxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(49)*** 201

5-(2-Propoxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(50)*** 202

5-(2-Butoxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(51)*** 202

5-(2-Pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(52)*** 203

5-(2-Hexyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(53)*** 203

5-(3-Pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(54)*** 204

5-(4-Pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(55)*** 204

5-Pentylisoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(56)*** 205

5-Phénylisoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(57)*** 205

5-(4-Bromophényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(58)*** 206

5-(Biphenyl-4-yl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(59)*** 206

5-(Phenantren-2-yl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(60)*** 207

5-(Naphtalen-2-yl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(61)*** 207

5-p-Tolylisoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(62)*** 208

5-(4-(Trifluorométhyl)phényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(63)*** 208

5-Adamantan-1-ylisoxazole-3-carboxylate d'éthyle ***(64)*** 209

Synthèse des composés 65 à 83..... 210

Acide 5-(biphényl-2-yl)isoxazole-3-carboxylique ***(65)*** 211

Acide 5-(biphényl-3-yl)isoxazole-3-carboxylique ***(66)*** 211

Acide 5-(2-méthoxyphényl)isoxazole-3-carboxylique ***(67)*** 212

Acide 5-(2-éthoxyphényl)isoxazole-3-carboxylique ***(68)*** 212

Acide 5-(2-propoxyphényl)isoxazole-3-carboxylique ***(69)*** 213

Acide 5-(2-butoxyphényl)isoxazole-3-carboxylique ***(70)*** 213

Acide 5-(2-pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylique ***(71)*** 214

Acide 5-(2-hexyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylique ***(72)*** 214

Acide 5-(3-pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylique ***(73)*** 215

Acide 5-(4-pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylique ***(74)*** 215

Acide 5-pentylisoxazole-3-carboxylique ***(75)*** 216

Acide 5-phénylisoxazole-3-carboxylique ***(76)*** 216

Acide 5-(4-bromophényl)isoxazole-3-carboxylique ***(77)*** 217

Acide 5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxylique ***(78)*** 217

Acide 5-(phénantren-2-yl)isoxazole-3-carboxylique ***(79)*** 218

Acide 5-(naphtalen-2-yl)isoxazole-3-carboxylique ***(80)*** 218

Acide 5-p-tolylisoxazole-3-carboxylique ***(81)*** 219

Acide 5-(4-(trifluorométhyl)phényl)isoxazole-3-carboxylique ***(82)*** 219

Acide 5-(adamantan-1-yl)isoxazole-3-carboxylique ***(83)*** 220

Synthèse des composés 84 à 92 221

5-Phényl-N-(3-phénylpropyl)isoxazole-3-carboxamide ***(84)*** 222

5-(4-Bromophényl)-N-(3-phénylpropyl)isoxazole-3-carboxamide ***(85)*** 222

5-(Biphényl-4-yl)-N-(3-phénylpropyl)isoxazole-3-carboxamide ***(86)*** 223

5-(Phénantren-2-yl)-N-(3-phénylpropyl)isoxazole-3-carboxamide ***(87)*** 223

5-(Naphtalen-2-yl)-N-(3-phénylpropyl)isoxazole-3-carboxamide ***(88)*** 224

N-(3-phénylpropyl)-5-p-tolylisoxazole-3-carboxamide ***(89)*** 224

N-(3-phénylpropyl)-5-(4-(trifluorométhyl)phényl)isoxazole-3-carboxamide ***(90)*** 225

5-(Biphényl-4-yl)-N-phénéthylisoxazole-3-carboxamide ***(91)*** 225

N-Benzyl-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(92)*** 226

Synthèse des composés 93 à 103 227

N-(2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-phénylisoxazole-3-carboxamide ***(93)*** 228

N-(2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(4-bromophényl)isoxazole-3-carboxamide ***(94)*** 228

N-(2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(95)*** 229

N-(2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(naphtalen-2-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(96)*** 229

N-(2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-p-tolylisoxazole-3-carboxamide ***(97)*** 230

N-(2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(4-(trifluorométhyl)phényl)isoxazole-3-carboxamide ***(98)*** 230

N-(2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(biphényl-2-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(99)*** 231

N-(2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(biphényl-3-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(100)*** 231

N-(2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(adamantan-1-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(101)*** 232

N-(2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)méthyl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(102)*** 232

N-(2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(103)*** 233

Synthèse des composés 104 à 109..... 234

N-(Adamantan-1-yl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(104)*** 235

N-(1-(Naphtalen-1-yl)éthyl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(105)*** 235

N-(4-Phénylbutan-2-yl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(106)*** 236

N-(1,2,3,4-Tétrahydronaphtalèn-1-yl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(107)*** 236

N-(1-Phényléthyl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(108)*** 237

N-(2-Phénylpropyl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide ***(109)*** 237

Synthèse des composés 110 à 123..... 238

N-(Adamantan-1-yl)-5-phénylisoxazole-3-carboxamide ***(110)*** 239

N-(Adamantan-2-yl)-5-phénylisoxazole-3-carboxamide ***(111)*** 239

N-(Adamantan-1-ylméthyl)-5-phénylisoxazole-3-carboxamide ***(112)*** 240

N-(Adamantan-1-yl)-5-(2-méthoxyphényl)isoxazole-3-carboxamide ***(113)*** 240

N-(Adamantan-1-yl)-5-(2-éthoxyphényl)isoxazole-3-carboxamide ***(114)*** 241

N-(Adamantan-1-yl)-5-(2-propoxyphényl)isoxazole-3-carboxamide ***(115)*** 241

N-(Adamantan-1-yl)-5-(2-butoxyphényl)isoxazole-3-carboxamide ***(116)*** 242

N-(Adamantan-1-yl)-5-(2-pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxamide ***(117)*** 242

N-(Adamantan-1-yl)-5-(2-hexyloxyphényl)isoxazole-3-carboxamide ***(118)*** 243

N-(Adamantan-1-yl)-5-(3-pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxamide ***(119)*** 243

N-(Adamantan-1-yl)-5-(4-pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxamide ***(120)*** 244

N-(Adamantan-1-yl)-5-pentylisoxazole-3-carboxamide ***(121)*** 244

N-Cyclohexyl-5-(2-(pentyloxy)phényl)isoxazole-3-carboxamide ***(122)*** 245

N-(Pipéridin-1-yl)-5-(2-(pentyloxy)phényl)isoxazole-3-carboxamide ***(123)*** 245

Partie expérimentale pharmacologie..... 246

Partie expérimentale modélisation moléculaire..... 250

- LISTE DES ABREVIATIONS –

AA……. Acide arachidonique

$ABHD_4$…… α/β-Hydrolase 4

Abn-CBD……. Cannabidiol anormal

ABP……. Acyl chain binding pocket

AC…… Adénylate cyclase

AChE……. Acétylcholinestérase

AcOEt…… Acétate d'éthyle

ADN……. Acide désoxyribonucléique

AEA…… Anandamide

2-AG……. 2-Arachidonoylglycérol

AMM…… Autorisation de mise sur le marché

AMPc…… Adénosine monophosphate cyclique

APTS……. Acide para-toluène sulfonique

ARA-S…….. *N*-arachidonoylsérine

ARN……. Acide ribonucléique

5-ASA…….. Acide 5-aminosalicylique

AT…….. Anandamide transporter

ATFMK…… Arachidonoyltrifluoromethyl ketone

ATP…… Adénosine triphosphate

BACAT……. Bile acid coenzyme A transferase

BNTP……. *(E)*-6-(Bromométhylène)tétrahydro-3-(1-naphtalényl)-2*H*-pyran-2-one

Boc……. *tert*-Butoxycarbonyle

BSA…….. Bovine serum albumine

CB1…… Récepteur aux cannabinoïdes de type 1

CB2…… Récepteur aux cannabinoïdes de type 2

CBAH…… Conjugated bile acid hydrolase

CCM……. Chromatographie sur couche mince

$CDCl_3$……. Chloroforme deutéré

CHO…… Chinese hamster ovarian cells

CMH…….. Complexe majeur d'histocompatibilité

COX…… Cyclooxygénase

DAG…… Diacylglycérol

DAGL…… Diacylglycérol lipase

DIEA…… *N,N*-Diisopropyléthylamine

DMF…… Diméthylformamide

DMSO-d6…… Diméthylsulfoxyde deutéré

DNBS…… Acide 2,4-dinitrobenzène sulfonique

DSS…… Sulfate de dextran sodique

EC-T…… Transporteur des endocannabinoïdes

EDCI…… 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

Eq…… Equivalent

ERK…… Extracellular signal-regulated kinase

EtOH…… Ethanol

EtONa…… Ethanolate de sodium

FAAH…… Fatty acid amide hydrolase

FAK…… Focal adhesion kinase

FAN…… Factor associated with neutral sphingomyelinase activation

GDE1…… Glycérophosphodiestérase de type 1

GP-NAE…… Glycérophospho-*N*-acyléthanolamine

GPR55…… G protein-coupled receptor 55

GTPγS…… Guanosine triphophase radiomarqué

HBTU…… Hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1-3,3-tétraméthyluronium

HOBt…… 1-Hydroxybenzotriazole

IL1-β…… Interleukine 1-β

IP…… Intrapéritonéale

IP_3…… Inositol-(1,4,5)-triphosphate

JNK…… c-Jun *N*-terminal-kinase

LC-MS…… Liquid chromatography mass spectroscopy

LT…… Lymphocyte T

Lyso-PI…… Lysophosphatidylinositol

Lyso-PLC…… Lyso-phospholipase de type C

Lyso-PLD…… Lyso-phospholipase de type D

MAC…… Membrane access channel

MAE2…… Malonamidase

MAFP…….. Methylarachidonoylfluorophosphonate

MAGL…….. Monoacylglycérol lipase

MAP-Kinase……. Mitogen activated protein kinase

MeCN……. Acétonitrile

MeOH……. Méthanol

MGG…….. Coloration de type May-Grunwald-Giemsa

MICI……. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MPO…… Myélopéroxidase

NAAA……. *N*-Acylethanolamine acyl amidase

NADA…….. *N*-Arachidonoyldopamine

NAE…….. *N*-Acyléthanolamine

NAPE…….. *N*-Acylphosphatidyléthanolamine

NAPE-PLD…… NAPE-sélective phospholipase D

NAT…….. *N*-Acyltransférase

NFAT…… Nuclear factor of activated T-cells

NT-R……. Récepteur des neurotransmetteurs

OγBr……. 2-Octyl-γ-bromoacétoacétate

PA……. Acide phosphatidique

PA-hydrolase……. Phosphatidic acid hydrolase

PAM……. Peptidylglycine α-amidating moxooxygenase

PCR…….. Amplification en chaîne par polymérase

PE…….. Phosphatidyléthanolamine

PEA…….. Palmitoyléthanolamide

PEI…… Poly(éthylèneimine)

PFAM……. Primary fatty acid amides

PI…….. Phosphatidylinositol

PI_3K……. Phosphatidyl inositol 3-kinase

PIP_2…….... Phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphate

PKA……. Proétine kinase A

PKB/AKT…….. Protéine kinase B

PKC…….. Protéine kinase C

PLA1…… Phospholipase A1

PLA2…… Phospholipase A2

PLC…… Phospholipase C

PLD…… Phospholipase D

PMSF…….. Phenylmethylsulfonyl fluoride

pNAE…… Phospho-*N*-acyléthanolamine

PPAR-α…….. Peroxisome proliferator-activated receptor α

PPRE…… Peroxisome proliferator responsive element

RCH…….. Rectocolite hémorragique

RCPG…… Récepteur couplé aux protéines G

Rf…… Rapport frontal

RMN……. Résonnance magnétique nucléaire

ROCK…….. Rho associated kinase

RSA…….. Relations structure-activité

RXR…….. Récepteur X des rétinoïdes

SEA…….. Stéaroyléthanolamide

SIDA……. Syndrome d'immunodéficience acquise

SPTase…… Sérine palmitoyltranférase

T°amb…… Température ambiante

TEA…….. Triéthylamine

TGH……. Triglycéride hydrolase

Th1…….. Lymphocyte T helper-1

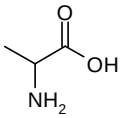
Δ^9-THC……. Δ^9-Tétrahydrocannabinol

TMS…….. Triméthylsilane

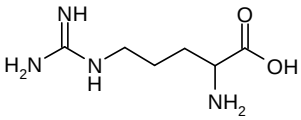
TNBS…….. Acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique

TNF-α…… Tumour necrosis factor

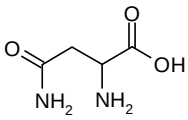
Trk……. Tyrosine kinase



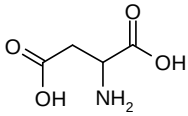
Alanine
Ala / A



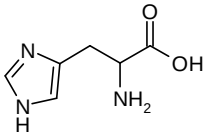
Arginine
(Arg / R)



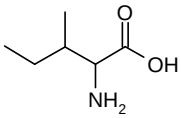
Asparagine
(Asn / N)



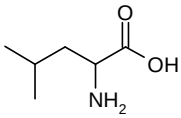
Acide Aspartique
(Asp / D)



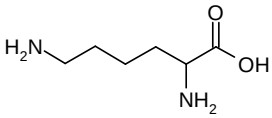
Histidine
(His / H)



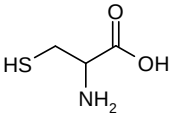
Isoleucine
(Ile / IL)



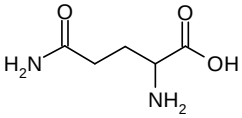
Leucine
(Leu / L)



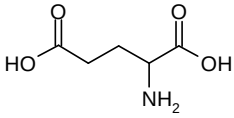
Lysine
(Lys / K)



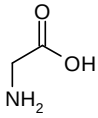
Cystéine
(Cys / C)



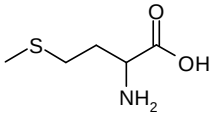
Glutamine
(Gln / Q)



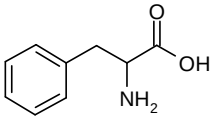
Acide Glutamique
(Glu / E)



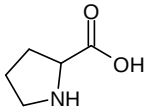
Glycine
(Gly / G)



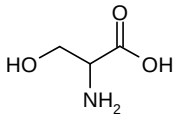
Méthionine
(Met / M)



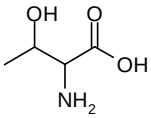
Phénylalanine
(Phe / F)



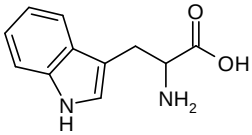
Proline
(Pro / P)



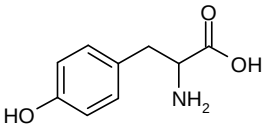
Sérine
(Ser / S)



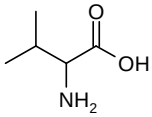
Thréonine
(Thr / T)



Tryptophane
(Trp / W)



Tyrosine
(Tyr / Y)



Valine
(Val / V)

A) Généralités sur les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin et sur le système endocannabinoïde

A. I) Généralités sur les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)

Maladies à caractère chronique liées à l'inflammation de l'intestin et dont l'origine est inconnue, les MICI évoluent par poussées entrecoupées de périodes de rémission et existent généralement sous deux formes :

- la maladie de Crohn, qui affecte l'ensemble du tube digestif (de la bouche à l'anus)

- et la rectocolite hémorragique (RCH) dont les lésions restent localisées au niveau du côlon.

I. 1) Epidémiologie, étiologie et aspects lésionnels de la maladie de Crohn et de la RCH

Les MICI affectent 2,5 millions de personnes dans le monde dont 200 000 en France. Sur ces 200 000 personnes, environ 120 000 sont atteintes de la maladie de Crohn et 80 000 souffrent de RCH. Par ailleurs, 5000 à 6000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France. Si aujourd'hui ce chiffre demeure stable, ce n'était pas le cas il y a une trentaine d'années puisqu'on estime qu'entre 1945 et 1980, l'incidence de ces maladies a été multipliée par 10 dans les pays industrialisés.

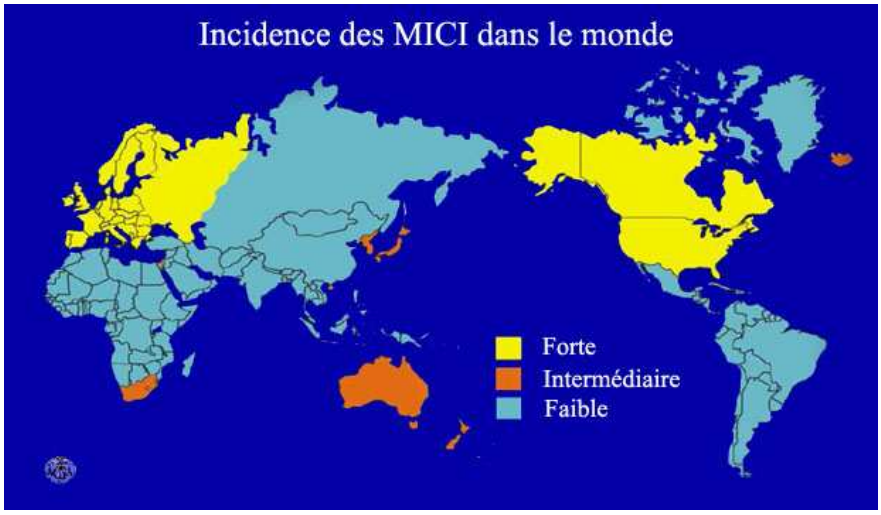


Figure A. 1. Répartition des cas de MICI à travers le monde

Ainsi on constate une disparité des cas de MICI dans le monde et les pays du Nord semblent nettement plus touchés que les pays du Sud. S'il est difficile d'expliquer ce phénomène, les chercheurs émettent cependant l'hypothèse que certains facteurs environnementaux comme la pollution, l'alimentation, le mode de vie ou encore le stress plus présents dans les pays développés ou en cours de développement, favoriseraient l'apparition de ces maladies.

La maladie de Crohn et la RCH affectent plus souvent les sujets jeunes et, dans un quart des cas, l'ensemble des symptômes apparaît avant l'âge de 25 ans. Il existe également une disparité selon le sexe du sujet et il semble que le ratio femmes sur hommes pour la maladie de Crohn soit de 0.9 tandis que celui relatif à la RCH soit de 0.5.

Bien que les causes de ces maladies demeurent encore inconnues à ce jour, il apparait que ces pathologies multifactorielles impliquent des facteurs environnementaux tels que ceux cités précédemment auxquels peut se rajouter le tabac sur un terrain prédisposé génétiquement. En effet, une étude réalisée sur une population représentative de jumeaux homo- et hétérozygotes a permis de mettre en évidence que, pour la maladie de Crohn, le taux de concordance chez les homozygotes (58.3 %) était significativement supérieur à celui observé chez les hétérozygotes (6.3 %). Cette découverte a donc naturellement incité les scientifiques à rechercher les gènes susceptibles d'influencer le développement des MICI. Sur ces bases, trois équipes européennes et américaines ont mis en évidence en 2001, le premier gène de susceptibilité pour la maladie de Crohn. Il s'agit du gène NOD2/CARD15.[1,2,3] Plus récemment, deux autres gènes de susceptibilité ont été identifiés sur les chromosomes 5 et 10 et nommés respectivement OCTN et DLG5.[4,5] Il semblerait ainsi que les MICI fassent partie des pathologies oligogéniques.

La maladie de Crohn et la RCH partagent de nombreuses similitudes épidémiologiques et étiologiques. Toutefois ces pathologies diffèrent de part la localisation et la profondeur des lésions : tandis que la maladie

---

[1] Hugot J. P., Chamaillard M., Zouali H., Lesage S., Cézard J. P., Belaiche J., Almer S., Tysk C., O'Morain C. A., Gassull M., Binder V., Finkel Y., Cortot A., Modigliani R., Laurent-Puig P., Gower-Rousseau C., Macry J., Colombel J. F., Sahbatou M., Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature,* **2001,** *411,* 599-603

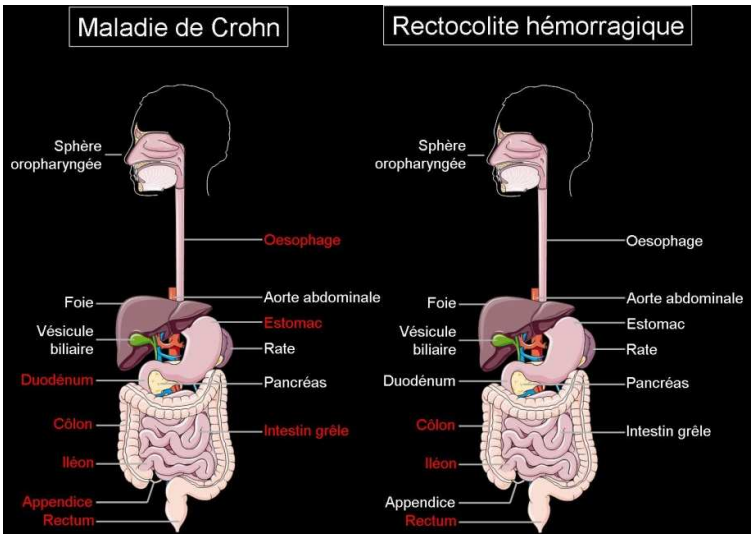
[2] Ogura Y., Bonen D. K., Inohara N., Nicolae D. L., Chen F. F., Ramos R., Britton H., Moran T., Karaliuskas R., Duerr R. H., Achkar J. P., Brant S. R., Bayless T. M., Kirschner B. S., Hanauer S. B., Nuñez G., Cho J. H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature,* **2001,** *411,* 603-606

[3] Hampe J., Cuthbert A., Croucher P. J., Mirza M. M., Mascheretti S., Fisher S., Frenzel H., King K., Hasselmeyer A., MacPherson A. J., Bridger S., van Deventer S., Forbes A., Nikolaus S., Lennard-Jones J. E., Foelsch U. R., Krawczak M., Lewis C., Schreiber S., Mathew C. G. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet,* **2001,** *357,* 1925-1928

[4] Stoll M., Corneliussen B., Costello C. M., Waetzig G. H., Mellgard B., Koch W. A., Rosenstiel P., Albrecht M., Croucher P. J., Seegert D., Nikolaus S., Hampe J., Lengauer T., Pierrou S., Foelsch U. R., Mathew C. G., Lagerstrom-Fermer M., Schreiber S. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.,* **2004,** *36,* 476-480

[5] Peltekova V. D., Wintle R. F., Rubin L. A., Amos C. I., Huang Q., Gu X., Newman B., Van Oene M., Cescon D., Greenberg G., Griffiths A. M., St George-Hyslop P. H., Siminovitch K. A. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat. Genet.,* **2004,** *36,* 471-475

de Crohn affecte de manière discontinue l'ensemble du tube digestif, la RCH, quant à elle, se limite à l'atteinte continue du rectum et du côlon. Ainsi, des intervalles de muqueuse saine observables chez le patient atteint de la maladie de Crohn se révèlent inexistants chez celui atteint de RCH. Au niveau macroscopique, la maladie de Crohn affecte le tube digestif de manière asymétrique : les bords mésentériques de l'intestin sont plus touchés et, alors que pour la RCH les lésions sont relativement homogènes, on observe une diversité lésionnelle en cas de maladie de Crohn. Enfin, au niveau microscopique, on observe chez le patient atteint de maladie de Crohn, des infiltrations lymphoplasmocytaires avec conservation de la mucosécrétion tandis qu'en cas de RCH, on relève des infiltrations de polynucléaires sous forme de cryptites accompagnées d'une diminution de la mucosécrétion.



Maladie de Crohn	RCH
Topographie	
- anus, rectum, côlon - grêle, duodenum, estomac - atteinte discontinue	- rectum toujours atteint - côlon - atteinte continue
Macroscopie	
- intervalles de muqueuse saine - asymétrie (bord mésentérique de l'intestin +++) - hétérogénéité lésionnelle - type : - érythème en plaque ou en bande - ulcération (aphtoïde superficielle ou profonde) - fistules - sténoses - sclérolipomatose	- pas d'intervalles de muqueuse saine - homogénéité des lésions - type : - aspect granité, fragile (sang en nappes) - pus, glaires - ulcérations
Microscopie	
- infiltration lymphoplasmocytaire - granulome tuberculoïde (10 %) - conservation de la mucosécrétion	- infiltration de PN -> cryptites - congestion (puits capillaires) - diminution de la mucosécrétion

Tableau A. 1. Aspects lésionnels de la maladie de Crohn et de la RCH

Du fait des nombreuses lésions qu'induisent les MICI, un certain nombre de symptômes propres leur est associé.

I. 2) Symptômes et complications associés aux MICI

La maladie de Crohn et la RCH sont souvent à l'origine de symptômes gênants altérant la qualité de vie du patient et responsables du caractère prohibé de ces pathologies. Dans les deux cas, les symptômes les plus fréquents sont des douleurs coliques, des diarrhées parfois sanglantes et de la fièvre. En cas de maladie de Crohn, le patient peut également présenter un amaigrissement ainsi qu'une atteinte systémique des articulations, de l'œil, de la peau ou encore du foie. Le patient souffrant de RCH, quant à lui, présente souvent un syndrome rectal avec de faux besoins et émissions de glaires sanglantes. Il peut également s'exposer à une pâleur excessive associée à de la tachycardie.

Plusieurs complications sont parfois observables en fonction de la pathologie. Ainsi, pour la maladie de Crohn, les complications associées sont les fistules (ano-périnéales, recto-vaginales ou encore entéro-entérales…), les abcès, la perforation en péritoine libre, la sténose iléale, le délabrement sphinctérien anal, la dénutrition ainsi qu'un risque relativement peu important d'évolution vers un cancer du grêle ou du côlon. En revanche, pour la RCH, le risque relatif de cancérisation est important et dépend de l'ancienneté ainsi que de l'étendue de la maladie. Une surveillance sous forme de coloscopie est donc nécessaire. D'autres complications peuvent également survenir comme la colectasie, la perforation et l'hémorragie.

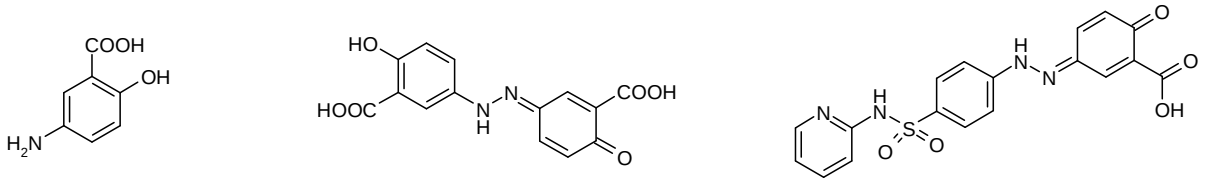
Les symptômes et les complications associés aux MICI sont donc très invalidants et nécessitent une prise en charge rapide de la maladie.

I. 3) Prise en charge et traitements des MICI

Les MICI résultent d'une réponse immunitaire inadaptée à l'encontre des bactéries de la flore intestinale, qui, chez le sujet sain sont considérées comme du soi. Ainsi, la réponse immunitaire intestinale est perpétuée par le maintien de l'activation des lymphocytes T et le dérèglement du ratio cytokines pro-inflammatoires sur cytokines anti-inflammatoires. Les nombreuses cytokines pro-inflammatoires secrétées en cas de MICI telles que le TNF-α ou l'IL-1β activent à long terme la fibrogénèse, la production de collagène et les métalloprotéases tissulaires ce qui conduit inéluctablement à des remaniements de la muqueuse. Par conséquent, la plupart des traitements envisagés en cas de maladie de Crohn et de RCH vise à rétablir l'équilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Par ailleurs, les MICI sont des maladies évoluant par poussées entrecoupées de périodes de rémission et les traitements envisagés doivent non seulement prendre en charge l'épisode de poussée mais également prévenir la récidive.

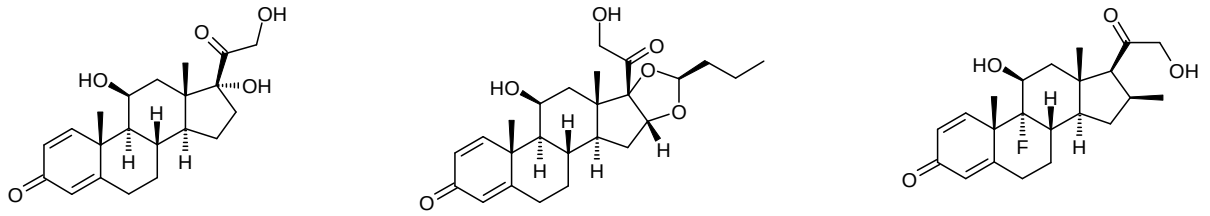
De ce fait, les dérivés 5-aminosalycilés tels que le Pentasa®,[6] le Rowasa®, le Dipentum® ou encore la Salazopyrine® sont prescrits en première intention chez 85 % des patients atteints de MICI, ceci en raison de leur bonne tolérance et des faibles effets secondaires qu'ils présentent.



Mésalazine (Pentasa® et Rowasa®) | Olsalazine (Dipentum®) | Sulfasalazine (Salazopyrine®)

Figure A. 2. Formules chimiques des principaux 5-aminosalycilés

En deuxième intention ou en cas de poussées graves, des corticoïdes tels que le Cortangyl®,[7] le Solupred®, l'Entocort® ou encore le Betnésol® sont prescrits. Ces molécules possèdent une efficacité supérieure à celle des 5-aminosalycilés, mais induisent des effets indésirables plus importants.



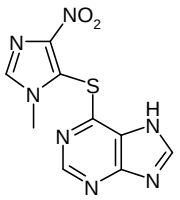
Prednisolone (Cortangyl® et Solupred®) | Budésonide (Entocort®) | Bétaméthasone (Bétnésol®)

Figure A. 3. Formules chimiques des principaux corticoïdes utilisés dans le traitement des MICI

[6] Karagozian R., Burakoff R. The role of mesalamine in the treatment of ulcerative colitis. *Ther. Clin. Risk Manag.,* **2007,** *3,* 893-903

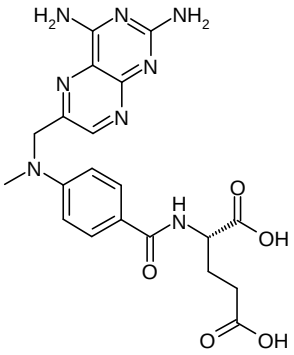
[7] Ardizzone S., Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J. Intern. Med.,* **2002,** *252,* 475-496

Au cœur d'un traitement d'entretien visant à prévenir l'apparition de nouvelles poussées, sont retrouvés les immunosuppresseurs tels que l'Imurel®[7] ou le Méthotrexate®.



Azathioprine

(Imurel®)



Méthotrexate

(Méthotrexate®)

Figure A. 4. Formules chimiques des immunosuppresseurs utilisés en traitement d'entretien

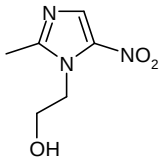
Toutefois ces traitements demeurent coûteux et leur action n'est pas immédiatement observable. Il faut en effet attendre 3 mois avant de constater une amélioration chez le patient sous Imurel®.

On estime que pour 10 % des patients en échec thérapeutique avec les corticoïdes et les immunosuppresseurs, les biothérapies ciblées telles que les anticorps monoclonaux anti-TNF-α (Rémicade®)[8] sont envisageables. Ainsi, les biothérapies constituent aujourd'hui une excellente alternative face à des formes sévères de MICI comportant des risques de lésions perforantes ou de sténoses.

Qu'il s'agisse de la maladie de Crohn ou de la RCH, la chirurgie est souvent envisagée. En effet, 90 % des patients souffrant de la maladie de Crohn sont opérés au moins une fois, ceci afin d'enlever la partie la plus atteinte du tube digestif. Toutefois, chez ces patients, l'ablation partielle du tube digestif ne constitue qu'une solution à court terme puisqu'on estime le taux de récidive endoscopique un an après la chirurgie à 80 %. En revanche, pour les patients souffrant de formes aigües de RCH, la colectomie totale peut, si elle ne conduit pas à une guérison totale, amener à un meilleur confort digestif.

[8] Wilhelm S., MacKenney K., Rivait K., Kale-Pradhan P. A review of Infliximab use in ulcerative colitis. *Clin. Ther.,* **2008,** *30,* 223-230

Enfin, le Flagyl®, un antibiotique de la famille des nitroimidazoles présente une action immunomodulatrice (surtout en ano-périnéal) mais doit toutefois être utilisé sur de courtes périodes du fait de sa capacité à induire des neuropathies périphériques.



Métronidazole

(Flagyl®)

Figure A. 5. Formule chimique du Flagyl®

Les traitements des MICI sont fonction de la sévérité de la maladie et peuvent être représentés sous forme de pyramides dont la base serait constituée par les traitements de première intention (les 5-aminosalycilés) et la pointe par les traitements de dernière intention (anticorps anti-TNF-α et chirurgie).

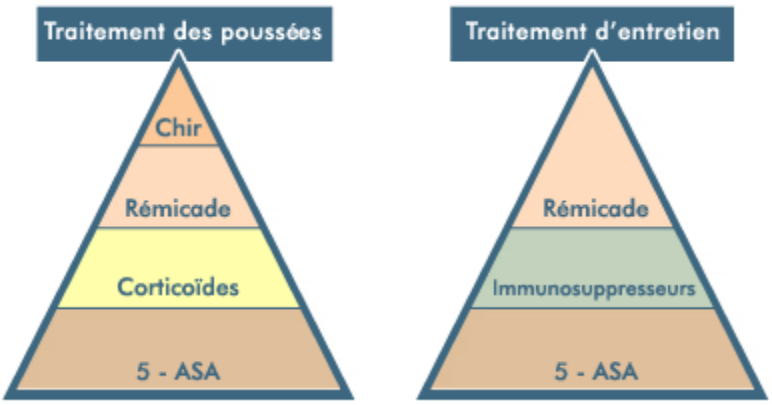


Figure A. 6. Pyramides des traitements utilisés en cas de MICI

Bien que depuis plusieurs années l'avancée des recherches sur le plan thérapeutique soit considérable, il n'en résulte pas moins que le nombre de traitements actuellement disponibles sur le marché demeure relativement faible. De plus, les traitements disponibles manquent parfois d'efficacité, se révèlent pour

certains coûteux (cas du Rémicade®) et nécessitent du fait de leur mode d'administration, une prise en charge importante du patient (cas des immunosuppresseurs). C'est pourquoi, il est nécessaire d'étoffer le nombre de médicaments en découvrant de nouvelles classes thérapeutiques qui soient facilement administrables au patient et présentant une efficacité supérieure à celle des molécules déjà commercialisées.

Actuellement, les recherches s'orientent essentiellement vers le développement de nouvelles biothérapies et de nouveaux anticorps monoclonaux anti-TNF-α, comme l'Adalimumab (Humira®)[9] et le Certolizumab pegol (CDP870, Cimzia®),[10] ont déjà fait leur apparition sur le marché. Par ailleurs, l'association de biothérapies avec un immunosuppresseur semble prometteuse mais le recul n'est pas suffisant pour envisager la modification des habitudes thérapeutiques.

Une nouvelle génération de dérivés 5-aminosalycilés est actuellement en cours d'étude. Ces nouvelles molécules plus efficaces, posséderaient des propriétés anti-inflammatoires et préventives face au développement éventuel d'un cancer.

D'autres classes thérapeutiques ciblant d'autres facteurs de l'inflammation seraient également susceptibles de venir compléter les traitements existants. Il s'agit, entre autres, des anticorps anti-CD4 et anti-IL-6.[7,11]

L'utilisation de probiotiques induisant la production de facteurs antibactériens aboutissant au rétablissement de l'homéostasie intestinale est également une piste prometteuse.[7]

Aujourd'hui, de nombreuses études démontrent l'importance du rôle régulateur du système endocannabinoïde chez les patients atteints de MICI. En effet, ce système physiologique a non seulement été mis en évidence au sein du tractus gastro-intestinal mais l'ensemble de ses acteurs se retrouve surexprimé chez les patients atteints de MICI.[12,13,14] Ainsi, plusieurs études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence le rôle bénéfique exercé par le système endocannabinoïde sur l'inflammation intestinale.[13,15,16,17] Il apparaît donc que le système endocannabinoïde constitue une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des MICI.

---

[9] Veres G., Putz R., Szabó D., Molnár K., Bodánszky H., Dezsofi A., Arató A. Adalimumab treatment in infliximab-resistant pediatric patient with Crohn's disease. *Orv. Hetil.,* **2009,** *150,* 1858-1860
[10] Molnár T. TNF-alpha blocking therapy in chronic inflammatory bowel disease. *Orv. Hetil.,* **2009,** *150,* 1773-1779
[11] Flamant M., Bourreille A. Biologic therapies in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.,* **2007,** *28,* 852-861
[12] Di Marzo V., Izzo A. A. Endocannabinoid overactivity and intestinal inflammation. *Gut,* **2006,** *55,* 1373-1376
[13] Wright K., Rooney N., Feeney M., Tate J., Robertson D., Welham M., Ward S. Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology,* **2005,** *129,* 437-453
[14] Marquéz L., Suárez J., Iglesias M, Bermudez-Silva F. J., Rodríguez de Fonseca F., Andreu M. Ulcerative colitis induces changes on the expression of the endocannabinoid system in the human colonic tissue. *PloS One,* **2009,** *4*, e6893
[15] Engel M. A., Kellermann C. A., Rau T., Burnat G., Hahn E. G., Konturek P. C. Ulcerative colitis in AKR mice is attenuated by intraperitoneally administered anandamide. *J. Physiol. Pharmacol.,* **2008,** *59,* 673-689

A. II) Généralités sur le système endocannabinoïde

II. 1) Le cannabis : de l'utilisation ancestrale à l'utilisation thérapeutique…

Le cannabis est l'une des plus anciennes plantes cultivées par l'Homme. A l'origine, son berceau de culture s'étendait des steppes d'Asie centrale à la Chine où l'empereur Shen Nung préconisait l'utilisation de la plante dans le traitement des douleurs, des spasmes, des crampes mais aussi des nausées et des insomnies.[18] Puis, de Chine, l'usage du chanvre s'est répandu vers l'Inde et les pays voisins. La plante devint alors la base de préparations religieuses utilisées par les fidèles désireux d'atteindre l'union avec les divinités au cours de rites et de cérémonies. A travers ces usages, ce sont les pouvoirs hallucinogènes et enivrants du cannabis qui sont vantés. On entrevoit ainsi les premières utilisations toxicomanes de la plante.

Le cannabis contient plus de 489 substances chimiques connues mais les effets psychotropes recherchés par les indiens sont essentiellement dus au (-)-Δ^9-tétrahydrocannabinol (Δ^9-THC), son principal composé psychoactif mis en évidence en 1964 par Gaoni et Mechoulam.[19]

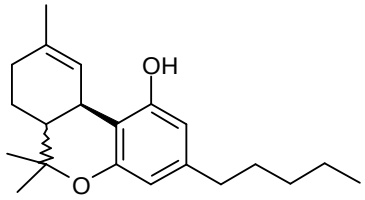


Figure A. 7. Structure chimique du Δ^9-THC

De nos jours, l'usage du cannabis est principalement récréatif. Toutefois, aux Etats-Unis et au Canada, deux préparations pharmaceutiques utilisant le Δ^9-THC, le Marinol® et le Césamet® sont prescrites pour le contrôle des nausées et des vomissements engendrés par la chimiothérapie et pour la stimulation de l'appétit chez les patients atteints du SIDA. En Suisse, des scientifiques testent l'utilisation du cannabis chez

[16] Storr M. A., Keenan C. M., Emmerdinger D., Zhang H., Yüce B., Sibaev A., Massa F., Buckley N. E., Lutz B., Göke B., Brand S., Patel K. D., Sharkey K. A. Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB1 and CB2 receptors. *J. Mol. Med.,* **2008,** *86,* 925-936

[17] Storr M. A., Keenan C. M., Zhang H., Patel K. D., Makriyannis A., Sharkey K. A. Activation of the cannabinoid 2 receptor (CB2) protects against experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.,* **2009,** *15,* 1678-1685

[18] Lambert D. M. Les vertus thérapeutiques du cannabis à travers les millénaires. *J. Pharm. Belg.,* **2002,** *57,* 21-29

[19] Gaoni Y. Mechoulam R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.,* **1964,** *86,* 1647-1657

des patients atteints de sclérose en plaques. Depuis 1997, l'Arizona et la Californie ont autorisé la consommation de cigarettes de marijuana à but thérapeutique. En juin 2005, un spray oral, le Sativex®, dont les principes actifs sont le Δ^9-THC et le cannabidiol, a reçu une AMM au Canada dans le traitement des douleurs neuropathiques résistantes chez l'adulte atteint de sclérose en plaques. Cette solution s'est avérée une bonne alternative à la consommation de cigarettes à base de cannabis qui à long terme, peuvent entraîner un cancer du poumon.

Si les anglais étudient également la mise sur le marché d'un tel spray, la France quant à elle, semble relativement fermée à l'utilisation thérapeutique du cannabis. La solution serait donc de mettre au point synthétiquement des molécules possédant les effets thérapeutiques du cannabis sans en posséder les effets indésirables. Pour cela, il est nécessaire de comprendre et d'étudier le mécanisme d'action du Δ^9-THC.

Le Δ^9-THC se lie à un récepteur membranaire appelé CB1. Ce récepteur, mis en évidence en 1988 et cloné en 1990,[20] forme avec son homologue, le récepteur CB2, l'exigüe famille des récepteurs aux cannabinoïdes. CB1 et CB2 ne lient pas seulement des molécules exogènes comme le Δ^9-THC, mais possèdent leurs propres ligands endogènes regroupés sous l'appellation endocannabinoïdes. Avec les enzymes de biotransformation des ligands endogènes, CB1, CB2 et les endocannabinoïdes forment le très complexe système endocannabinoïde.

II. 2) Le système endocannabinoïde

Comme énoncé précédemment, le système endocannabinoïde se compose de ligands endogènes appelés endocannabinoïdes, de récepteurs capables de lier ces molécules ainsi que des systèmes de biotransformation impliqués dans la biosynthèse et la biodégradation des ligands.

2. 1) Les récepteurs aux cannabinoïdes

Actuellement, deux récepteurs aux cannabinoïdes ont été identifiés et clonés dans les tissus de mammifères. Toutefois, il semblerait que certains ligands des récepteurs CB1 et CB2 se lient également à un récepteur orphelin, GPR55.[21] Si certains auteurs considèrent cette protéine comme un nouveau récepteur aux

[20] Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C., Bonner T. Structure of a cannabinoid receptor functional expression of the cloned cDNA. *Nature,* **1990,** *346,* 561-564
[21] Pertwee R. G. GPR55 : a new member of the cannabinoid receptor clan ? *Br. J. Pharmacol.,* **2007,** *152,* 984-986

cannabinoïdes, rien ne permet encore de l'affirmer.[22] C'est pourquoi, nous nous limiterons à la description des récepteurs CB1 et CB2.

1. a) Le récepteur CB1

a. α) Structure bidimensionnelle

Mis en évidence en 1988 grâce aux travaux de Devane et son équipe,[23] le récepteur CB1 cloné deux ans plus tard,[19] est composé de 472 acides aminés chez l'Homme.[24] L'alignement de sa séquence avec celles d'autres récepteurs révèle qu'il appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Ainsi, CB1 comprend une extrémité *N*-terminale extracellulaire ponctuée de divers sites de glycosylation, une extrémité *C*-terminale intracellulaire et sept hélices α transmembranaires reliées entre elles par des boucles intra- et extracelullaires.[25]

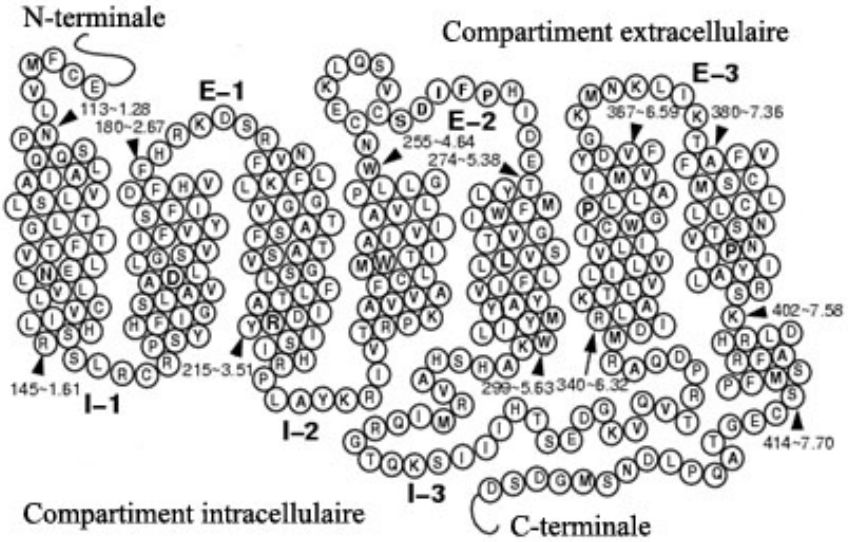


Figure A. 8. Structure 2D du récepteur CB1

[22] Petitet F., Donlan M., Michel A. GPR55 as a new cannabinoid receptor : still a long way to prove it. *Chem. Biol. Drug Des.,* **2006,** *67,* 252-253

[23] Devane W. A., Dysarz III F. A., Johnson M. R., Melvin L. S., Howlett A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.,* **1988,** *34,* 605-613

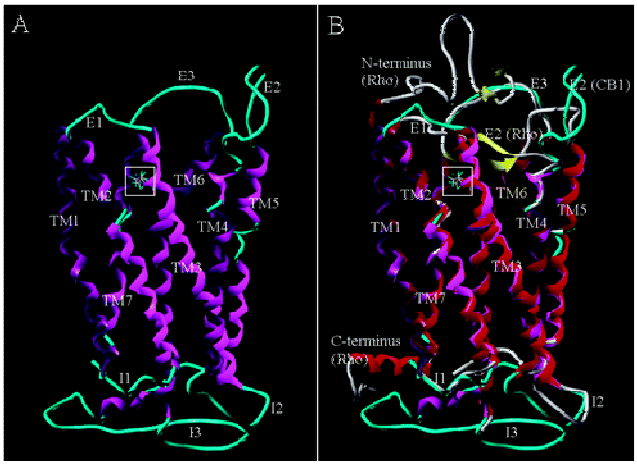
[24] Gerard C. M., Molereau C., Vassart G., Parmentier M. Molecular cloning of human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. J.,* **1991,** *279,* 129-134

[25] Svizenska I., Dubovy P., Sulcova A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures. *Pharmacol. Biochem. Behav.,* **2008,** *90,* 501-511

A ce jour, deux sous-types de récepteurs CB1 ont été identifiés : $CB1_A$ dont la séquence *N*-terminale semble avoir été altérée par épissage[26] et $CB1_B$ dont la partie *N*-terminale a subi la délétion de trente-trois acides aminés.[27] Ces deux sous-types de récepteurs étant nettement plus faiblement exprimés que le récepteur CB1, nous ne nous intéresserons par la suite qu'à ce dernier.

a. β) Structure tridimensionnelle et domaines de fixation du ligand

Actuellement, le récepteur CB1 n'a pas encore été cristallisé. Sa structure tridimensionnelle n'est donc pas encore clairement élucidée. Toutefois, en se basant sur des comparaisons successives avec les structures cristallines de la bactériorhodopsine[28] puis de la rhodopsine bovine,[29] les scientifiques ont pu mettre au point un modèle tridimensionnel théorique du récepteur CB1 utilisable en modélisation moléculaire.



A : structure de CB1 (violet) ; B : superposition des structures de CB1 (violet) et de la rhodopsine (rouge)

Code des couleurs : hélice α : violet (CB1) / rouge (rhodopsine) ; feuillets β : jaune (CB1) / blanc (rhodopsine)

Figure A. 9. Structure du modèle proposé pour CB1 et comparaison avec la rhodopsine

[26] Shire D., Carillon C., Kaghad M., Calandra B., Rinaldi-Carmona M., Le Fur G., Caput D., Ferara P. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J. Neuroimmunol.,* **1995,** *72,* 169-177

[27] Ryberg E., Vu H. K., Larsson N., Groblewski T., Hjorth S., Elebring T., Sjogren S., Greasley P. J. Identification and characterization of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Lett.,* **2005,** *579,* 259-264

[28] Mahmoudian M. the cannabinoid receptor : computer-aided molecular modelling and docking of ligand. *J. Mol. Graph. Model.,* **1997,** *15,* 149-153

[29] Palczewski K., Kumsaka T ;, Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le Trong I., Teller D. C., Okada T., Stenkamp R. E., Yamamoto M., Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science,* **2000,** *289,* 733-734

A l'état physiologique, il semblerait qu'il existe un équilibre entre deux formes limites du récepteur CB1 que sont la forme « inactive » (CB1-R) qui représenterait 70 % des récepteurs et la forme active (CB1-R*), qui représenterait 30 % des récepteurs.[30] Ainsi, les ligands dits « agonistes » des récepteurs tendraient à lier préférentiellement la forme CB1-R*, ceux de type « agonistes inverses », la forme CB1-R et les ligands « antagonistes vrais » lieraient indifféremment les deux formes du récepteur.[31]

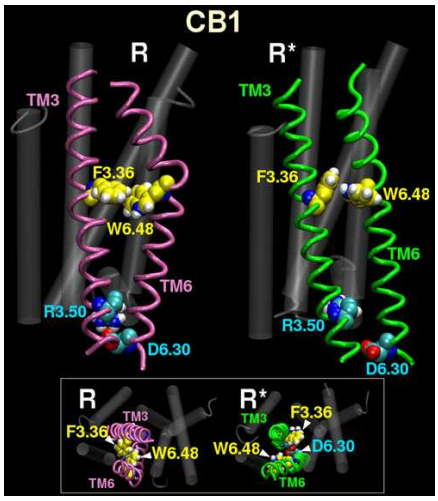


Figure A. 10. Structure tridimensionnelle du récepteur CB1 sous forme inactive (CB1-R) et sous forme active CB1-R*

Des études de modélisation moléculaire menées sur le récepteur CB1 ont rendu possible la description des interactions existant dans l'une ou l'autre des formes CB1-R et CB1-R*.

La forme inactive CB1-R se caractérise alors par l'existence d'un pont salin entre la lysine K3.28 et l'aspartate D6.58. Cette interaction est rendue possible par la présence dans l'hélice 6 de la glycine G6.49 qui induit la flexibilité de l'hélice, permettant à l'aspartate D6.58 d'être assez proche de la lysine K3.28 pour interagir.

Deux autres interactions de type « stacking aromatique » sont également observables dans la forme CB1-R : il s'agit de celle établie entre le tryptophane W6.48 et la phénylalanine F3.36 ainsi que de celle impliquant le tryptophane W5.43 et la phénylalanine F3.36.

[30] MacAllister S. D., Rizvi G., Anavi-Goffer S., Hurst D. P., Barnett-Norris J., Lynch D. L., Reggio P. H., Abood M. E. An aromatic microdomain at the cannabinoid CB1 receptor constitutes an agonist/inverse agonist binding region. *J. Med. Chem.,* **2003,** *46,* 5139-5152

[31] Kenakin T. Functional selectivity in GPCR modulator screening. *Comb. Chem. High Troughput Screen.,* **2008,** *11,* 337-343

Lors de l'activation du récepteur, la rotation des hélices 3 et 6 induit un changement conformationnel de la protéine à l'origine de la rupture du pont salin entre la lysine K3.28 et l'aspartate D6.58.[32] Ainsi, la lysine K3.28 se retrouve face à l'hélice 7 tandis que l'aspartate D6.58 se tourne vers l'hélice 6. Le stacking aromatique décrit précédemment entre la phénylalanine F3.36 et les tryptophanes W6.48 et W5.43 est également rompu au profit d'interactions de type « aromatique-aromatique » entre la tyrosine Y5.39 et les tryptophanes W4.46, W6.48 et W5.43.

La connaissance de ces interactions ainsi que la mise en évidence d'un domaine de fixation des ligands constitué des hélices 3, 4, 5 et 6 ont été primordiales pour la synthèse de nouveaux composés liant le récepteur CB1.

a. γ) Distribution du récepteur CB1

De nombreuses espèces de mammifères exprimant le récepteur CB1 telles que le rat, la souris, le porc, le chien, le singe et l'Homme ont été recensées, indiquant l'ancienneté phylogénétique de cette protéine.[24] CB1 est également l'un des récepteurs les plus abondants du système nerveux central[33] au point qu'initialement il était admis que cette protéine était exclusivement exprimée au niveau du cerveau.[34] Cependant, des études ultérieures ont mis en évidence l'existence de récepteurs CB1 dans certains tissus périphériques et notamment au niveau de l'appareil génito-urinaire (reins, placenta, testicules, prostate, utérus), du tractus gastro-intestinal (iléum, foie, pancréas, estomac), du tissu adipeux ainsi que des muscles squelettiques.[35,36] Enfin, l'absence de ces récepteurs au niveau des centres de contrôle cardiovasculaire et respiratoire explique l'absence de toxicité aigüe du cannabis vis-à-vis des fonctions vitales.[37]

[32] Singh R., Hurst D. P., Barnett-Norris J., Lynch D. L., Reggio P. H. GuarnerieriF. Activation of the cannabinoid CB1 receptor may involve W6.48/F3.36 rotamer toggle switch. *J. Pept. Res.,* **2002,** *60,* 357-370

[33] Breivogel C. S., Childers S. R. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptor. *Neurobiol. Dis.,* **1998,** *5,* 417-431

[34] Ameri A. The effects of cannabinoid on the brain. *Prog. Neurobiol.,* **1999,** *58,* 315-348

[35] Pertwee R. G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.,* **1997,** *74,* 129-180

[36] Di Marzo V., Bifulco M., De Petrocellis L. the endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov,* **2004,** *3,* 771-784.

[37] Walker J. M., Strangman N. M., Huang S. M. Cannabinoids and pain. *Pain Res. Manag.,* **2001,** *6,* 74-79

1. b) Le récepteur CB2

b. α) Structure bidimensionnelle

Cloné trois ans après le récepteur CB1 à partir de cellules leucémiques myélocytaires HL-60,[38] le récepteur CB2 est le deuxième sous-type de récepteurs aux cannabinoïdes connu à ce jour. Chez l'Homme, il est composé de 360 acides aminés et comme son homologue CB1, fait partie de la superfamille des RCPG.

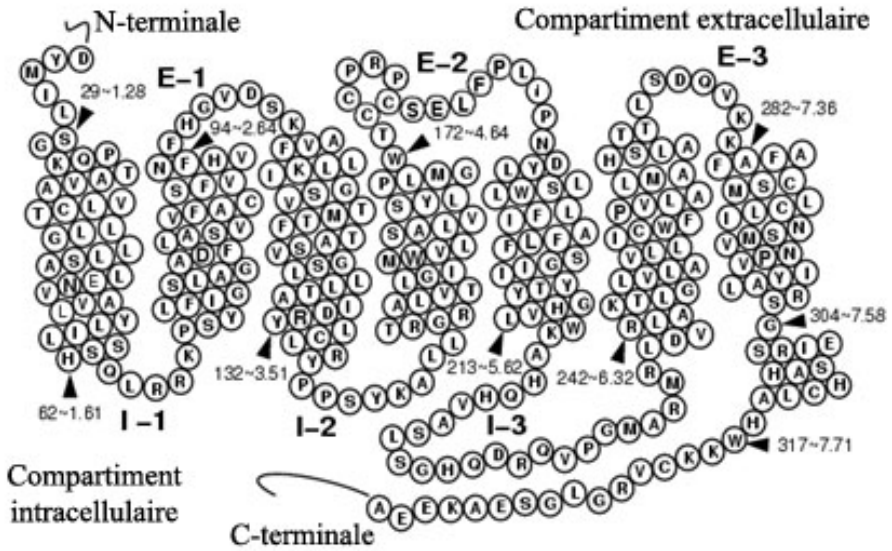


Figure A. 11. Structure 2D du récepteur CB2

L'alignement de la séquence peptidique du récepteur CB2 avec celle de CB1 a révélé que ces deux protéines présentent un pourcentage d'homologie total de 48 %.[39] Malgré cette homologie assez faible, les caractéristiques pharmacologiques des deux récepteurs sont assez proches et la plupart des ligands interagissant avec CB1, interagissent également avec CB2.[36]

[38] Munro S., Thomas K. L., Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature,* **1993,** *365,* 61-65

[39] Howlett A. C., Barth F., Bonner T. I., Cabral G., Casellas P., Devane W. A., Felder C. C., Herkenham M., Mackie K., Martin B. R., Mechoulam R., Pertwee R. G. International union of pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.,* **2002,** *54,* 161-202

Contrairement à CB1, le récepteur CB2 n'est pas très bien conservé inter-espèces. Ainsi, chez la souris, CB2 comprend 347 acides aminés et le pourcentage d'homologie avec le récepteur humain est de 82 %.[40] Cette variation de séquence peut avoir des conséquences sur l'affinité de certains ligands. En effet, le WIN 55,212-2, un agoniste mixte CB1/CB2 se lie six fois moins bien au récepteur CB2 murin qu'au récepteur humain. Si cette variation d'affinité n'a pas été observée pour le CP 55,940, un agoniste mixte des récepteurs aux cannabinoïdes, et pour l'anandamide, elle a toutefois été mise en évidence pour certains ligands lors de la comparaison du récepteur humain avec le récepteur de rat qui pourtant, présentent 93 % d'homologie entre eux.[41]

b. β) Structure tridimensionnelle et domaines de fixation du ligand

Comme pour le récepteur CB1, la représentation tridimensionnelle du récepteur CB2 est hypothétique et basée sur des études de comparaison avec la rhodopsine.[42]

Les études de modélisation moléculaire démontrent ainsi que l'hélice 4, la deuxième boucle extracellulaire ainsi que l'hélice 5 constituent des domaines essentiels dans la reconnaissance ligand-récepteur.[43,44] En effet, le SR144528, un antagoniste / agoniste inverse sélectif du récepteur CB2, perd toute affinité pour la protéine lorsque celle-ci est mutée au niveau des sérines 161 et 165 de l'hélice 4, indiquant l'importance de ces acides aminés dans la liaison au ligand.

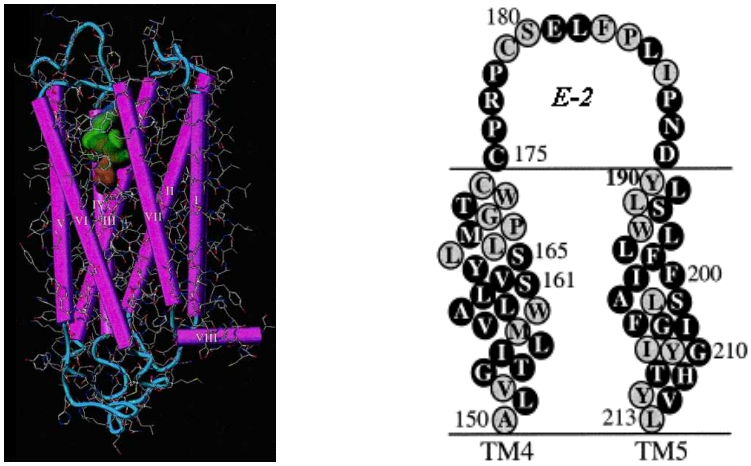
[40] Shire D., Clandra B., Rinaldi-Carmona M., Oustric D., Pessègue B., Bonnin-Cabanne O., Le Fur G., Caput D., Ferrera P. Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor. *Biochim. Biophys. Acta,* **1996,** *1307,* 132-136

[41] Griffin G., Tao Q., Abood M. E. Cloning and pharmacological characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **2000,** *292,* 886-894

[42] Xie X. Q., Chen J. Z., Billings E. M. 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. *Proteins,* **2003,** *53,* 307-319

[43] Shire D., Calandra B., Bouaboula M., Barth F., Rinaldi-Carmona M., Casellas P., Ferrera P. Cannabinoid receptor interactions with the antagonists SR 141716A and SR 144528. *Life Sci.,* **1999,** *65,* 627-635

[44] Gouldson P., Calandra B., Legoux P., Kerneis A., Rinaldi-Carmona M., Barth F., Le Fur G., Ferrera P., Shire D. Mutational analysis and molecular modeling of the antagonist SR 144528 binding site on the human cannabinoid CB2 receptor. *Eur. J. Pharmacol.,* **2000,** *401,* 17-25



Cercles noirs : acides aminés spécifiques de R-CB2

Cercles gris : acides aminés conservés dans R-CB1 et R-CB2

Figure A. 12. Structure 3D du récepteur CB2 et zoom sur la région essentielle à sa reconnaissance

Des études de docking comparant les récepteurs aux cannabinoïdes à d'autres membres de la famille des RCPG ont montré que CB1 et CB2 présentaient des différences vis-à-vis des autres membres au niveau de l'hélice 5. Par exemple, un résidu proline hautement conservé par la totalité des RCPG, n'est pas présent chez les récepteurs aux cannabinoïdes et il semblerait que ces derniers se distinguent également par la présence de deux tyrosines (Tyr207 et Tyr208 pour CB2) dans une région qui, chez la plupart des autres RCPG n'en compte qu'une seule. Enfin, il apparaît que les récepteurs CB1 et CB2 sont les seuls membres de la famille des RCPG à ne pas présenter de ponts disulfures dans leurs structures tridimensionnelles.[45]

Ces mêmes études ont également montré que le récepteur CB2 se distinguait de son homologue CB1 par sa partie *N*-terminale plus courte, sa deuxième boucle extracellulaire et sa partie *C*-terminale. L'utilisation de la mutagénèse dirigée pour confirmer ces analyses a permis d'expliquer la sélectivité d'un ligand vis-à-vis de l'un ou l'autre des récepteurs.[46] Ainsi, la mutation de la phénylalanine F5.46, un résidu propre à CB2, en alanine, a entraîné une diminution de l'affinité du WIN 55,212-2 pour le récepteur. Toutefois, cette mutation s'est révélée sans effet sur l'affinité d'autres ligands laissant supposer différents modes de fixation des ligands aux récepteurs CB1 et CB2.

[45] Montero C., Campillo N. E., Goya P., Paez J. A. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. *Eur. J. Med. Chem.,* **2005,** *40,* 75-83

[46] Song Z. H., Slowey C. A., Hurst D. P., Reggio P. H. The difference between CB1 ans CB2 cannabinoid receptors at position 5.46 is crucial for the selectivity of WIN55212-2 for CB2. *Mol. Pharmacol.,* **1999,** *56,* 834-840

b. γ) Distribution du récepteur CB2

Contrairement à son homologue CB1, CB2 est largement distribué au niveau périphérique. On le trouve essentiellement dans les cellules associées au système immunitaire comme les leucocytes, les macrophages ainsi que les lymphocytes B et T.[47] Cette localisation suggère l'implication de la protéine dans les effets immunomodulateurs induits par la consommation de cannabis.

Par ailleurs, le gène codant pour l'expression de CB2 a également été retrouvé dans des tissus tels que la rate, les amygdales, le thymus mais aussi au niveau de la prostate.[48,49] Cette large distribution périphérique a longtemps laissé croire aux scientifiques que CB2 était absent du système nerveux central.[50] Cependant, des travaux plus récents ont mis en évidence la présence de récepteurs CB2 dans des cellules gliales en culture[51] et *in vivo,* dans différentes zones du cerveau de rat telles que les tubercules olfactifs, le cortex cérébelleux, le striatum, le thalamus et l'hippocampe.[52]

Enfin, le récepteur CB2 a été identifié dans les ostéoclastes et les ostéoblastes, cellules issues de la lignée monocytes-macrophages qui permettent le maintien de la solidité osseuse.[53]

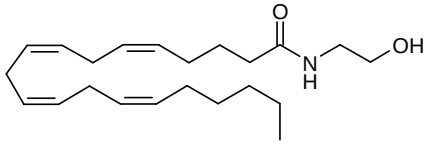
2. 2) Les endocannabinoïdes

2. a) L'anandamide

La découverte des récepteurs aux cannabinoïdes a rapidement incité les scientifiques à rechercher des ligands endogènes capables d'interagir avec ces protéines. C'est ainsi qu'en 1992, le *N*-arachidonoyléthanolamide (AEA), plus connu sous son nom consacré « anandamide », fut isolé du cerveau

[47] Klein T. W., Newton C. A., Friedman H. Cannabinoids and the immune system. *Pain. Res. Manag.,* **2001,** *6,* 95-101
[48] Berdyshev E. V. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem. Phys. Lipids,* **2000,** *108,* 169-190
[49] Sarfaraz S., Afaq F., Adhami V. M., Mukthar H. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res.,* **2005,** *65,* 1635-1641
[50] Lynn A. B., Herkenham M. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **1994,** *268,* 1612-1623
[51] Stella N. Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia,* **2004,** *48,* 267-277
[52] Van Sickle M. D., Duncan M., Kingsley P. J., Mouihate A., Urbani P., Mackie K., Stella N., Makriyannis A., Piomelli D., Davison J. S., Marnett L. J., Di Marzo V., Pittman Q. J., Patel K. D., Sharkey K. A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science,* **2005,** *310,* 329-332
[53] Ofek O., Karsak M., Leclerc N., Fogel M., Frenkel B., Wright K., Tam J., Attar-Namdar M., Kram V., Shohami E., Mechoulam R., Zimmer A., Bab I. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **2006,** *103,* 697-701

de porc par l'équipe de Devane.[54] L'anandamide est un eicosanoïde appartenant à la famille de composés polyinsaturés dérivés d'acide gras. Il est constitué d'une chaîne grasse arachidonique (C20 : 4) et d'une partie éthanolamide.



R-CB1 : Ki = 72 nM

R-CB2 : Ki = 279 nM[55]

Figure A. 13 Structure chimique de l'anandamide

L'anandamide est un agoniste partiel des récepteurs aux cannabinoïdes.[56] Son affinité préférentielle pour CB1 est responsable de ses effets stimulants d'appétit, analgésiques,[57] anticonvulsivants et antiprolifératifs observés sur des lignées de cellules cancéreuses en culture.[58] Par ailleurs, l'anandamide active également le système vanilloïde en se liant au récepteur TRPV1, ce qui concourt à son effet antalgique.[59]

L'anandamide est présent dans diverses zones du cerveau à des concentrations différentes extrêmement bien corrélées avec l'affluence de récepteurs CB1. Ainsi, les régions où les niveaux d'anandamide sont les plus élevés sont l'hippocampe, le thalamus, le striatum, le cervelet et le cortex.[60] Au niveau périphérique, l'anandamide est présent dans la rate et le cœur ainsi que dans l'intestin, les testicules et l'utérus,[61] ceci à des concentrations nettement supérieures à celles du cerveau. De faibles concentrations d'anandamide ont

[54] Devane W. A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science,* **1992,** *258,* 1946-1949

[55] Hillard C. J., Manna S., Greenberg M. J., DiCamelli R., Ross R. A., Stevenson L. A., Murphy V., Pertwee R. G., Campbell W. B. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **1999,** *289,* 1427-1433

[56] Vogel Z., Barg J., Levy R., Saya D., Heldman E., Mechoulam R. Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. *J. Neurochem.,* **1993,** *61,* 352-355

[57] Rice A. S., Farquhar-Smith W. P., Nagy I. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids,* **2002,** *66,* 243-256

[58] Parolaro D., Massi P., Rubino T., Monti E. Endocannabinoids in the immune system and cancer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids,* **2002,** *66,* 319-332

[59] Ross R. A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **2003,** *140,* 790-801

[60] Di Marzo V., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Schwartz J. C., Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature,* **1994,** *372,* 686-691

[61] Schmid P. C., Paria B. C., Krebsbach R. J., Schmid H. H., Dey S. K. Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **1997,** *94,* 4188-4192

été relevées dans le sérum, le plasma, le liquide céphalorachidien suggérant que l'anandamide n'est pas de nature hormonale mais qu'il est synthétisé à proximité de ses sites d'action.

En effet, ce composé possède toutes les caractéristiques des neurotransmetteurs classiques desquels il se distingue toutefois par son mode de stockage et de libération. Tandis que les neurotransmetteurs sont synthétisés dans le cytoplasme des neurones puis stockés dans les vésicules synaptiques dont ils sont libérés par exocytose, l'anandamide est quant à lui, formé dans les neurones et les astrocytes après stimulation de différents récepteurs induisant l'hydrolyse de précurseurs lipidiques membranaires. Par ailleurs, du fait de sa nature lipidique, cet endocannabinoïde n'est pas stocké dans des vésicules, mais diffuse librement à travers la membrane cellulaire.[62]

L'anandamide ainsi libéré peut alors interagir avec les récepteurs aux cannabinoïdes ou être dégradé par une amidase à sérine, la FAAH (« fatty acid amide hydrolase »).

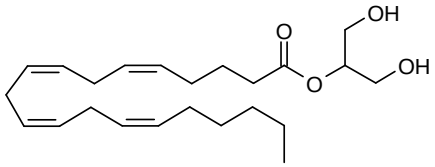
2. b) Le 2-arachidonoylglycérol

En 1995, les recherches menées sur le système endocannabinoïde ont permis de découvrir un nouveau ligand endogène des récepteurs CB1 et CB2 dans l'intestin de chien et dans le cerveau de rat.[63,64] Il s'agit de l'ester de l'acide arachidonique et du glycérol : le 2-arachidonoylglycérol (2-AG).

[62] Giuffrida A, Beltramo M, Piomelli D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **2001,** *298,* 7-14

[63] Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N. E., Schatz A. R., Gopher A., Almog S., Martin B. R., Compton D. R., Pertwee R. G., Griffin G., Bayewitch M., Barg J., Vogel Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.,* **1995**, *50,* 83-90

[64] Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995,** *215*, 89-97



R-CB1 : Ki = 58 nM

R-CB2 : Ki = 145 nM[65]

Figure A. 14. Structure chimique du 2-AG

Contrairement à l'anandamide, le 2-AG est un agoniste entier des récepteurs CB1 et CB2 et les concentrations physiologiques de ce composé 170 fois supérieures à celles de l'anandamide en font le ligand vrai des récepteurs aux cannabinoïdes.[66,67]

La biosynthèse du 2-AG s'effectue au niveau post-synaptique sous l'influence d'une activité neuronale particulière ou d'une activation par d'autres récepteurs comme les récepteurs à l'actéylcholine.[68] Une fois libéré, le 2-AG peut alors interagir avec les récepteurs aux cannabinoïdes ou être transporté vers le milieu intracellulaire pour être dégradé par une enzyme, la « monoacylglycerol lipase » (MAGL).[69]

[65] Ben-Shabat S., Fride E., Sheskin T., Tamiri T., Rhee M. H., Vogel Z., Bisogno T., de Petrocellis L., Di Marzo V., Mechoulam R. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur. J. Pharmacol.,* **1998,** *353,* 23-31

[66] Savinainen J. R., Jarvinen T., Laine K., Laitinen J. T. Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB(1) receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. *Br. J. Pharmacol.,* **2001**, *134,* 664-672

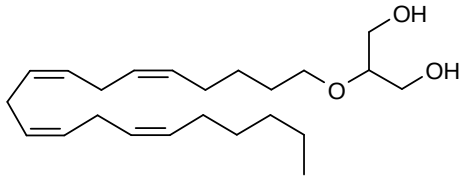
[67] Sugiura T., Kondo S., Kishimoto S., Miyashita T., Nakane S., Kodaka T., Suhara Y., Takayama H., Waku K. Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J. Biol. Chem*., **2000,** *275,* 605-612

[68] Mechoulam R., Fride E., Ben-Shabat S., Meiri U., Horowitz M. Carbachol, an acetylcholine receptor agonist, enhances production in rat aorta of 2-arachidonoyl glycerol, a hypotensive endocannabinoid. *Eur. J. Pharmacol.,* **1998,** *362,* R1-R3

[69] Nomura D. K., Hudak C. S., Ward A. M., Burston J. J., Issa R. S., Fisher K. J., Abood M. E., Wiley J. L., Lichtman A. H., Casida J. E. Monoacylglycerol lipase regulates 2-arachidonoylglycerol action and arachidonic acid levels. *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2008,** *18,* 5875-5878

2. c) Le noladin éther

Mis en évidence en 2001 dans le cerveau de porc et de rat, le noladin éther est l'éther de l'alcool arachidonique et du glycérol.[70,71]



R-CB1 : Ki = 9.1 nM

R-CB2 : Ki = 480 nM

Figure A. 15. Structure chimique du noladin éther

Ce composé, présentant une structure proche du 2-AG, a d'abord été décrit comme un agoniste sélectif du récepteur CB1 capable d'induire des effets cannabinomimétiques tels que l'analgésie, la catalepsie, l'hypothermie et la diminution de la motilité intestinale.[72] Depuis, d'autres études ont démontré que les niveaux centraux de noladin éther étaient insuffisants pour induire de tels effets. Les scientifiques en ont donc déduit qu'avec un Ki de 480 nM, ce composé était plutôt un agoniste entier des récepteurs CB2.[73]

Cependant, les niveaux physiologiques du noladin éther demeurant très faibles, le rôle de cet endocannabinoïde reste encore difficile à définir mais des expériences ont montré qu'il exerçait une inhibition des récepteurs opioïdes de type μ *via* l'activation des récepteurs CB2.[74]

[70] Hanus L., Abu-Lafi S., Fride E., Breuer A., Vogel Z., Shalev D. E., Kustanovich I., Mechoulam R. 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **2001,** *98,* 3662-3665

[71] Fezza F., Bisogno T., Minassi A., Appendino G., Mechoulam R;, Di Marzo V. Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. *FEBS Lett.,* **2002**, *513,* 294-298

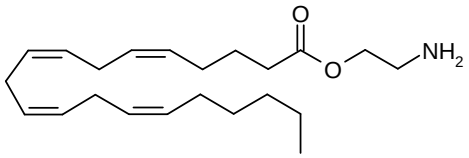
[72] Appendino G., Ligresti A., Minassi A., Daddario N., Bisogno T., Di Marzo V. Homologues and isomers of noladin ether, a putative novel endocannabinoid: interaction with rat cannabinoid CB(1) receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2003,** *13*, 43-46

[73] Shoemaker J. L., Joseph B. K., Ruckle M. B., Mayeux P. R., Prather P. L. The endocannabinoid noladin ether acts as a full agonist at human CB2 cannabinoid receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **2005,** *314,* 868-875

[74] Paldyova E., Bereczki E., Santha M., Wenger T., Borsodi A., Benyhe S. Noladin ether, a putative endocannabinoid, inhibits mu-opioid receptor activation via CB2 cannabinoid receptors. *Neurochem. Int.,* **2008,** *52,* 312-328

2. d) La virodhamine

La virodhamine a été mise en évidence en 2002 grâce à des techniques chromatographiques.[75] Ce composé est en quelque sorte le composé « inverse » de l'anandamide puisqu'il s'agit de l'ester de l'acide arachidonique et de l'éthanolamine. Pour cette raison, la virodhamine est également appelée *O*-arachidonoyléthanolamine.



R-CB1 : EC_{50} = 1.9 µM

R-CB2 : EC_{50} = 1.4 µM

Figure A. 16. Structure chimique de la virodhamine

La virodhamine présente des affinités similaires pour les deux sous-types des récepteurs aux cannabinoïdes. Toutefois, sa particularité est de manifester un caractère antagoniste du récepteur CB1 alors qu'elle est un agoniste vrai du récepteur CB2. Elle est par ailleurs capable d'inhiber le transport de l'anandamide, ce qui suggère un mécanisme de recapture commun pour ces deux endocannabinoïdes.

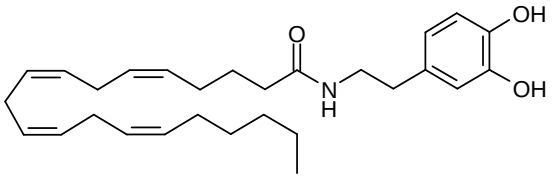
Peu d'informations concernant la distribution de ce composé dans l'organisme sont actuellement disponibles dans la littérature. Cependant, il semble que la virodhamine soit présente au niveau central à des concentrations inférieures à celles de l'anandamide. En effet, elle a été isolée dans le cerveau de rat au niveau de l'hippocampe, du cortex et du cervelet ainsi que dans le cerveau humain au niveau de l'hippocampe. Au niveau périphérique, la virodhamine est présente dans des zones riches en récepteurs CB2 comme la rate, le rein et le cœur et ceci à des concentrations trois à sept fois supérieures à celles de l'anandamide.

[75] Porter A. C., Sauer J. M., Knierman M. D., Becker G. W., Berna M. J., Bao J., Nomikos G. G., Carter P., Bymaster F. P., Leese A. B., Felder C. C. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **2002,** *301,* 1020-1024

Les mécanismes de biosynthèse de la virodhamine demeurent encore méconnus mais il est possible que ce composé provienne d'un réarrangement spontané ou catalysé de l'anandamide.[76]

2. e) La *N*-arachidonoyldopamine

A l'origine, la *N*-arachidonoyldopamine (NADA) avait été décrite comme un ligand synthétique capable d'activer le récepteur CB1 et d'inhiber les systèmes de biodégradation de l'anandamide.[77] Par la suite, son existence endogène a été confirmée lorsqu'elle a été isolée dans le cerveau de rat ainsi que dans les ganglions de l'épine dorsale bovine.[78] La structure chimique de la NADA découle de l'amidification de l'acide arachidonique par la dopamine.



R-CB1 : Ki = 250 nM

R-CB2 : Ki = 12 µM

Figure A. 17. Structure chimique de la NADA

Du fait de son affinité préférentielle pour le récepteur CB1, la NADA est considérée comme un agoniste sélectif de ce récepteur. Par ailleurs, comme l'anandamide, la NADA active le système vanilloïde en se liant au récepteur TRPV1 et peut donc agir comme un endovanilloïde.[79]

[76] Markey S. P., Dudding T., Wang T. C. Base- and acid-catalyzed interconversions of *O*-acyl- and *N*-acyl-ethanolamines: a cautionary note for lipid analyses. *J. Lipid Res.,* **2000,** *41,* 657-662

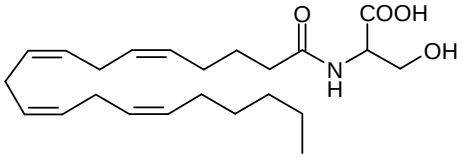
[77] Bisogno T., Melck D., Bobrov M. Y., Gretskaya N. M., Bezuglov V. V., De Petrocellis L., Di Marzo V. *N*-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem. J.,* **2000,** *351,* 817-824

[78] Huang S. M., Bisogno T., Petros T. J., Chang S. Y., Zavitsanos P. A., Zipkin R. E., Sivakumar R., Coop A., Maeda D. Y., De Petrocellis L., Burstein S., Di Marzo V., Walker J. M. Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain. *J. Biol. Chem.,* **2001,** *276,* 42639-42644

[79] Hanus L. O. Discovery and isolation of anandamide and other endocannabinoids. *Chem. Biodivers.,* **2007,** *4*, 1828-1841

2. f) La *N*-arachidonoylsérine

C'est en 2006, après comparaison de sa structure avec la *N*-arachidonoylsérine (ARA-S) synthétique que la ARA-S endogène a été mise en évidence dans le cerveau bovin.[80] Il s'agit de l'amide de l'acide arachidonique et de la sérine.



R-CB1 : Ki > 10 000 nM

R-CB2 : Ki non déterminé

Figure A. 18. Structure chimique de la ARA-S

Contrairement à l'anandamide, la ARA-S ne se lie que très faiblement aux récepteurs CB1 et CB2 ainsi qu'au récepteur TRPV1. Toutefois, ce composé présente des effets vasodilatateurs et stimule la phosphorylation de la MAP-kinase p42/p44 ainsi que celle de la kinase B/AKT dans des cellules endothéliales en culture. Ces effets sont semblables à ceux exercés par le cannabidiol anormal (Abn-CBD) décrit comme un agoniste synthétique d'un nouveau type de récepteur aux cannabinoïdes.[81] Ainsi, l'ARA-S pourrait être un ligand endogène de ce nouveau type de récepteur aux cannabinoïdes.

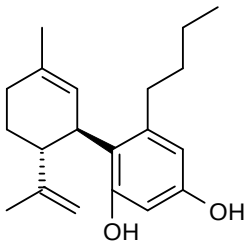


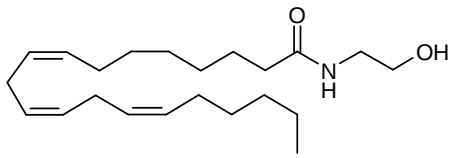
Figure A. 19. Structure chimique de l'Abn-CBD

[80] Milman G., Maor Y., Abu-Lafi S., Horowitz M., Gallily R., Batkai S., Mo F. M., Offertaler L., Pacher P., Kunos G., Mechoulam R. *N*-arachidonoyl L-serine, an endocannabinoid-like brain constituent with vasodilatory properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **2006,** *103,* 2428-2433

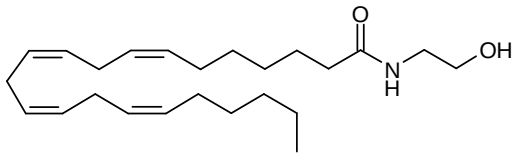
[81] Offertaler L., Mo F. M., Batkai S., Liu J., Begg M., Razdan R. K., Martin B. R., Bukoski R. D., Kunos G. Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol. Pharmacol.,* **2003,** *63,* 699-705

2. g) Le 7,10,13,16-docosatétraénoyléthanolamide et l'homo-γ-linoléoyléthanolamide

Ces deux composés ont été isolés dans le cerveau de porc peu après la découverte de l'anandamide.[82] Ils font partie de la même famille que l'anandamide mais se distinguent de ce dernier par la nature de leur chaîne grasse.



R-CB1 : Ki = 53.4 nM



R-CB1 : Ki = 34.4 nM

Figure A. 20. Structures chimiques de l'homo-γ-linoléoyléthanolamide (à gauche) et du 7,10,13,16-docosatétraénoyléthanolamide (à droite)

Ces deux composés présentent un caractère agoniste vis-à-vis du récepteur CB1 et induisent *in vivo* les effets classiques des cannabinoïdes.[83,84]

Actuellement, du fait de leurs concentrations physiologiques plus élevées et de leurs effets thérapeutiques potentiels, les endocannabinoïdes les plus étudiés sont l'anandamide et le 2-AG. Toutefois, d'autres molécules endogènes interagissant avec le système endocannabinoïde mais ne présentant pas ou peu d'affinité pour les récepteurs CB1 et CB2 ont été étudiées pour leurs effets biologiques spécifiques. Il s'agit par exemple, de l'oléamide ou du palmitoyléthanolamide.

[82] Hanus L., Gopher A., Almog S., Mechoulam R. Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *J. Med. Chem.,* **1993,** *36,* 3032-3034

[83] Pertwee R., Griffin G., Hanus L., Mechoulam R. Effects of two endogenous fatty acid ethanolamides on mouse vasa deferentia. *Eur. J. Pharmacol.,* **1994,** *259,* 115-120

[84] Pertwee R. G., Griffin G., Lainton J. A., Huffman J. W. Pharmacological characterization of three novel cannabinoid receptor agonists in the mouse isolated vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.,* **1995,** *284,* 241-247

2. 3) Les molécules endogènes associées aux endocannabinoïdes

3. a) Le palmitoyléthanolamide

Isolé en 1965 à partir du cerveau de rat et de cochon d'Inde, le palmitoyléthanolamide (PEA) est l'amide de l'acide palmitique et de l'éthanolamine.[85]

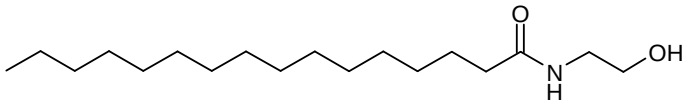


Figure A. 21. Structure chimique du PEA

Le PEA est présent dans le cerveau à des concentrations supérieures à celles de l'anandamide[86] et possède des effets thérapeutiques intéressants comme des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques ainsi qu'anti-prolifératives.[87,88,89] Initialement, l'origine de ces effets thérapeutiques avait été attribuée à l'interaction potentielle du PEA avec le récepteur CB2.[90] Toutefois, des études ultérieures ont infirmé cette

[85] Bachur N. R., Masek K., Melmon K. L., Undenfriend S. Fatty acid amides of ethanolamine in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.,* **1965,** *240,* 1019-1024

[86] Schmid P. C., Krebsbach R. J., Perry S. R., Dettmer T. M., Maasson J. L., Schmid H. H. Occurrence and postmortem generation of anandamide and other long-chain *N*-acylethanolamines in mammalian brain. *FEBS Lett.,* **1995,** *375,* 117-120

[87] Conti S., Costa B., Colleoni M., Parolaro D., Giagnoni G. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br. J. Pharmacol.,* **2002,** *135,* 181-187

[88] Lambert D. M., Vandevoorde S., Jonsson K. O., Fowler C. J. The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? *Curr. Med. Chem.,* **2002,** *9,* 663-674

[89] Di Marzo V., Melck D., Orlando P., Bisogno T., Zagoory O., Bifulco M., Vogel Z., De Petrocellis L. Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem. J.,* **2001,** *358,* 249-255

[90] Facci L., Dal Toso R., Romanello S., Buriani A., Skaper S. D., Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **1995,** *92,* 3376-3380

hypothèse et le PEA est aujourd'hui suspecté d'interagir avec le récepteur nucléaire PPAR-α[91] et/ou avec le récepteur orphelin GPR55 pour lequel il présente une excellente affinité (EC_{50} = 3.2 nM).[92]

3. b) Le 2-linoléoylglycérol et le 2-palmitoylglycérol

Ces deux composés, lorsqu'ils sont isolés, ne présentent pas d'activité particulière. En revanche, dans la rate, le cerveau et le tractus gastro-intestinal où ils accompagnent le 2-AG, ils sont capables de potentialiser significativement la liaison de l'endocannabinoïde à ses récepteurs et d'accroître ainsi sa capacité à inhiber l'adénylate cyclase. Cet effet particulier encore méconnu pourrait, par la suite, constituer une nouvelle voie de recherche dans la régulation moléculaire de l'activité cannabinoïde endogène.[93]

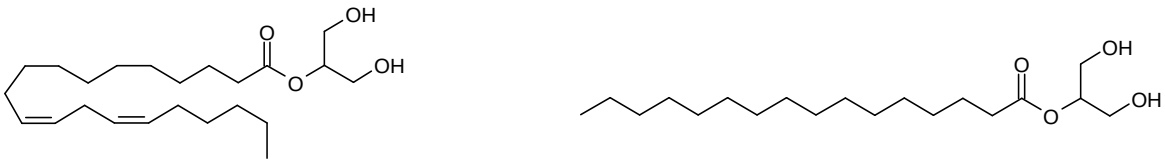


Figure A. 22. Structures chimiques du 2-linoléoylglycérol (à gauche) et du 2-palmitoylglycérol (à droite)

3. c) Le stéaroyléthanolamide

Le stéaroyléthanolamide (SEA) est un éthanolamide saturé qui induit un effet anorexigène marqué et ceci, de manière dose-dépendante.[94]

[91] Lo Verme J., Fu J., Astarita G., La Rana G., Russo R., Calignano A., Piomelli D. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol. Pharmacol.,* **2005,** *67,* 15-19

[92] Drmota T., Greasley P., Groblewski T. Screening assays for cannabinoid-ligand-type modulators of GPR55. *Astrazeneca,* Pat. No. WO2004074844**, 2004**

[93] Ben-Shabat S., Fride E., Sheskin T., Tamiri T., Rhee M. H., Vogel Z., Bisogno T., De Petrocellis L., Di Marzo V., Mechoulam R. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoylglycerol cannabinoid activity. *Eur. J. Pharmacol.,* **1998,** *353,* 23-31

[94] Terrazzino S., Berto F., Carbonare M. D., Fabris M., Guitto A., Bernardini D., Leon A. Stearoylethanolamide exerts anorexic effects in mice via downregulation of liver stearoyl-coenzyme A desaturase-1 mRNA expression. *FASEB J.,* **2004,** *18,* 1580-1582

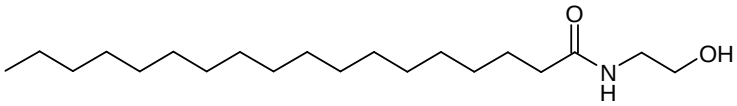


Figure A. 23. Structure chimique du SEA

Il semblerait que le SEA n'interagisse ni avec les récepteurs aux cannabinoïdes, ni avec ceux aux vanilloïdes, mais qu'il possède son propre site d'action et que ce dernier ne serait pas couplé aux protéines G.[95] Par ailleurs, comme pour le 2-linoléoylglycérol et le 2-palmitoylglycérol, le SEA exercerait un effet potentialisateur. En effet, il a été remarqué une diminution accrue de la production d'AMPc en présence de SEA dans des tranches corticales de souris stimulées par de l'anandamide. Ainsi, le SEA potentialiserait la capacité de l'anandamide à diminuer le taux d'AMPc intracellulaire.[96]

3. d) L'oléoyléthanolamide

L'oléoyléthanolamide est l'amide de l'acide oléique et de l'éthanolamine. Ce composé est un régulateur endogène de la prise alimentaire.[97]

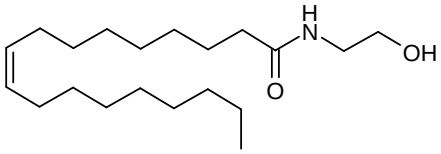


Figure A. 24. Structure chimique de l'oléoyléthanolamide

Les effets anorexigènes centraux et périphériques de l'oléoyléthanolamide sont médiés par l'interaction de ce composé avec le récepteur nucléaire PPAR-α. Ainsi, l'injection d'oléoyléthanolamide chez le rat réduit la

[95] Maccarrone M., Pauselli R., Di Rienzo M., Finazzi-Agro A. Binding, degradation and apoptotic activity of stearoylethanolamide in rat C6 glioma cells. *Biochem. J.,* **2002,** *366,* 137-144

[96] Maccarrone M., Cartoni A., Parolaro D., Margonelli A., Massi P., Bari M., Battista N., Finazzi-Agr A. Cannabimimetic activity, binding, and degradation of stearoylethanolamide within the mouse central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.,* **2002,** *21,* 126-140

[97] Rodriguez de Fonseca F., Navarro M., Gomez R., Escuredo L., Nava F., Fu J., Murillo-Rodriguez E., Giuffrida A., Lo Verme J., Gaetani S., Kathuria S., Gall C., Piomelli D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature,* **2001,** *414,* 209-212

prise alimentaire et diminue la prise de poids. De plus, l'oléoyléthanolamide pourrait constituer une nouvelle voie de recherche dans le traitement de l'infertilité puisqu'il a été démontré que ce composé protégeait les spermatozoïdes du stress oxydatif.[98]

3. e) L'oléamide

C'est en 1989 qu'une équipe de chercheurs isole et caractérise pour la première fois cinq amides primaires dérivés d'acides gras (PFAM).[99] On leur portera d'abord un intérêt modeste jusqu'à ce qu'en 1995, l'équipe de Cravatt isole l'un de ces composés du fluide cérébrospinal de chat.[100] Il s'agissait de l'amide primaire de l'acide oléique, autrement dit de l'oléamide.

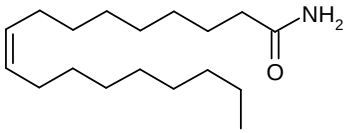


Figure A. 25. Structure chimique de l'oléamide

L'oléamide possède des propriétés hypnotiques.[101] Toutefois, son mécanisme d'action est loin d'être entièrement élucidé. En effet, plusieurs hypothèses ont été émises à ce sujet : la première est que l'oléamide induirait ses effets cannabinomimétiques directement *via* son interaction avec le récepteur CB1 dont il est un agoniste vrai.[102] Cependant la faible affinité de l'oléamide pour ce récepteur (Ki = 1.14 µM) laisse plutôt suggérer un autre mode d'action. L'anandamide et l'oléamide semblent avoir des voies de biotransformations communes. Ainsi, en inhibant la dégradation de l'anandamide, l'oléamide

[98] Ambrosini A., Zolese G., Ambrosi S., Ragni L., Tiano L., Littarru G., Bertoli E., Mantero F., Boscaro M., Balercia G. Oleoylethanolamide protects human sperm cells from oxidation stress: studies on cases of idiopathic infertility. *Biol. Reprod.,* **2006,** *74,* 659-665

[99] Arafat E. S., Trimble J. W., Andersen R. N., Dass C., Desiderio D. M. Identification of fatty acid amides in human plasma. *Life Sci.,* **1989,** *45,* 1679-1687

[100] Cravatt B. F., Prospero-Garcia O., Siuzdak G., Gilula N. B., Henriksen S. J., Boger D. L., Lerner R. A. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science,* **1995,** *268,* 1506-1509

[101] Basile A. S., Hanus L., Mendelson W. B. Characterization of the hypnotic properties of oleamide. *Neuroreport.,* **1999,** *10,* 947-951

[102] Leggett J. D., Aspley S., Beckett S. R., D'Antona A. M., Kendall D. A., Kendall D. A. Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.,* **2004,** *141,* 253-262

potentialiserait les effets de ce dernier, ce qui serait à l'origine des effets cannabinomimétiques observés.[103] Enfin, d'autres équipes ont supposé que l'oléamide interagirait avec le récepteur 5-HT2A, mais l'hypothèse d'un récepteur spécifique de ce composé n'est pas exclue.[104]

3. f) Les *N*-acyl taurines

Découverte récemment, cette famille comprend des dérivés d'acides gras qui sont conjugués à la taurine.[105]

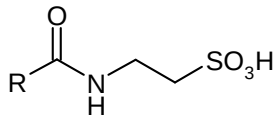


Figure A. 26. Structure générale des *N*-acyl taurines

Nombre de ces composés interagissent avec les récepteurs TRPV1 et TRPV4 et sont dégradés par la FAAH, ce qui suggère que cette enzyme régule *in vivo*, un autre système que le système endocannabinoïde.[106]

Les données reportées dans la littérature concernant les endocannabinoïdes et les molécules endogènes associées aux endocannabinoïdes sont extrêmement hétérogènes. Aussi, par la suite nous ne nous intéresserons qu'aux principaux composés ayant été décrits à savoir l'anandamide et le 2-AG pour les endocannabinoïdes et l'oléamide et le PEA pour les molécules endogènes associées aux endocannabinoïdes.

[103] Cravatt B. F., Lichtman A. H. The enzymatic inactivation of the fatty acid amide class of signaling lipids. *Chem.. Phys. Lipids,* **2002,** *121,* 135-148

[104] Lambert D. M., Di Marzo V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr. Med. Chem.,* **1999,** *6,* 757-773

[105] Saghatelian A., Trauger S. A., Want E. J., Hawkins E. G., Siuzdak G., Cravatt B. F. Assignment of endogenous substrates to enzymes by global metabolite profiling. *Biochemistry,* **2004,** *43,* 14332-14339

[106] Saghatelian A., McKinney M. K., Bandell M., Patapoutian A., Cravatt B. F. A FAAH-regulated class of N-acyl taurines that activates TRP ion channels. *Biochemistry,* **2006,** *45,* 9007-9015

2. 4) Les voies de biosynthèse des endocannabinoïdes et des molécules endogènes associées aux endocannabinoïdes

4. a) Les voies de biosynthèse de l'anandamide et du palmitoyléthanolamide

L'anandamide et le PEA font partie d'un large groupe de lipides bioactifs : les *N*-acyléthanolamines (NAEs). Par conséquent, bien que présentant des chaînes grasses différentes, ces deux composés possèdent des voies de biosynthèse communes.[107]

Les *N*-acylphosphatidyléthanolamines (NAPEs) sont, à ce jour, considérées comme les précurseurs généraux des NAEs bien que l'enzyme assurant leur synthèse à partir de phosphatidyléthanolamines (PEs), la *N*-acyltransférase (NAT), n'ait jamais été caractérisée.[108] Les NAPEs permettent d'obtenir les NAEs après hydrolyse du groupement phosphodiester par une enzyme Ca^{2+}-dépendante appartenant à la famille des métallo-β-lactamases, la NAPE-sélective phospholipase D (NAPE-PLD).[109]

Toutefois, la génération de souris génétiquement invalidées pour le gène de la NAPE-PLD a permis de mettre en évidence d'autres voies de biosynthèse des NAEs, et en particulier de l'anandamide. En effet, ces animaux possédant des taux réduits de PEA et d'oléoyléthanolamide ont présenté des niveaux centraux d'anandamide comparables à ceux des souris sauvages.[110] Ainsi, deux autres voies de biosynthèse des NAEs à partir des NAPEs ont pu être identifiées.

[107] Muccioli. G. G. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov. Today,* **2010**, *in press*

[108] Astarita G., Ahmed F., Piomelli D. Identification of biosynthetic precursors for the endocannabinoid anandamide in the rat brain. *J. Lipid Res.,* **2008***, 49*, 48-57

[109] Wang J., Okamoto Y., Tsuboi K., Ueda N. The stimulatory effect of phosphatidylethanolamine on N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D (NAPE-PLD). *Neuropharmacology,* **2008,** *54,* 8-15

[110] Leung D., Saghatelian A., Simon G. M., Cravatt B. F. Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry,* **2006,** *45,* 4720-4726

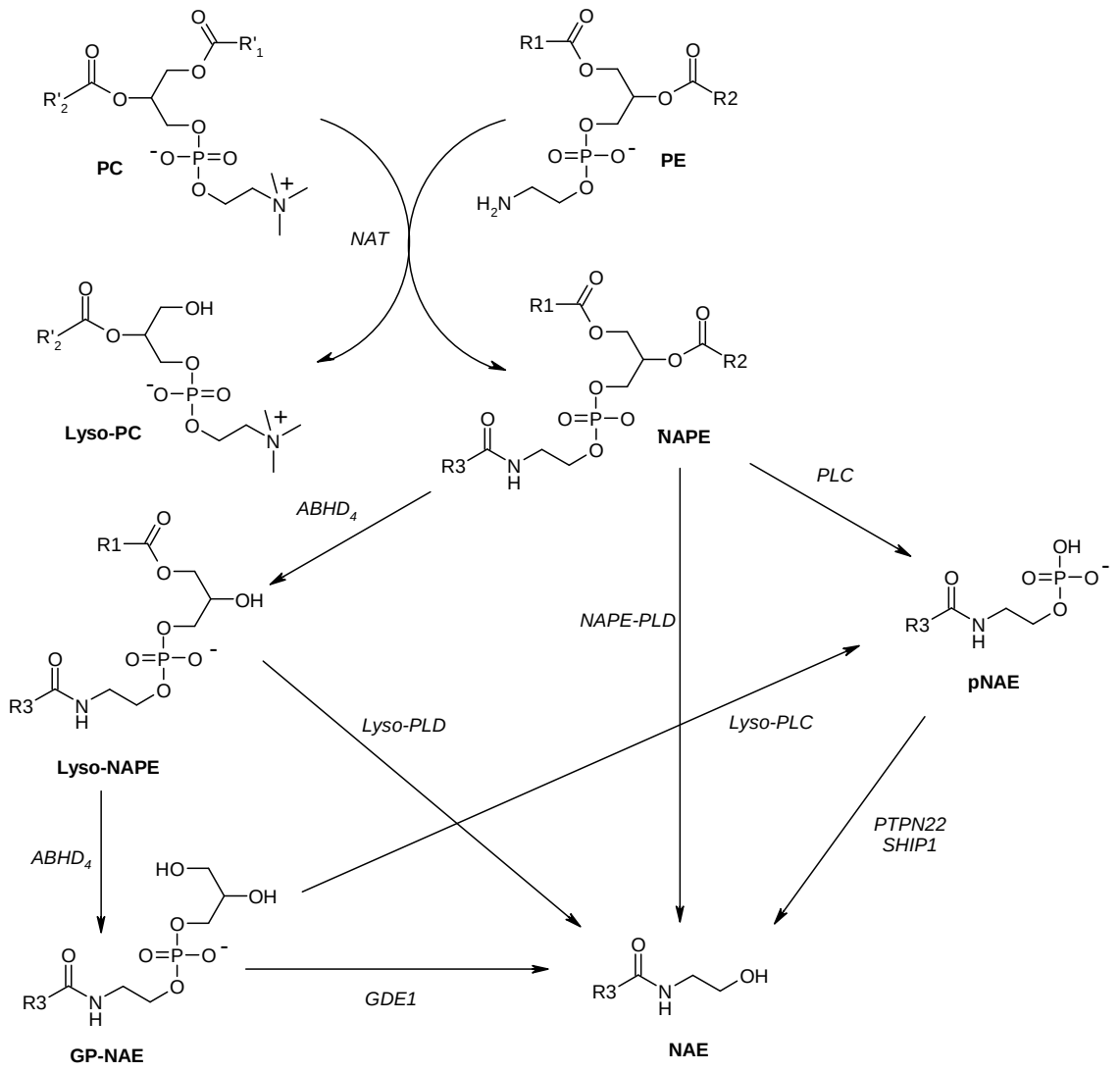


Figure A. 27. Principales voies de biosynthèse des NAEs

La première passe par la génération d'intermédiaires clés lipidiques, les glycérophospho-*N*-acyléthanolamines (GP-NAEs). Celles-ci peuvent être produites suite à une double *O*-désacylation des NAPEs effectuée sous l'action d'une sérine hydrolase, la $ABHD_4$ (α/β-hydrolase 4).[111] La première *O*-désacylation permet d'obtenir les lyso-NAPEs qui peuvent ainsi subir la deuxième *O*-désacylation afin de générer les GP-NAEs ou être prises en charge par la lyso-phospholipase de type D (Lyso-PLD) qui va hydrolyser le groupement phosphodiester restant pour générer directement les NAEs. Les GP-NAPEs subissent ensuite l'action de la glycérophosphodiestérase de type 1 (GDE1) et donnent ainsi naissance aux NAEs ou sont hydrolysées par la lyso-phospholipase de type C (Lyso-PLC) permettant alors l'obtention des phospho-*N*-

[111] Simon G. M., Cravatt B. F. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-*N*-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J. Biol. Chem.,* **2006,** *281,* 26465-26472

acyléthanolamines (pNAEs). Sous l'action de la protéine tyrosine phosphatase PTPN22 et de SHIP1, les pNAEs génèrent également les NAEs.[112]

La deuxième voie de biosynthèse met en jeu la phospholipase de type C (PLC) ainsi que PTPN22 et SHIP1. Ainsi, les NAPEs sont hydrolysées par la PLC en pNAEs, qui comme précédemment, en présence de PTPN22 et de SHIP permettent l'obtention des NAEs.[113,114]

Il faut toutefois noter que la voie des pNAEs n'a, à ce jour, été décrite que pour l'anandamide.

4. b) Les voies de biosynthèse du 2-AG

Comme pour l'anandamide, plusieurs voies de biosynthèse du 2-AG ont été suggérées. Celles-ci diffèrent selon la nature du stimulus qui induit la production de 2-AG.[115] Ainsi, si la synthèse de l'endocannabinoïde a été ordonnée suite à la stimulation de récepteurs couplés aux protéines $G_{q/11}$, comme les récepteurs au glutamate par exemple, le 2-AG sera produit en deux étapes à partir de phosphatidylinositol (PI). En effet, celui-ci va dans un premier temps être hydrolysé par la PLC pour générer l'intermédiaire clé diacylglycérol (DAG), lequel, sous l'action de la diacylglycérol lipase (DAGL) libère le 2-AG.[116,117,118]

Toutefois, le DAG peut également être produit à partir de l'hydrolyse de l'acide phosphatidique (PA) par une « phosphatidic acid hydrolase » (PA-hydrolase), ce qui représente une première alternative à la voie PLC-DAGL.[119]

---

[112] Simon G. M., Cravatt B. F. Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-*N*-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J. Biol. Chem.,* **2008,** *283,* 9341-9349

[113] Liu J., Wang L., Harvey-White J., Osei-Hyiaman D., Razdan R., Gong Q., Chan A. C., Zhou Z., Huang B. X., Kim H. Y., Kunos G. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **2006,** *103,* 13345-13350

[114] Liu J., Wang L., Harvey-White J., Huang B. X., Kim H. Y., Luquet S., Palmiter R. D., Krystal G., Rai R., Mahadevan A., Razdan R. K., Kunos G. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology,* **2008,** *54,* 1-7

[115] Kano M., Ohno-Shosaku T., Hashimotodani Y., Uchigashima M., Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.,* **2009,** *89,* 309-380

[116] Stella N., Schweitzer P., Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature,* **1997,** *388,* 773-778

[117] Kondo S., Kondo H., Nakane S., Kodaka T., Tokumura A., Waku K., Sugiura T. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA^{2+}-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett.,* **1998,** *429,* 152-156

[118] Hashimotodani Y., Ohno-Shosaku T., Tsubokawa H., Ogata H., Emoto K., Maejima T., Araishi K., Shin H. S., Kano M. Phospholipase Cβ serves as a coincidence detector through its Ca^{2+} dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron,* **2005,** *45,* 257-268

[119] Bisogno T., Melck D., De Petrocellis L., Di Marzo V. Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin. *J. Neurochem.,* **1999,** *72,* 2113-2119

Une dernière voie de biosynthèse a été décrite pour le 2-AG mais les mécanismes capables de la déclencher demeurent encore inconnus. Celle-ci implique la formation de 2-AG en deux étapes à partir de PI. Sous l'action de la phosphatidylinositol-phospholipase A1 (PLA1), le PI est hydrolysé en 2-arachidonoyl-lysophosphatidylinositol (Lyso-PI). Ce dernier subit ensuite l'action de la lyso-phospholipase C (Lyso-PLC), permettant la génération de 2-AG.[120]

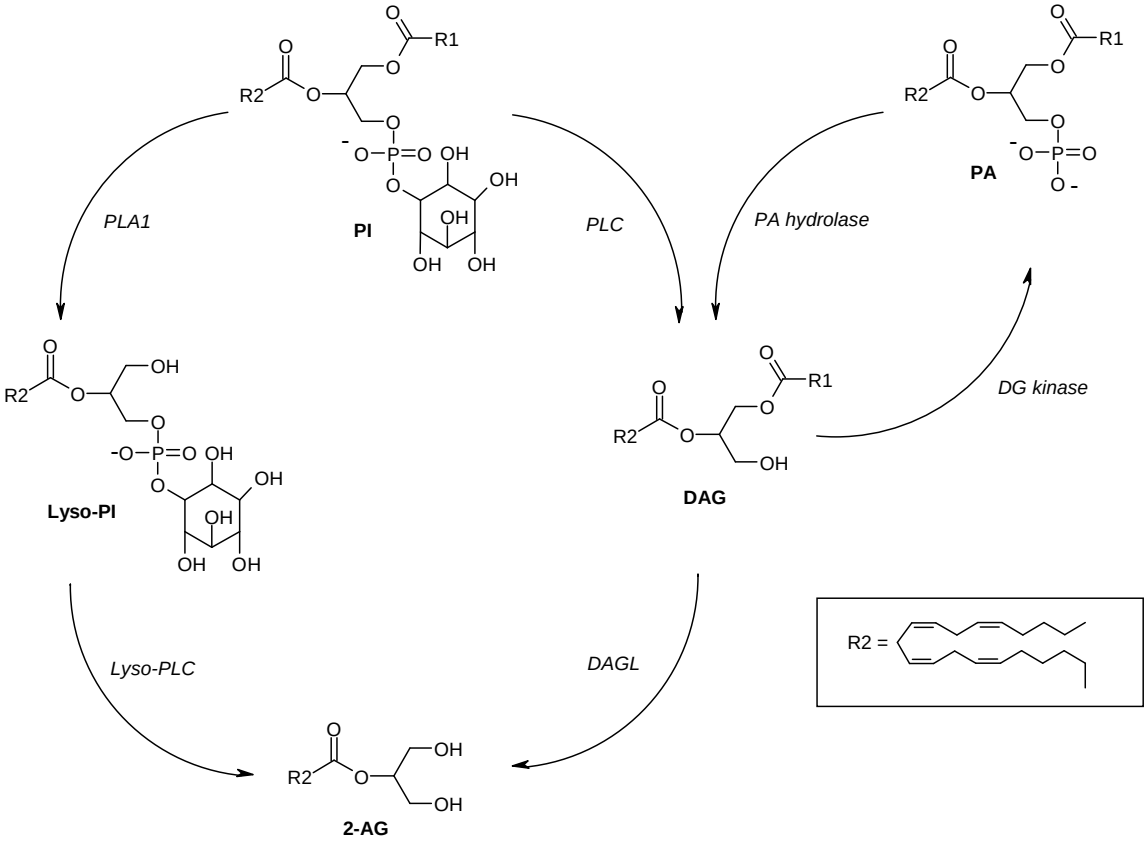


Figure A. 28. Principales voies de biosynthèse du 2-AG

[120] Ueda H., Kobayashi T., Kishimoto M., Tsutsumi T., Okuyama H. A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain. *J. Neurochem.,* **1993,** *61,* 1874-1881

4. c) Les voies de biosynthèse de l'oléamide

Initialement, il avait été avancé que l'oléamide résultait de la condensation de l'acide oléique et de l'ammoniaque en présence d'une enzyme de type « oléamide synthase ».[121] Cependant, les niveaux physiologiques d'ammoniaque demeurant insuffisants pour permettre l'activité catalytique de l'enzyme, une deuxième voie de synthèse a dû être envisagée.

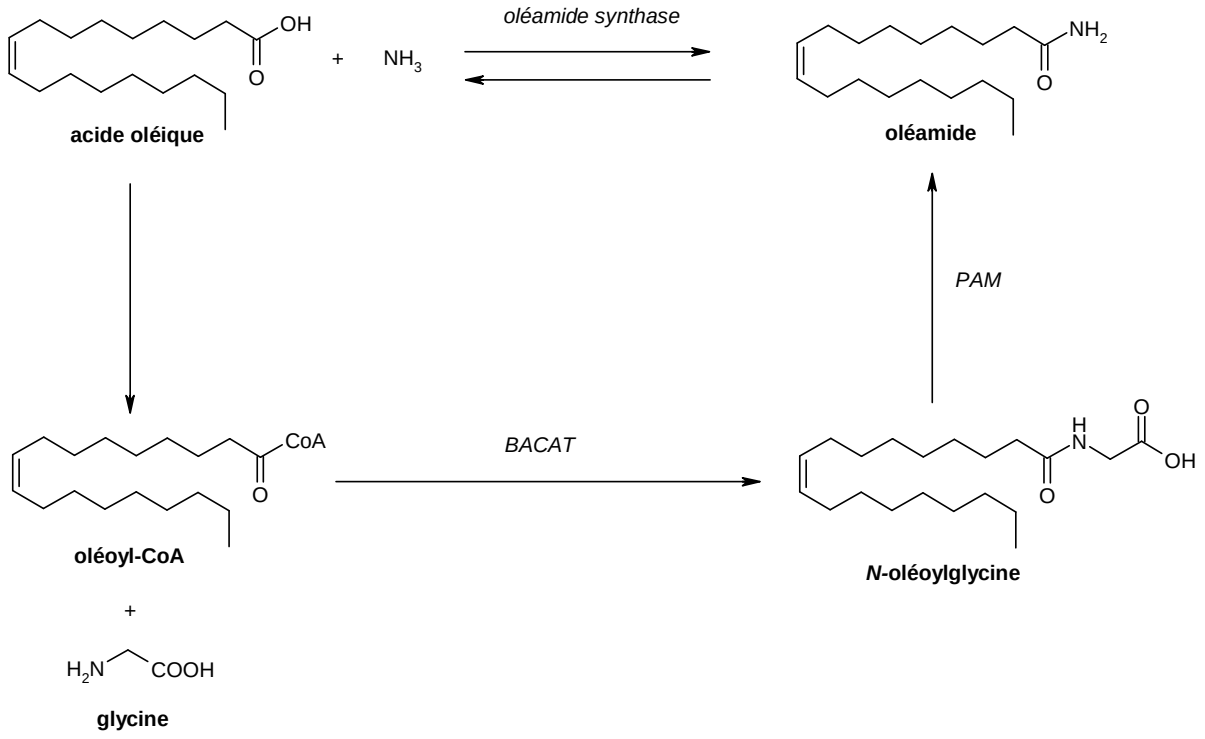


Figure A. 29. Voies de biosynthèse proposées pour l'oléamide[122]

Celle-ci revendique la conversion de l'acide oléique en oléoyl-CoA, qui par condensation avec la glycine sous l'action de la « bile acid coenzyme A transferase » (BACAT) génère la *N*-oléoylglycine. L'oléamide est ensuite formé suite au clivage oxydatif de la *N*-oléoylglycine réalisé par la « peptidylglycine α-amidating moxooxygenase » (PAM).[123]

[121] Bisogno T., Sepe N., De Petrocellis L., Mechoulam R., Di Marzo V. The sleep inducing factor oleamide is produced by mouse neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **1997,** *239,* 473-479

[122] Hiley C. R., Hoi P. M. Oleamide: a fatty acid amide signaling molecule in the cardiovascular system? *Cardiovasc. Drug Rev.,* **2007,** *25,* 46-60

[123] Merkler D. J., Chew G. H., Gee A. J., Merkler K. A., Sorondo J. P., Johnson M. E. Oleic acid derived metabolites in mouse neuroblastoma N18TG2 cells. *Biochemistry,* **2004,** *43,* 12667-12674

Lorsqu'ils sont générés, les endocannabinoïdes peuvent interagir avec les récepteurs CB1 et CB2 et ainsi modifier les signaux intracellulaires en agissant par exemple sur l'activité cyclasique, la perméabilité des canaux ioniques ou encore sur la modulation de la voie des protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAP kinases).[124]

2. 5) Les voies de signalisation intracellulaire modulées par les endocannabinoïdes

5. a) Les voies de transduction associées au récepteur CB1

Le récepteur CB1 fait partie de la famille des RCPG. Son couplage aux protéines G a été mis en évidence sur des membranes cérébelleuses de rat lorsque son activation a entraîné une augmentation de la liaison du GTP radiomarqué ([^{35}S]GTPγS).[125] De plus, la plupart des effets induits par les cannabinoïdes sont sensibles à la toxine pertussique indiquant l'implication de la famille des protéines G de type $G_{i/0}$.[126]

Au niveau neuronal, du fait de sa localisation présynaptique, l'activation du récepteur CB1 induit une inhibition de la neurotransmission dans plusieurs aires du cerveau comme l'hippocampe, l'hypothalamus, le cervelet, le noyau accumbens et le cortex.[127] En effet, la stimulation de la protéine inhibe la production de certains neurotransmetteurs comme le GABA et le glutamate.

Ainsi, au niveau de la synapse glutamatergique, on peut observer le mécanisme rétrograde des endocannabinoïdes : un stimulus présynaptique crée une dépolarisation de la membrane et induit une entrée de calcium dans la cellule (étape 1), ce qui va générer la libération de neurotransmetteurs (étape 2). Ceux-ci en activant leurs récepteurs post-synaptiques provoquent en aval une dépolarisation conduisant à une entrée de calcium au niveau intracellulaire (étape 3). En réponse à cette augmentation de la concentration calcique, des précurseurs lipidiques sont hydrolysés pour permettre la synthèse des endocannabinoïdes (étape 4). Ceux-ci quittent alors le neurone post-synaptique pour aller activer les récepteurs CB1 situés au niveau de la membrane du neurone présynaptique. La fixation des endocannabinoïdes aux récepteurs CB1 va entraîner, *via* les sous-unités β et γ de la protéine G, l'inhibition

[124] Howlett A. C., Mukhopadhyay S. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Phys. Lipids,* **2000,** *108,* 53-70

[125] Selley D. E., Stark S., Sim L. J., Childers S. R. Cannabinoid receptor stimulation of guanosine-5'-O-(3-[^{35}S]thio)triphosphate binding in rat brain membranes. *Life Sci.,* **1996,** *59,* 659-668

[126] Howlett A. C., Qualy J. M., Khachatrian L. L. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol. Pharmacol.,* **1986,** *29,* 307-313

[127] Kawamura Y., Fukaya M., Maejima T., Yoshida T., Miura E., Watanabe M., Ohno-Shosaku T., Kano M. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J. Neurosci.,* **2006,** *26,* 2991-3001

directe des canaux calciques voltage-dépendants de type T (étape 5),[128] diminuant ainsi les taux intracellulaires de calcium et donc, la libération de neurotransmetteurs.[129]

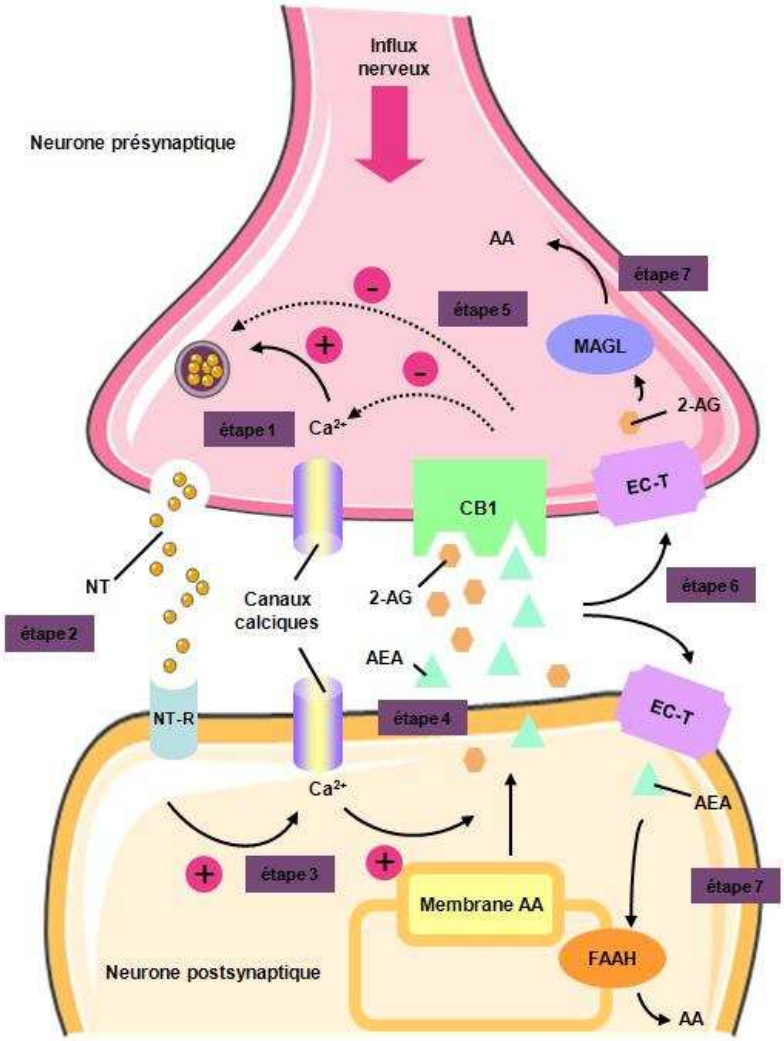


Figure A. 30. Action rétrograde des endocannabinoïdes

Comme énoncé précédemment, le couplage du récepteur CB1 à des protéines G de type $G_{i/0}$ permet de jouer à la fois, au niveau central et périphérique, sur l'activité cyclasique, la perméabilité de certains canaux ioniques ainsi que sur la voie des MAP Kinases. Toutefois, dans certains systèmes et sous certaines

[128] Chemin J., Monteil A., Perez-Reyes E., Nargeot J., Lory P. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J.,* **2001,** *20,* 7033-7040
[129] Wilson R. I., Nicoll R. A. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science,* **2002,** *296,* 678-682

conditions, le récepteur CB1 peut être couplé à des protéines de type G_s et/ou $G_{q/11}$ en plus de celles de type $G_{i/0}$.[130]

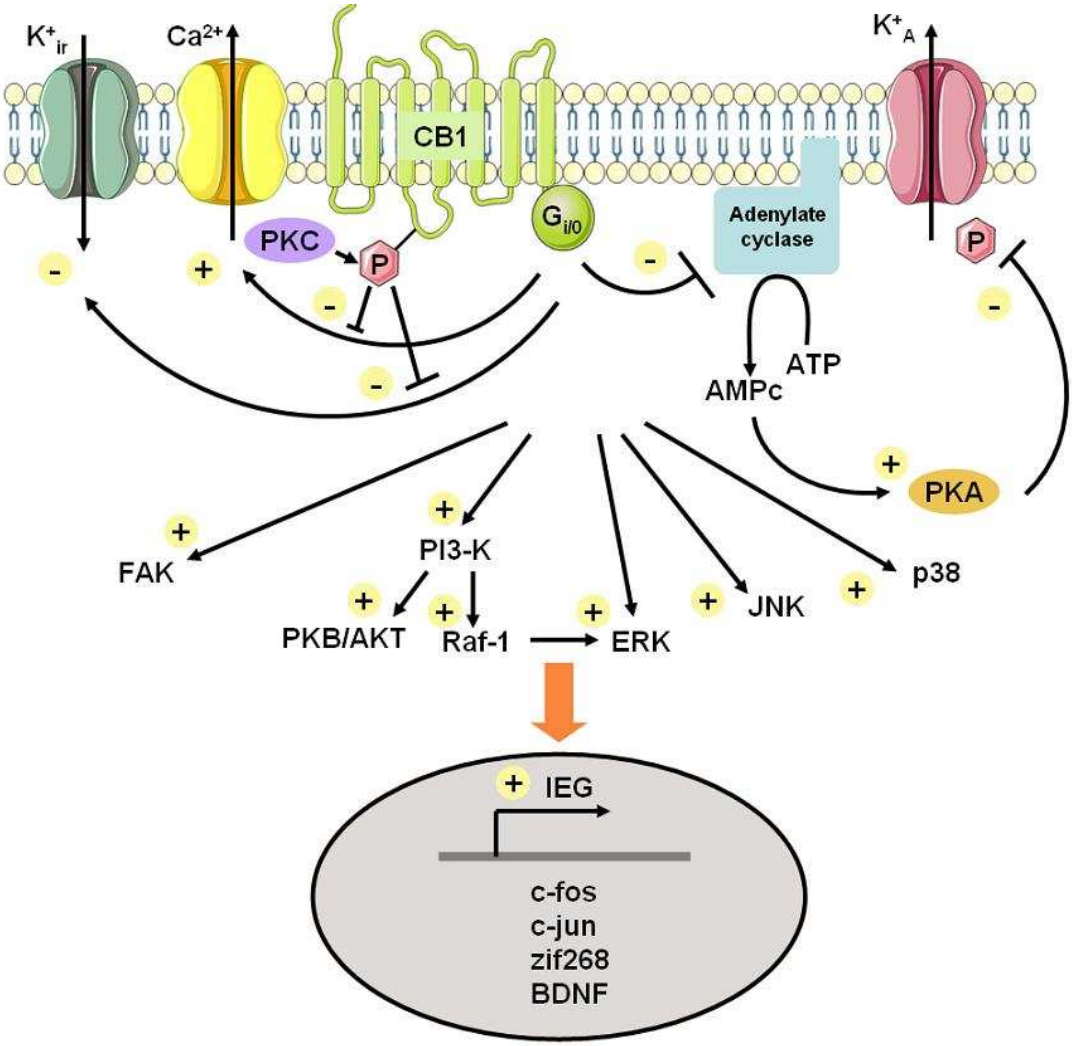


Figure A. 31. Principales voies de transduction associées au récepteur CB1

Lors de l'activation du récepteur CB1, la sous-unité $G_{\alpha i}$ de la protéine G_i inhibe l'adénylate cyclase (AC), ce qui induit une diminution de la production d'AMPc intracellulaire. Cependant, il a été constaté une réponse stimulatrice de l'AC due à l'activation d'une protéine de type G_s, lorsque la protéine $G_{i/0}$ était inhibée par la toxine pertussique.[131] En aval de l'adénylate cyclase, la production d'AMPc régule l'activité de la protéine

[130] Demuth D. G., Molleman A. Cannabinoid signaling. *Life Sci.,* **2006,** *78,* 549-563

[131] Bonhaus D. W., Chang L. K., Kwan J., Martin G. R. Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **1998,** *287,* 884-888

kinase A (PKA) à l'origine de la modulation de la phosphorylation des canaux potassiques de type A.[132] Par ailleurs, la stimulation de CB1 entraîne également l'activation des canaux potassiques de la rectification entrante (K_{ir}), ce qui tend à diminuer l'excitabilité neuronale.[133]

En plus des canaux de type T, l'activation du récepteur CB1 induit un blocage des canaux calciques de type L, N et P/Q par le biais d'une protéine de type $G_{i/0}$ indépendante de l'activité cyclasique.[134] Cette inhibition est levée par l'action de l'antagoniste SR141716A ou de la toxine pertussique. C'est pourquoi, elle est qualifiée d'indirecte.[135]

La stimulation du récepteur CB1 agit également sur l'activité de différentes kinases intracellulaires. Par exemple, il a été montré que les agonistes des récepteurs aux cannabinoïdes stimulent la phosphorylation de la « focal adhesion kinase » (FAK) dans les tranches hippocampales.[136] Cette stimulation dépendante de la PKA, est bloquée par le SR141716A et la toxine pertussique. CB1 exerce par ailleurs un contrôle sur la voie des MAP-kinases telles que les « extracellular signal-related protein kinases » (ERKs) qui sont impliquées dans la régulation de l'expression de gènes et la synthèse protéique.[137] D'autres MAP-kinases sont activées par la stimulation des récepteurs CB1 : il s'agit de p38 et p42/44 MAP-kinase ainsi que de « c-jun *N*-terminal-kinase » (JNK). Ces différentes MAP-kinases jouent un rôle clé dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose cellulaires.

Les mécanismes permettant l'induction des MAP-kinases ne sont pas encore clairement élucidés. Actuellement, deux voies de signalisation ont été proposées : la première implique l'activation de la « phophatidyl-inositol 3-kinase » (PI_3K) par les sous-unités $G_{\beta\gamma}$ de la protéine $G_{i/0}$. Cette activation serait à l'origine de la stimulation de Raf-1, laquelle induirait la phosphorylation subséquente des MAP-kinases.

---

[132] Deadwyler S. A., Hampson R. E., Mu J., Whyte A., Childers S. Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **1995,** *273,* 734-743

[133] Mackie K., Lai Y., Westenbroek R., Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neurosci.,* **1995,** *15,* 6552-6561

[134] Mackie K., Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **1992,** *89,* 3825-3829

[135] Gebremedhin D., Lange A. R., Campbell W. B., Hillard C. J., Harder D. R. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca^{2+} channel current. *Am. J. Physiol.,* **1999,** *276,* H2085-H2093

[136] Derkinderen P., Toutant M., Burgaya F., Le Bert M., Siciliano J. C., De Franciscis V., Gelman M., Girault J. A. Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science,* **1996,** *273,* 1719-1722

[137] Bouaboula M., Poinot-Chazel C., Bourrie B., Canat X., Calandra B., Rinaldi-Carmona M., Le Fur G., Casellas P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem. J.,* **1995,** *312,* 637-641

La seconde impliquerait quant à elle l'intervention de la protéine cytoplasmique FAN[138] (« factor associated with neutral sphingomyelinase activation ») qui, couplée à une sphingomyélinase, permet la dégradation de la sphingomyéline en céramide, un agent mitogène de la famille des sphingolipides notamment impliqué dans le cycle et la prolifération cellulaire. Par ailleurs, le céramide est un second messager important puisque *via* sa synthèse *de novo*, il permet l'activation de la sérine palmitoyltransférase (SPTase) qui va induire la dégradation des acides gras en céramide, à l'origine de l'inhibition de la voie de survie tumorale PI_3K/AKT (ou PI_3K/PKB).[139]

En aval de l'activation des MAP-kinases, la stimulation de CB1 provoque l'expression de gènes précoces tels que Krox-24 et BDNF, notamment impliqués dans la plasticité synaptique ainsi que celle de c-fos et c-jun qui contrôlent un certain nombre de processus cellulaires comme la différentiation, la prolifération ou encore l'apoptose.[140,141]

Dans la lignée cellulaire cancéreuse mammaire MCF-7, la stimulation des MAP-kinases induite par l'anandamide provoque une diminution de l'expression des récepteurs à la prolactine et des récepteurs aux neutrophines à activité tyrosine kinase (Trk) par le biais d'une voie faisant intervenir la PKA et aboutissant *in fine* à un effet antiprolifératif.[142]

5. b) Les voies de transduction associées au récepteur CB2

Les récepteurs CB1 et CB2 présentent des similitudes au niveau de leurs voies de transduction, comme l'inhibition de l'adénylate cyclase et la modulation des protéines ERKs. Toutefois, contrairement à son homologue CB1, CB2 n'affecte pas directement les canaux ioniques.[143,33] En revanche, les cannabinoïdes induisent l'inhibition de l'activité cyclasique de manière dose-dépendante dans des cultures de cellules CHO transfectées par le récepteur CB2. Cet effet étant sensible à la toxine pertussique, il traduit l'implication

[138] Sanchez C., Galve-Roperh I., Rueda D., Guzman M. Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Δ^9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol. Pharmacol.,* **1998,** *54,* 834-843

[139] Radin N. S. Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. *Biochem. J.,* **2003,** *371,* 243-256

[140] Derkinderen P., Valjent E., Toutant M., Corvol J. C., Enslen H., Ledent C., Trzaskos J., Caboche J., Girault J. A. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J. Neurosci.,* **2003,** *23,* 2371-2382

[141] Patel N. A., Moldow R. L., Patel J. A., Wu G., Chang S. L. Arachidonylethanolamide (AEA) activation of FOS proto-oncogene protein immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.,* **1998,** *797,* 225-233

[142] Melck D., Rueda D., Galve-Roperh I., De Petrocellis L., Guzman M., Di Marzo V. Involvement of the cAMP/protein kinase A pathway and of mitogen-activated protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett.,* **1999,** *463,* 235-240

[143] Felder C. C., Joyce K. E., Briley E. M., Mansouri J., Mackie K., Blond O., Lai Y., Ma A. L., Mitchell R. L. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.,* **1995,** *48,* 443-450

d'une protéine G de type $G_{i/0}$.[144,145] Cependant, par opposition à ce qui avait été constaté pour CB1, aucune stimulation de l'AC n'a été observée après le traitement par la toxine pertussique indiquant que le récepteur CB2 n'est pas couplé à une protéine de type G_s.[146,147] Ceci constitue une différence majeure entre les voies de transduction des récepteurs CB1 et CB2.

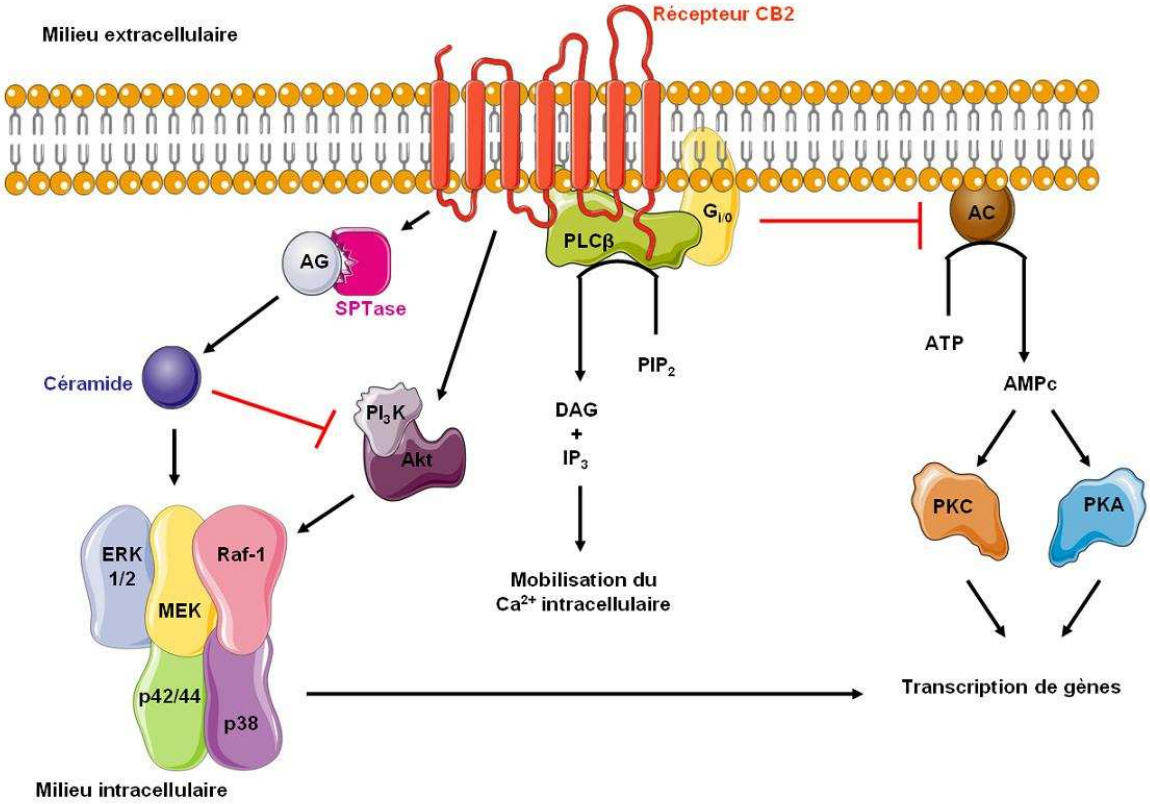


Figure A. 32. Principales voies de transduction associées au récepteur CB2

L'inhibition de la production d'AMPc induite par l'activation du récepteur CB2, pourrait en partie expliquer la modulation des fonctions immunitaires exercées par les cannabinoïdes.[148] En effet, le taux d'AMPc contrôle,

[144] Bayewitch M., Avidor-Reiss T., Levy R., Barg J., Mechoulam R., Vogel Z. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett.,* **1995,** *375*, 143-147

[145] Slipetz D. M., O'Neill G. P., Favreau L., Dufresne C., Gallant M., Gareau Y., Guay D., Labelle M., Metters K. M. Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.,* **1995,** *48,* 352-361

[146] Glass M., Felder C. C. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J. Neurosci.,* **1997,** *17,* 5327-5333

[147] Calandra B., Portier M., Kerneis A., Delpech M., Carillon C., Le Fur G., Ferrara P., Shire D. Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.,* **1999,** *374,* 445-455

[148] Kaminski N. E. Immune regulation by cannabinoid compounds through the inhibition of the cyclic AMP signaling cascade and altered gene expression. *Biochem. Pharmacol.,* **1996,** *52,* 1133-1140

par le biais de certaines protéines kinases (PKA et PKC) et régulatrices (AP-1, NF-AT et NF-κB), la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 2. Ainsi, la diminution du taux d'AMPc intracellulaire entraîne une diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

Comme pour le récepteur CB1, la stimulation du récepteur CB2 exerce un contrôle sur les MAP-Kinases. L'activation de la p42/44 MAP-kinase a notamment été montrée dans deux lignées cellulaires (CHO et HL-60) exprimant le récepteur CB2.[149,150] Cet effet étant bloqué à la fois par la toxine pertussique et par le SR144528 (un antagoniste/agoniste inverse du récepteur CB2), il traduit la présence d'une protéine $G_{i/0}$ à l'origine de ce phénomène.

L'activation du récepteur CB2 induit également l'expression de Krox-24 par un mécanisme partiellement élucidé et dépendant de la PKC.[144]

Par ailleurs, le récepteur CB2 est impliqué, *via* l'activation de la sérine palmitoyltransférase (SPTase), dans la synthèse *de novo* de céramide.[134] L'augmentation du taux intracellulaire de ce sphingolipide permet d'inhiber la voie de survie tumorale PI_3K/Akt et d'agir sur la voie des MAP-kinases, notamment sur la protéine ERK engagée dans la régulation du cycle cellulaire.[151]

Enfin, la stimulation de CB2 influence indirectement le flux d'ions calcium intracellulaire. En effet, il a été démontré que l'anandamide induit une fuite d'ions Ca^{2+} dans des cellules endothéliales pulmonaires de veau. Cet effet inhibé par le SR144528 mais insensible au SR141716A résulte de l'activation de la phospholipase C *via* le récepteur CB2.[152]

[149] Bouaboula M., Poinot-Chazel C., Marchand J., Canat X., Bourrie B., Rinaldi-Carmona M., Calandra B., Le Fur G., Casellas P. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur. J. Biochem.,* **1996,** *237,* 704-711

[150] Kobayashi Y., Arai S., Waku K., Sugiura T. Activation by 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, of p42/44 mitogen-activated protein kinase in HL-60 cells. *J. Biochem.,* **2001,** *129,* 665-669

[151] Hart S., Fischer O. M., Ullrich A. Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.,* **2004,** *64,* 1943-1950

[152] Zoratti C., Kipmen-Korgun D., Osibow K., Malli R., Graier W. F. Anandamide initiates Ca^{2+} signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.,* **2003,** *140,* 1351-1362

2. 6) Les voies de signalisation intracellulaire modulées par les molécules associées aux endocannabinoïdes

6. a) Les voies de transduction modulées par l'oléamide

Comme énoncé précédemment, les mécanismes d'action de l'oléamide demeurent encore méconnus. Toutefois, deux hypothèses ont été avancées : la première consiste en un effet potentialisateur des effets de l'anandamide. En effet, l'oléamide, comme l'anandamide est dégradé par la FAAH. Ainsi en prenant la place de l'anandamide au niveau du site actif de l'enzyme, l'oléamide jouerait un rôle d'inhibiteur endogène de la FAAH et potentialiserait les effets cannabinomimétiques de l'anandamide en augmentant sa durée de vie.

La seconde hypothèse, avancée en 1996 par Huidobro-Toro et Harris, affirme que l'oléamide activerait les récepteurs sérotoninergiques 5-HT2$_A$ et 5-HT2$_C$.[153] Par la suite, d'autres études ont également démontré la capacité du composé à interagir avec un site allostérique du récepteur 5-HT7.[154] Ainsi, les voies de signalisation intracellulaire activées par l'oléamide sont celles des récepteurs 5-HT2$_A$, 5-HT2$_C$ et 5-HT7.

Quatorze sous-types de récepteurs à la sérotonine ont été décrits, puis classés en sept familles (de 5-HT1 à 5-HT7). A l'exception du récepteur 5-HT3 qui est un récepteur canal, les récepteurs sérotoninergiques sont tous des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G.[155]

Les récepteurs 5-HT2 sont couplés à une protéine de type $G_{q/11}$, qui, lorsqu'elle est activée, stimule la PLC induisant alors la dégradation du phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphate (PIP_2) en DAG et en IP_3 (inositol-(1,4,5)-triphosphate). L'augmentation des niveaux intracellulaires de DAG active la PKC à l'origine de la transcription de gènes tandis que l'augmentation des taux d'IP_3 permet la mobilisation du calcium intracellulaire.[156]

[153] Huidobro-Toro J. P., Harris R. A. Brain lipids that induce sleep are novel modulators of 5-hydroxytrypamine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **1996,** *93*, 8078-8082
[154] Thomas E. A., Carson M. J., Neal M. J., Sutcliffe J. G. Unique allosteric regulation of 5-hydroxytryptamine receptor-mediated signal transduction by oleamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **1997,** *94,* 14115-14119
[155] Hoyer D., Hannon J. P., Martin G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **2002,** *71,*, 533-554
[156] Kitson S. L. 5-Hydroxytryptamine (5-HT) receptor ligands. *Curr. Pharm. Des.,* **2007,** *13,* 2621-2637

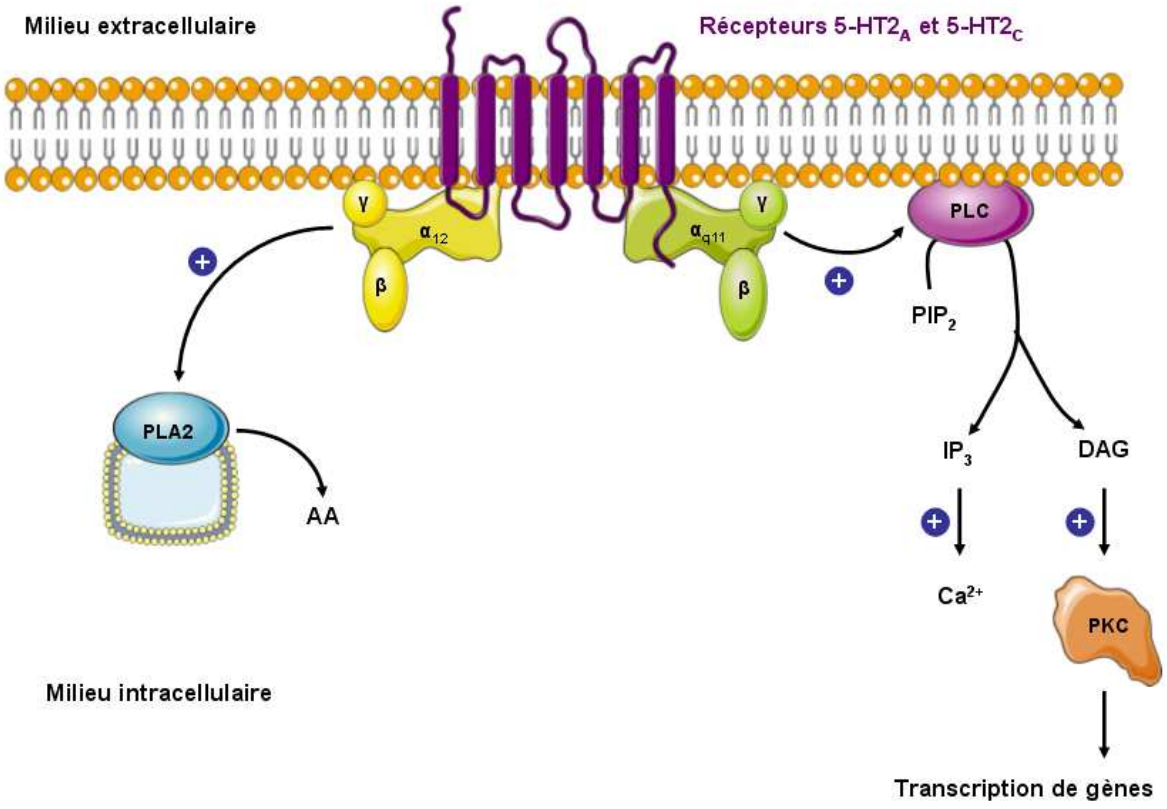


Figure A. 33. Principales voies de transduction associées aux récepteurs 5-HT2$_A$ et 5-HT2$_C$

En plus d'activer la PLC, les récepteurs 5-HT2$_A$ et 5-HT2$_C$ activent, par le biais d'une protéine de type G_{12}, la phospholipase A2 (PLA2) qui va induire l'hydrolyse de précurseurs lipidiques membranaires conduisant à la synthèse d'acide arachidonique.[157]

Enfin, les récepteurs 5-HT2$_C$ augmentent l'activité cyclasique par le biais d'une protéine G_s, ce qui favorise l'augmentation des niveaux intracellulaires de GMPc.[158]

Les récepteurs 5-HT7 ont une distribution centrale et sont essentiellement post-synaptiques.[159] Ils sont couplés à une protéine de type G_s qui stimule l'activité cyclasique induisant, en aval, l'activation de la PKA à l'origine de la stimulation de la conductance potassique et de la transcription de gènes.[160]

[157] Nitsch R. M., Deng M., Growdon J. H., Wurtman R. J. Serotonin 5-HT2a and 5-HT2c receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion. *J. Biol. Chem.,* **1996,** *271,* 4188-4194
[158] Maura G., Marcoli M., Pepicelli O., Rosu C., Viola C., Raiteri M. Serotonin inhibition of the NMDA receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway in human neocortex slices: involvement of 5-HT(2C) and 5-HT(1A) receptors. *Br. J. Pharmacol.,* **2000,** *130,* 1853-1858
[159] Clemett D. A., Kendall D. A., Cockett M. I., Marsden C. A., Fone K. C. Pindolol-insensitive [3H]-5-hydroxytryptamine binding in the rat hypothalamus; identity with 5-HT7 receptors. *Br. J. Pharmacol.,* **1999**, *127*, 236-242

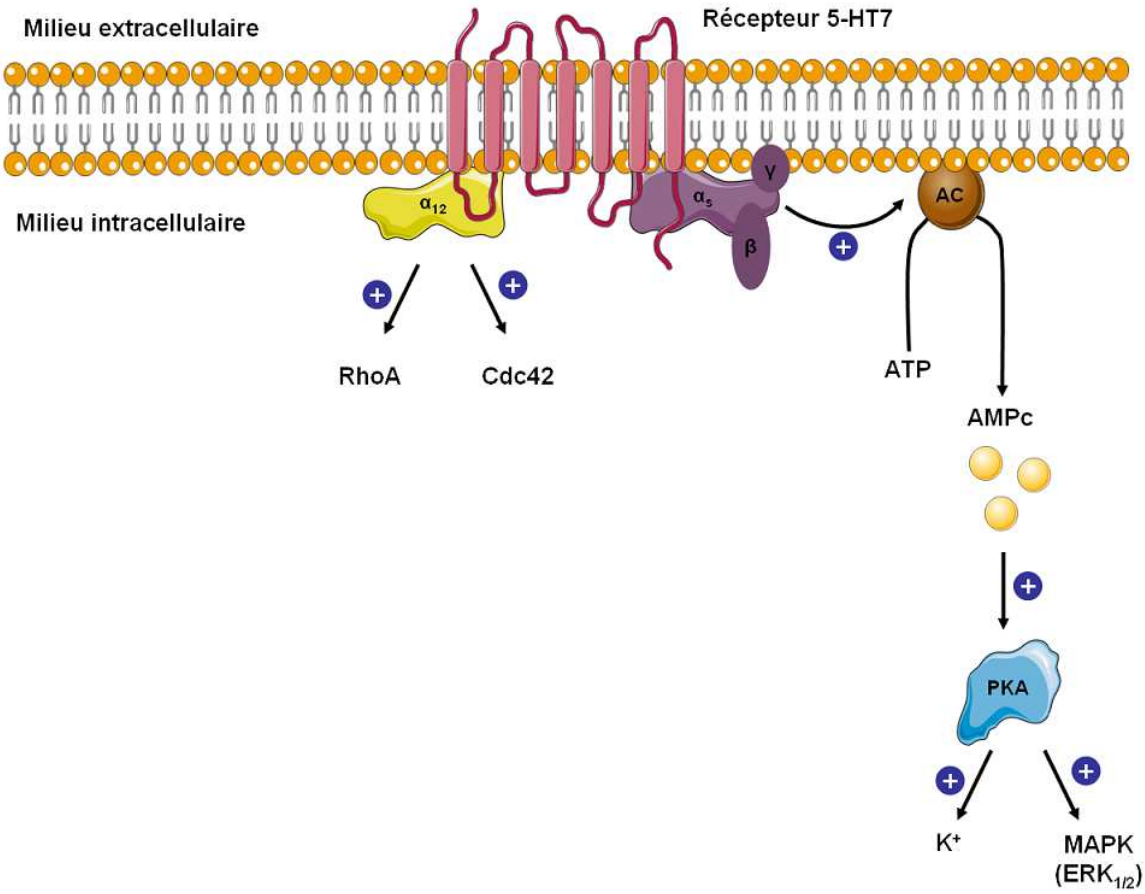


Figure A. 34. Principales voies de transduction associées aux récepteurs 5-HT7

Par ailleurs, le couplage des récepteurs 5-HT7 à une protéine de type G_{12} induit la transcription de gènes tels que RhoA, impliqué dans les mécanismes de cytotoxicité à médiation cellulaire, ou Cdc42, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire.[161]

[160] Wada K., Hu L., Mores N., Navarro C. E., Fuda H., Krsmanovic L. Z., Catt K. J. Serotonin (5-HT) receptor subtypes mediate specific modes of 5-HT-induced signaling and regulation of neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol. Endocrinol.*, **2006,** *20,* 125-135

[161] Kvachnina E., Liu G., Dityatev A., Renner U., Dumuis A., Richter D. W., Dityateva G., Schachner M., Voyno-Yasenetskaya T. A., Ponimaskin E. G. 5-HT7 receptor is coupled to G alpha subunits of heterotrimeric G12-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology. *J. Neurosci.,* **2005,** *25,* 7821-7830

6. b) Les voies de transduction modulées par le palmitoyléthanolamide

Bien que ses mécanismes d'action demeurent encore partiellement connus, le PEA est aujourd'hui suspecté d'interagir avec le récepteur PPAR-α et/ou avec le récepteur orphelin GPR55. Par conséquent, il serait capable de moduler les différentes voies de transduction associées à ces récepteurs.

PPAR-α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires.[162]

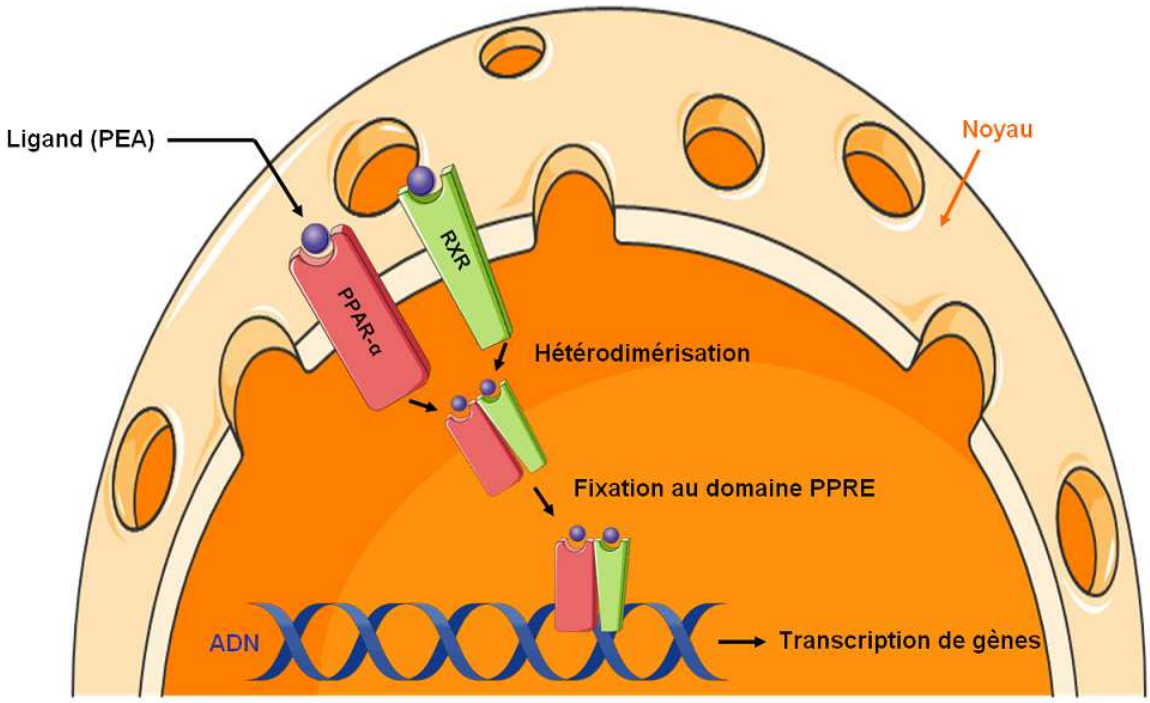


Figure A. 35. Mécanisme d'action des récepteurs PPAR-α

En formant un hétérodimère avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR), il permet le recrutement de co-activateurs induisant la fixation du complexe sur un élément spécifique de l'ADN appelé PPRE (Peroxisome Proliferator Responsive Element).[163] L'interaction entre le complexe PPAR-α/RXR sur le domaine PPRE de

[162] Collett G. P., Betts A. M., Johnson M. I., Pulimood A. B., Cook S., Neal D. E., Robson C. N. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is an androgen-responsive gene in human prostate and is highly expressed in prostatic adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.,* **2000,** *6,* 3241-3248

[163] Bardot O., Aldridge T. C., Latruffe N., Green S. PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1993**, *192*, 37-45

l'ADN induit la transcription de gènes cibles notamment impliqués dans la régulation de l'inflammation[164] et dans la dégradation oxydative des acides gras.[165]

Le récepteur orphelin GPR55 fait partie des RCPG. Il est couplé à une protéine G hétérotrimérique, qui, par le biais de sa sous-unité α_{13} permet l'activation de la protéine RhoA. Cette dernière permet l'activation de la PLC, *via* le recrutement de la « Rho associated kinase » (ROCK). En dégradant le PIP_2 en DAG et en IP_3, la PLC permet l'augmentation des taux de calcium intracellulaires qui, par le biais de NFAT (« nuclear factor of activated T-cells ») induisent la transcription de gènes.[166]

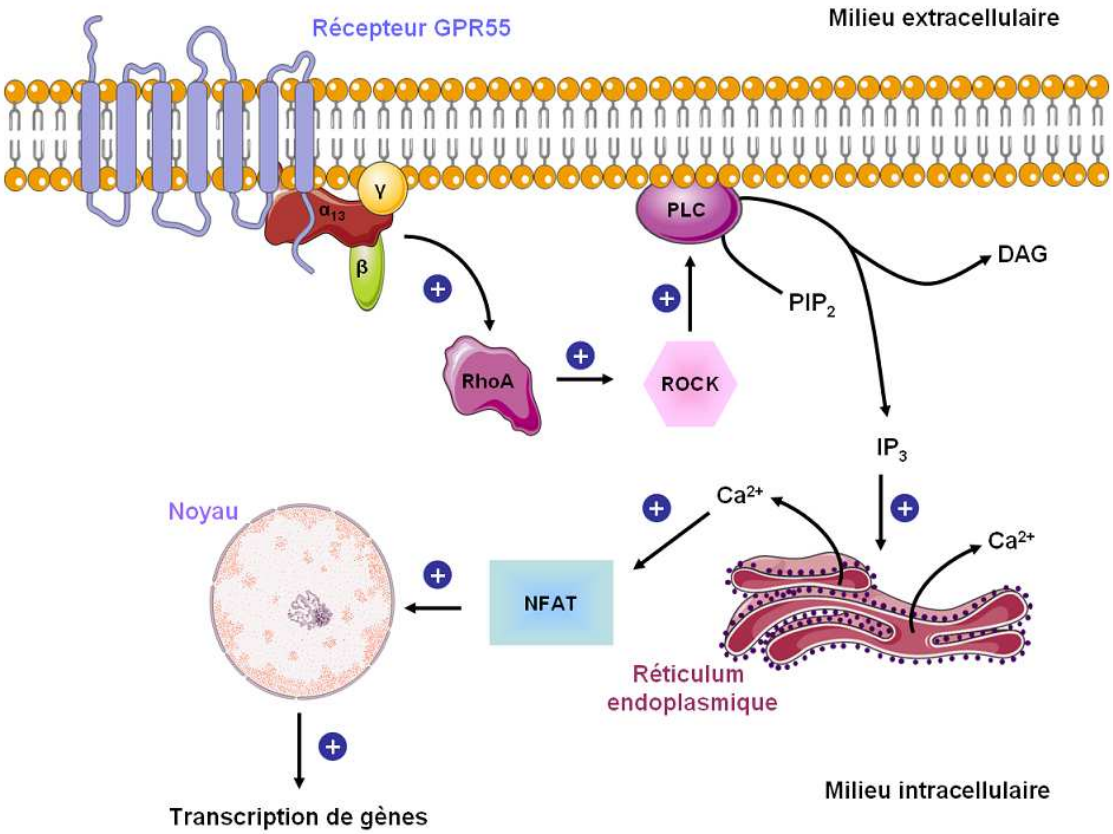


Figure A. 36. Principales voies de transduction associées au récepteur GPR55

[164] Staels B., Koenig W., Habib A., Merval R., Lebret M., Torra I. P., Delerive P., Fadel A., Chinetti G., Fruchart J. C., Najib J., Maclouf J., Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature,* **1998,** *393,* 790-793

[165] Lee S. S., Pineau T., Drago J., Lee E. J., Owens J. W., Kroetz D. L., Fernandez-Salguero P. M., Westphal H., Gonzalez F. J. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.,* **1995,** *15,* 3012-3022

[166] Henstridge C. M., Balenga N. A., Ford L. A., Ross R. A., Waldhoer M., Irving A. J. The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca^{2+} signaling and NFAT activation. *FASEB J.,* **2009,** *23,* 183-193

L'anandamide, le 2-AG, l'oléamide et le PEA agissent sur des voies de transduction spécifiques à l'origine de leurs effets thérapeutiques intéressants. Toutefois, leur durée de vie est limitée car de nombreux systèmes de biodégradation les prennent en charge. Parfois même, une partie des endocannabinoïdes qui sont libérés dans la fente synaptique (Figure A.29) est recaptée puis dégradée avant même d'avoir pu interagir avec les récepteurs aux cannabinoïdes.

2. 7) Les systèmes impliqués dans la biodégradation des endocannabinoïdes et des molécules endogènes associées aux endocannabinoïdes

7. a) Les systèmes de biodégradation impliqués dans le transport des endocannabinoïdes

Bien que les endocannabinoïdes soient de nature lipophile et puissent diffuser librement à travers la membrane cellulaire, de nombreuses études suggèrent l'existence de mécanismes facilitant l'internalisation des endocannabinoïdes. Il s'agirait d'un transporteur qui, encore aujourd'hui, n'a surtout été décrit que pour l'anandamide et n'a pas été réellement caractérisé.[167]

Plusieurs hypothèses concernant les mécanismes impliqués dans le transport de l'anandamide ont été avancées. La première repose sur le phénomène de diffusion passive.[168] Dans le modèle proposé, la diffusion passive de l'anandamide à travers la membrane plasmique serait régulée par sa principale enzyme de dégradation : la FAAH. En effet, l'activité hydrolytique de la FAAH au niveau intracellulaire entretiendrait un gradient de concentration transmembranaire d'anandamide.[169,170] Ce courant centripète conduirait l'anandamide à travers la membrane plasmique par simple diffusion. Par ailleurs, l'anandamide existerait sous deux formes au niveau extracellulaire : une forme libre et une forme liée à une protéine plasmatique, telle que l'albumine.[171] L'équilibre entre ces deux formes permettrait de maintenir la concentration extracellulaire en anandamide.

[167] Yates M. L., Barker E. L. Organized trafficking of anandamide and related lipids. *Vitam. Horm.,* **2009,** *81,* 25-53
[168] Hillard C. J., Edgemond W. S., Jarrahian A., Campbell W. B. Accumulation of *N*-arachidonoylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J. Neurochem.,* **1997**, *69,* 631-638
[169] Day T. A., Rakhshan F., Deutsch D. G., Barker E. L. Role of fatty acid amide hydrolase in the transport of the endogenous cannabinoid anandamide. *Mol. Pharmacol.,* **2001,** *59,* 1369-1375
[170] Deutsch D. G., Glaser S. T., Howell J. M., Kunz J. S., Puffenbarger R. A., Hillard C. J., Abumrad N. The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276,* 6967-6973
[171] Bojesen I. N., Hansen H. S. Binding of anandamide to bovine serum albumin. *J. Lipid Res.,* **2003**, *44,* 1790-1794

La seconde hypothèse est une variante de la précédente : elle suggère la contribution d'une protéine de liaison intracellulaire, qui piège l'anandamide et l'amène jusqu'à la FAAH.[172] Après avoir franchi la membrane plasmique, l'anandamide serait séquestré par cette protéine de liaison et existerait alors à l'intérieur de la cellule sous deux formes : une forme libre et une forme liée.[163] Le passage continu de la forme libre à la forme liée au niveau intracellulaire entretiendrait le gradient de concentration transmembranaire d'anandamide, à l'origine de sa diffusion passive.

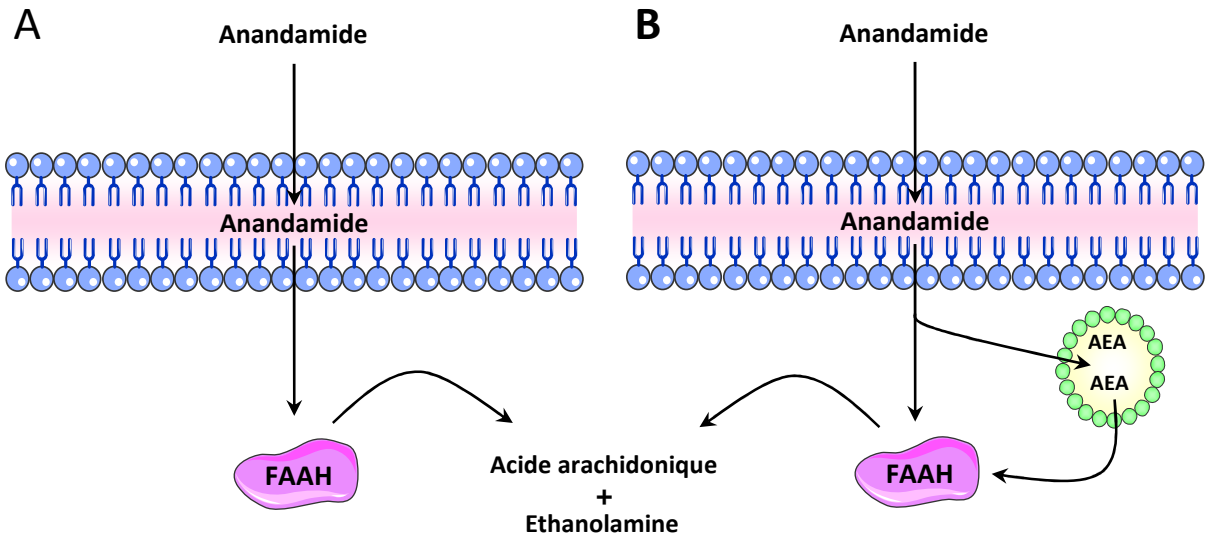


Figure A. 37. Transport de l'anandamide par diffusion passive (A : sans protéine de liaison intracellualire, B : avec protéine de liaison intracellulaire)

Le fait que la recapture de l'anandamide dans différentes aires du cerveau puisse être inhibée par des composés qui ne soient ni substrats, ni inhibiteurs de la FAAH, a suggéré l'existence d'un transporteur spécifique favorisant le passage de l'anandamide à travers la membrane plasmique.[173,174] Ce transporteur de l'anandamide (AT) induirait le mouvement exclusif des amides et esters d'acides gras,[175] comme l'anandamide et le 2-AG. Le 2-AG entrerait en compétition avec l'anandamide pour le transport puisque,

[172] Ortega-Gutierrez S., Hawkins E. G., Viso A., Lopez-Rodriguez M. L., Cravatt B. F. Comparison of anandamide transport in FAAH wild-type and knockout neurons: evidence for contributions by both FAAH and the CB1 receptor to anandamide uptake. *Biochemistry*, **2004**, *43,* 8184-8190

[173] Beltramo M., Stella N., Calignano A., Lin S. Y., Makriyannis A., Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science.* **1997,** *277,* 1094-1097

[174] Piomelli D., Beltramo M., Glasnapp S., Lin S. Y., Goutopoulos A., Xie X. Q., Makriyannis A. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **1999,** *96,* 5802-5807

[175] Jarrahian A., Manna S., Edgemond W. S., Campbell W. B., Hillard C. J. Structure-activity relationships among N-arachidonylethanolamine (Anandamide) head group analogues for the anandamide transporter. *J. Neurochem.*, **2000,** *74,* 2597-2606

selon ces études, l'affinité du transporteur est équivalente[169] ou deux fois plus grande pour le 2-AG que pour l'anandamide.[176] Il jouerait donc le rôle de médiateur de la recapture ou de la libération de l'anandamide et du 2-AG des neurones du cerveau.[168] De nombreux éléments biochimiques concourent actuellement à cette hypothèse : une étude récente a notamment mis en évidence un site de fixation de l'anandamide sur une protéine dite de transport,[171] dont le clonage et l'expression permettraient de mieux connaître son rôle dans le processus de métabolisation de l'anandamide.

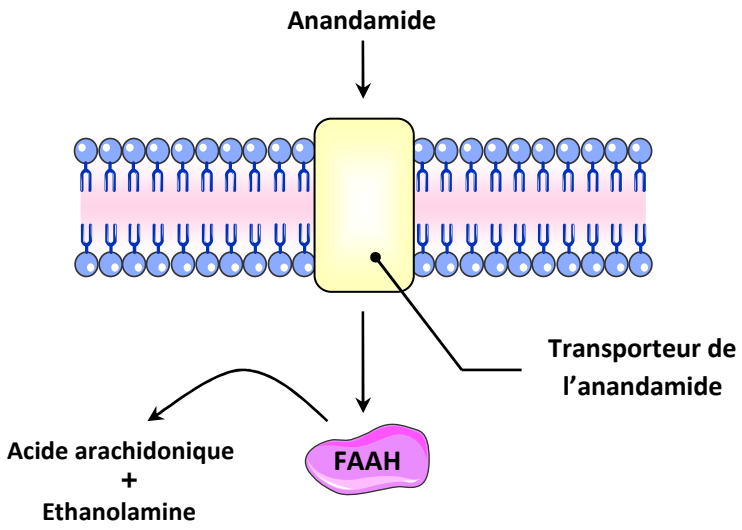


Figure A. 38. Transport de l'anandamide impliquant une protéine de transport

Enfin, des travaux réalisés sur des cellules RBL-2H3 ont suggéré un mécanisme de transport impliquant un processus d'endocytose. En effet, le transport de l'anandamide a été réduit de moitié en présence d'inhibiteurs de l'endocytose comme la nystatine et la progestérone.[170] Ainsi, l'anandamide serait conduit à la FAAH par le biais de sa liaison à une protéine membranaire qui induirait ensuite son endocytose.

[176] Moore S. A., Nomikos G. G., Dickason-Chesterfield A. K., Schober D. A., Schaus J. M., Ying B. P., Xu Y. C., Phebus L., Simmons R. M., Li D., Iyengar S., Felder C. C. Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2005,** *102,* 17852-17857

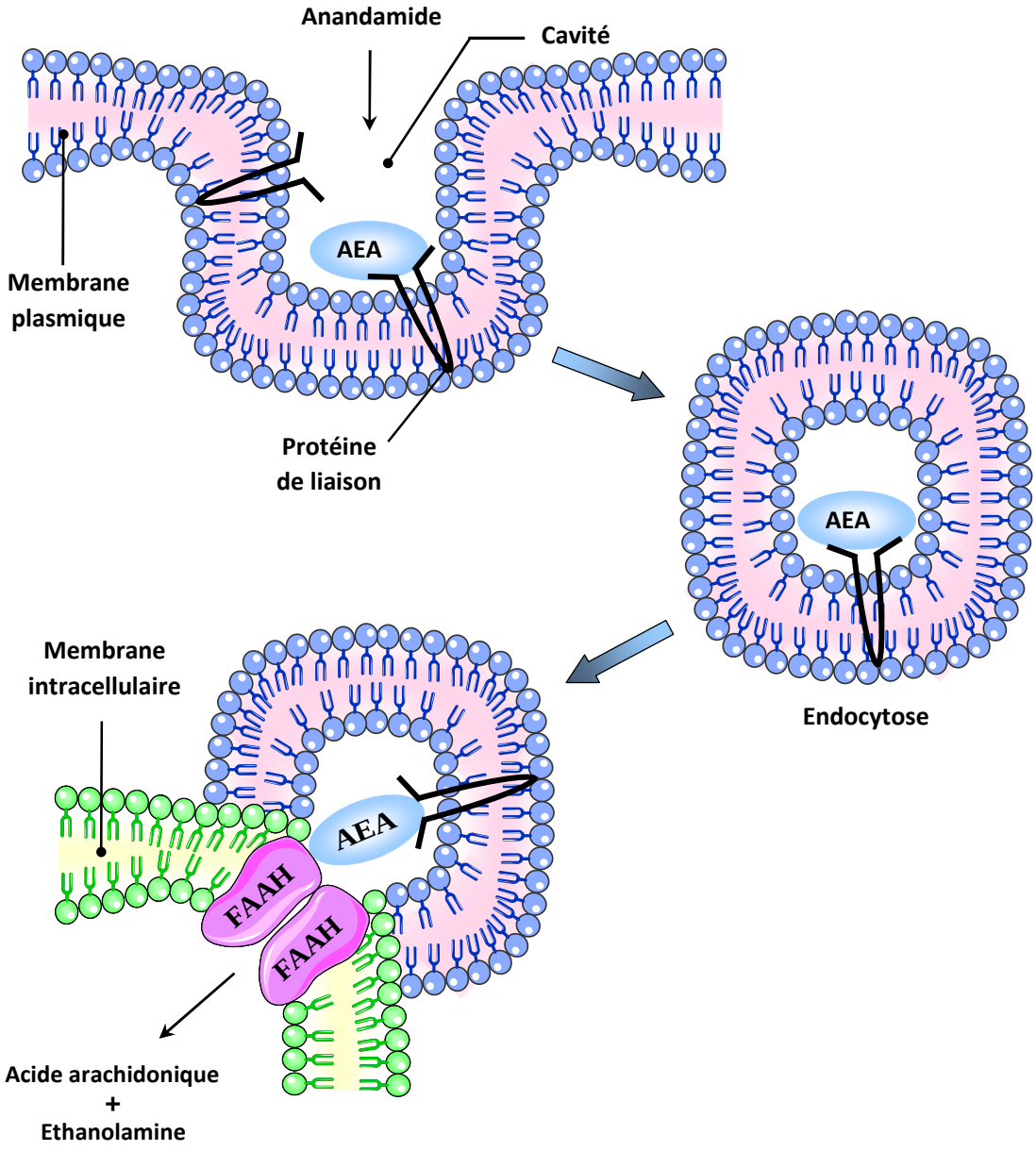
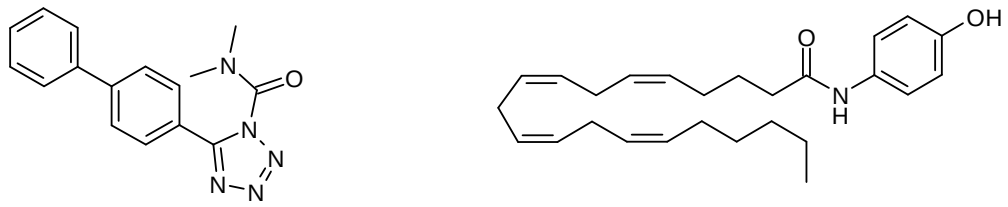


Figure A. 39. Transport de l'anandamide impliquant un processus d'endocytose

Il n'existe donc pas encore de modèle unique validé caractérisant le transport des endocannabinoïdes.[177] Toutefois, de nombreux éléments concourent actuellement à l'existence d'une protéine de transport facilitant l'internalisation des endocannabinoïdes,[178] sans compter le fait que des molécules inhibitrices du transport de l'anandamide comme l'AM404 et le LY2183240 ont été développées.

[177] Glaser S. T., Kaczocha M., Deutsch D. G. Anandamide transport: a critical review. *Life Sci.,* **2005,** *77,* 1584-1604
[178] Muccioli G. G. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov. Today.,* **2010,** *in press*



LY2183240 AM404

Figure A. 40. Structures chimiques du LY2183240 et de l'AM404

Après avoir été transportés vers le milieu intracellulaire, les endocannabinoïdes sont pris en charge par différentes enzymes assurant leur biodégradation.

7. b) La « fatty acid amide hydrolase » (FAAH)

b. α) Structure

Isolée et caractérisée en 1985,[179] puis purifiée et séquencée en 1996,[180] la FAAH est une hydrolase de 63 kDa. Elle appartient à la famille des amidases à sérine et, chez l'Homme, la souris,[181] le rat[182] et le porc[183] où elle a été clonée, elle se compose de 579 acides aminés. 73 % de ces résidus aminés sont conservés chez les espèces citées précédemment. Toutefois, au niveau du domaine caractéristique des amidases situés entre les acides aminés 215 et 257, le pourcentage d'homologie inter-espèces atteint 90 %.[184] Ainsi, la FAAH est une enzyme extrêmement bien conservée inter-espèces bien que l'ARNm codant pour la protéine puisse être de longueur différente.[179]

[179] Schmid P. C., Zuzarte-Augustin M. L., Schmid H. H. Properties of rat liver N-acylethanolamine amidohydrolase. *J. Biol. Chem.,* **1985,** *260,* 14145-14149

[180] Cravatt B. F., Giang D. K., Mayfield S. P., Boger D. L., Lerner R. A., Gilula N. B. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature,* **1996,** *384,* 83-87

[181] Giang D. K., Cravatt B. F. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **1997,** *94,* 2238-2242

[182] Patricelli M. P., Cravatt B. F. Proteins regulating the biosynthesis and inactivation of neuromodulatory fatty acid amides. *Vitam. Horm.,* **2001,** *62,* 95-131

[183] Goparaju S. K., Ueda N., Taniguchi K., Yamamoto S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.,* **1999,** *57,* 417-423

[184] McKinney M. K., Cravatt B. F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu. Rev. Biochem.,* **2005,** *74,* 411-432

Contrairement aux autres membres de la famille des amidases à sérine, la FAAH ne circule pas librement dans le milieu intracellulaire mais est fortement associée à la membrane du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.[185] La comparaison de sa séquence avec celles d'autres amidases à sérine a permis l'identification d'une région supplémentaire, la MAC (Membrane Access Channel) située entre les acides aminés 9 et 29 du domaine *N*-terminal, suspectée d'être à l'origine de cet ancrage.[175] Toutefois, la délétion des 30 premiers résidus aminés permet la génération d'une forme mutante de FAAH (ΔTM-FAAH) qui demeure ancrée à la membrane des organites, suggérant l'existence de différents modes d'intégration membranaire.[186,187] D'autres études réalisées à partir de la comparaison des structures cristallines de la FAAH et de deux autres amidases à sérine libres, la MAE2 (malonamidase) et la PAM (« peptidylglycine α-amidating monooxygenase »), ont mis en évidence l'existence d'une région additionnelle sur la FAAH, principalement composée de résidus hydrophobes ou basiques qui n'apparaît chez aucune des autres enzymes.[188] Cette région de la FAAH, comprise entre les acides aminés 410 et 438 (hélices α18 et α19), forme un plateau hydrophobe qui couvre le site actif de l'enzyme et semblerait être un domaine essentiel à son intégration à la membrane. Enfin, l'étude de la structure quaternaire de la FAAH révèle que la protéine est un dimère et que les plateaux hydrophobes des deux monomères sont positionnés sur le même côté du dimère.[183] Cet agencement unilatéral renforcerait alors l'ancrage de l'enzyme et permettrait à chaque sous-unité de recruter de manière compétitive des substrats à partir de la membrane.

Outre les domaines d'intégration membranaires, la FAAH possède deux canaux étroits responsables de l'accès du substrat au site actif.[189] Le premier est de nature hydrophile et se compose essentiellement de résidus polaires comme la Ser217, la Lys142 ou encore la Thr236. Il permet aux groupes partants de nature polaire de quitter l'enzyme et constitue « la poche à oxanion ».[190]

Le second canal est plus étroit, plus long et surtout plus hydrophobe que le premier. A partir du site actif, ce canal se subdivise en deux sous-canaux dont celui du bas constitue l'ABP (Acyl Binding Pocket). Cette espace va permettre d'accueillir les longues chaînes grasses présentes sur les substrats de l'enzyme.[184]

---

[185] Egertova M., Cravatt B. F., Elphick M. R. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and CB(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience,* 2003, *119,* 481-496

[186] Arreaza G., Deutsch D. G. Deletion of a proline-rich region and a transmembrane domain in fatty acid amide hydrolase. *FEBS Lett.,* **1999,** *454,* 57-60

[187] Patricelli M. P., Lashuel H. A., Giang D. K., Kelly J. W., Cravatt B. F. Comparative characterization of a wild type and transmembrane domain-deleted fatty acid amide hydrolase: identification of the transmembrane domain as a site for oligomerization. *Biochemistry,* **1998,** *37,* 15177-15187

[188] Bracey M. H., Hanson M. A., Masuda K. R., Stevens R. C., Cravatt B. F. Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science,* **2002,** *298,* 1793-1796

[189] Seierstad M., Breitenbucher J. G. Discovery and development of fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors. *J. Med. Chem., 2008, 51,* 7327-7343

[190] Chebrou H., Bigey F., Arnaud A., Galzy P. Study of the Amidase Signature Group. *Biochem. Biophys. Acta,* **1996,** *1298,* 285-293

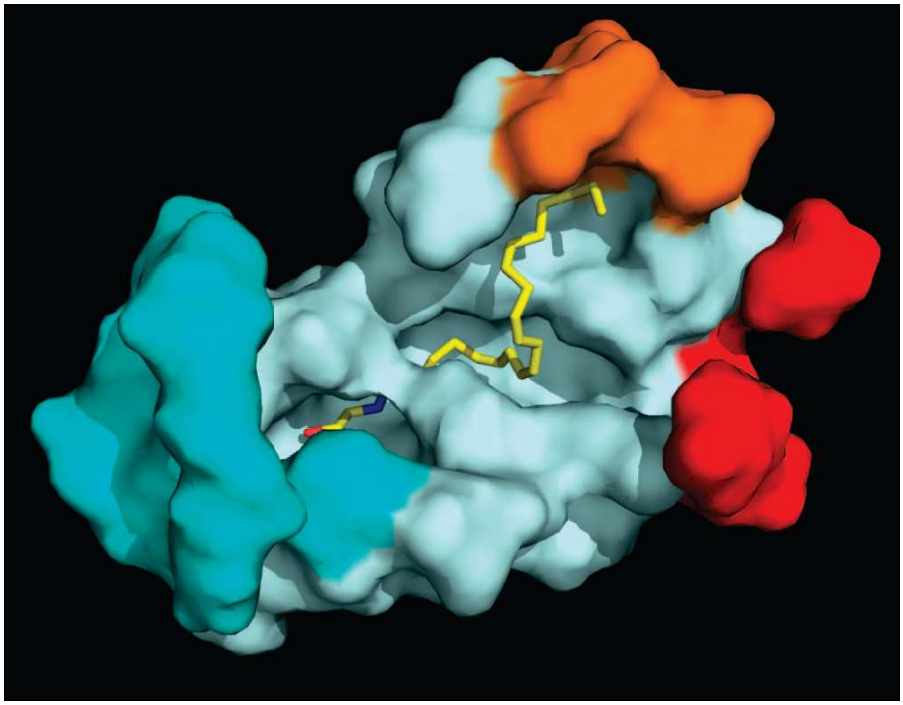


Figure A. 41. Structure de la FAAH montrant en la MAC (en rouge), la poche à oxanion (en bleu) et l'ABP (en orange)

b. β) Distribution et spécificité de substrat

Chez l'Homme, la distribution de la FAAH est à la fois centrale et périphérique. On la retrouve principalement au niveau du rein, du foie, du petit intestin, du poumon, de la prostate et des testicules.[191] Au niveau central, la distribution de la protéine est remarquablement bien corrélée avec la présence de récepteurs CB1. Toutefois, il existe des régions riches en récepteurs telles que le globus pallidus desquelles l'expression de la protéine demeure éparse voire absente.[180]

La FAAH est une enzyme spécifique des dérivés d'acide gras à longue chaîne.[192] Aussi, elle prend en charge la dégradation de l'anandamide, du PEA et de l'oléamide. Par ailleurs la FAAH possède un caractère d'estérase et peut également prendre en charge la biotransformation du 2-AG.[193] Cependant, concernant l'hydrolyse du PEA, l'invalidation génétique de la FAAH a permis d'augmenter les niveaux de PEA de 1000 % dans le cerveau mais ne les a élevés que de 150 % dans le rein, indiquant qu'une autre enzyme dégrade le PEA au niveau de

[191] Labar G., Michaux C. Fatty acid amide hydrolase: from characterization to therapeutics. *Chem. Biodivers.,* **2007,** *4,* 1882-1902

[192] Deutsch D. G., Ueda N., Yamamoto S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids,* **2002,** *66,* 201-210

[193] Goparaju S. K., Ueda N., Yamaguchi H., Yamamoto S. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett.,* **1998,** *422,* 69-73

cet organe.[194] De même, il est maintenant établi que la biodégradation du 2-AG est essentiellement prise en charge par une autre enzyme que la FAAH, la MAGL.[195]

b. γ) Propriétés catalytiques

Les premières études de mutagénèse dirigée ont montré que, contrairement aux autres membres de la famille des amidases à sérine, la FAAH n'hydrolyse pas ses substrats par le biais d'une triade catalytique classique de type Ser-His-Asp.[186] En effet, si la Ser241 s'est effectivement vue attribuer le rôle de nucléophile, la mutation de chaque résidu histidine n'a entraîné aucune perte d'activité de l'enzyme. En revanche, la mutation d'une autre sérine, la Ser217, en alanine a entraîné une forte diminution de l'activité enzymatique, indiquant que cet acide aminé joue un rôle clé dans le mécanisme catalytique de la FAAH. Enfin, il a été démontré que la Lys142, par le biais de ses propriétés acido-basiques, permettait d'activer le nucléophile et de stabiliser le groupe partant.[196] Ainsi, la FAAH interagit avec ses substrats par le biais de la triade Ser241-Ser217-Lys142.[197]

Le mécanisme hydrolytique de l'enzyme a été décrit pour l'anandamide et s'initie à partir de la déprotonation de la Ser217 par la Lys142, ce qui induit la formation d'un intermédiaire zwitterionique. Puis l'alcoolate de la Ser217 déprotonne à son tour la Ser241 qui s'additionne ensuite sur le carbonyle de la fonction amide de l'anandamide, générant un intermédiaire tétraédrique. Cette dernière étape est l'étape limitante du mécanisme.[198] L'intermédiaire tétraédrique, alors chargé, récupère le proton de la Ser217 permettant la formation d'un autre zwiterrion ainsi que l'acylation de la Ser241. Enfin, l'alcoolate de la Ser217 arrache un proton à l'ammonium de la Lys142, provoquant le retour de l'enzyme à une forme non chargée.[199]

[194] Cravatt B. F., Saghatelian A., Hawkins E. G., Clement A. B., Bracey M. H., Lichtman A. H. Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **2004,** *101,* 10821-10826

[195] Dinh T. P., Kathuria S., Piomelli D. RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol. Pharmacol.,* **2004,** *66,* 1260-1264

[196] Patricelli M. P., Lovato M. A., Cravatt B. F. Chemical and mutagenic investigations of fatty acid amide hydrolase: evidence for a family of serine hydrolases with distinct catalytic properties. *Biochemistry,* **1999,** *38,* 9804-9812

[197] Patricelli M. P., Cravatt B. F. Fatty acid amide hydrolase competitively degrades bioactives amides and esters through a nonconventional catalytic mechanism. *Biochemistry,* **1999,** *38,* 14125-14130

[198] Tubert-Brohman I., Acevedo O., Jorgensen W. L. Elucidation of hydrolysis mechanisms for fatty acid amide hydrolase and its Lys142Ala variant via QM/MM simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006,** *128,* 16904-16913

[199] Seirstad M., Breitenbucher J. G. Discovery and development of fatty acid amide hydrolase (FAAH) Inhibitors. *J. Med. Chem.,* **2008,** *51,* 7327-7343

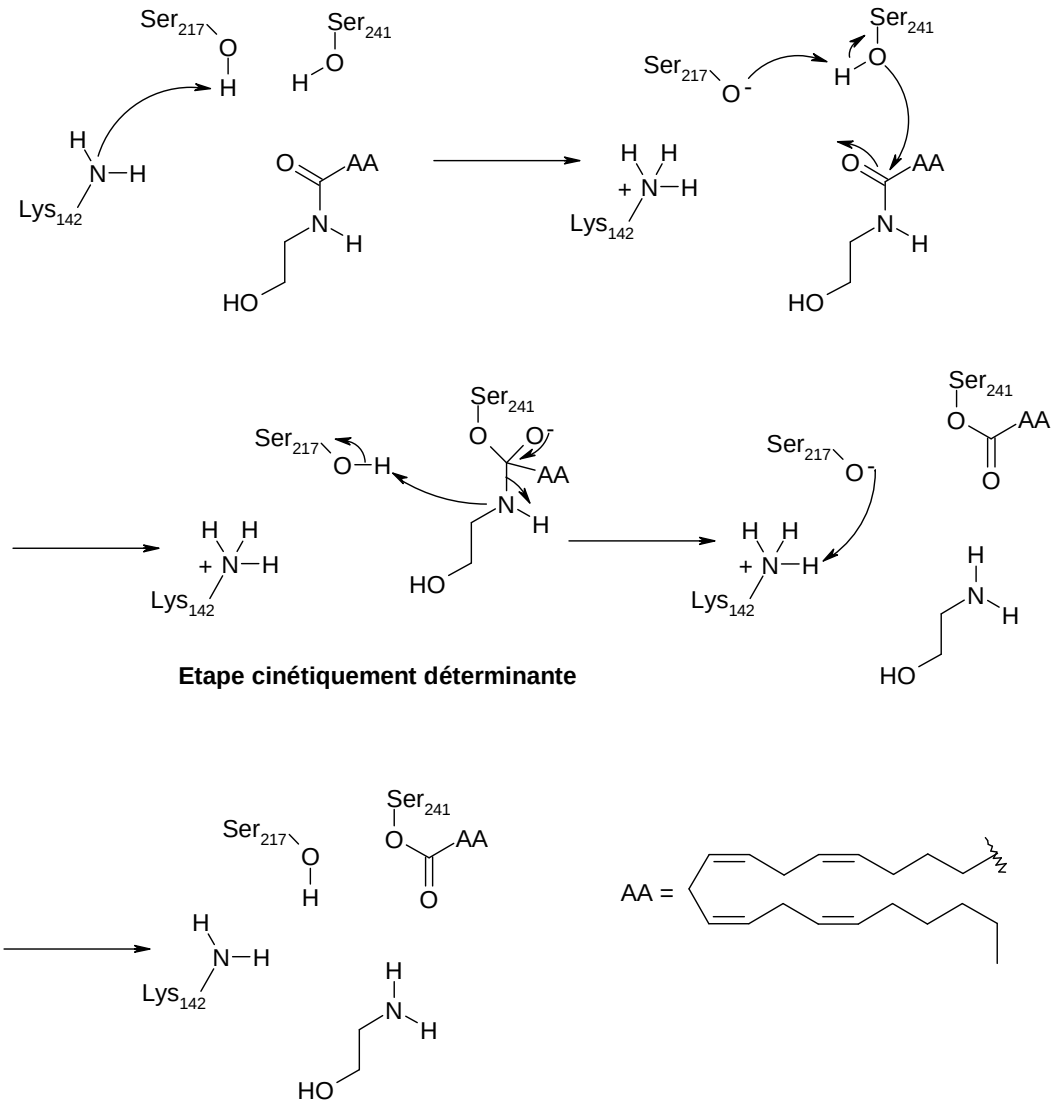


Figure A. 42. Mécanisme de l'hydrolyse de l'anandamide par la FAAH

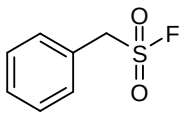
b. δ) Les inhibiteurs de la FAAH

Les inhibiteurs de la FAAH ont pour habitude d'être classés selon leur mode d'action en deux catégories : les inhibiteurs réversibles que l'on qualifie souvent de non-covalents et les inhibiteurs irréversibles qui eux, sont dits covalents.[200] Toutefois ce classement est aujourd'hui assez restrictif et des inhibiteurs réversibles interagissent avec l'enzyme de manière covalente. Aussi, plutôt que de présenter les deux catégories

[200] Mileni M., Garfunkle J., DeMartino J. K., Cravatt B. F., Boger D. L., Stevens R. C. Binding and inactivation mechanism of a humanized fatty acid amide hydrolase by alpha-ketoheterocycle inhibitors revealed from cocrystal structures. *J. Am. Chem. Soc.,* **2009,** *131*, 10497-10506

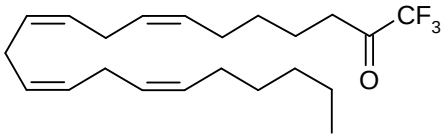
d'inhibiteurs, nous avons choisi de présenter ici un historique des inhibiteurs de la FAAH où les molécules seront davantage classées par structure.

A l'exception du PMSF (PhenylMethylSulfonyl Fluoride),[201] les premiers inhibiteurs de la FAAH décrits dans la littérature étaient des dérivés d'acides gras. Ainsi Deutsch *& al.* ont publié une série de composés dérivés de l'anandamide dont le plus actif s'est trouvé être l'ATFMK (ArachidonoylTrifluoroMethyl Ketone).[202]



PMSF

FAAH : CI_{50} = 13 µM

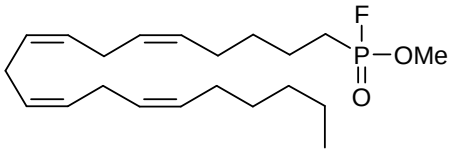


ATFMK

FAAH : CI_{50} = 7.5 µM

Figure A. 43. Structures chimiques du PMSF et de l'ATFMK

Trois ans après la découverte de l'ATFMK, l'équipe de Howlett synthétise le MAFP[203] (MethylArachidonoylFluoroPhosphonate) qui, à ce jour, est un des rares inhibiteurs à avoir été co-cristallisé avec l'enzyme. C'est d'ailleurs grâce à ce cristal que les qualités structurales et catalytiques de la FAAH ont pu être étudiées.[183]



MAFP

FAAH : CI_{50} = 1-3 nM

Figure A. 44. Structure chimique du MAFP

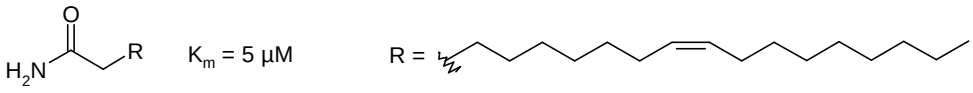
[201] Deutsch D. G., Chin S. A. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem. Pharmacol.,* **1993,** *46,* 791-796

[202] Koutek B., Prestwich G. D., Howlett A. C., Chin S. A., Salehani D., Akhavan N., Deutsch D. G. Inhibition of arachidonoyl ethanolamide hydrolysis. *J. Biol. Chem.,* **1994,** *269,* 22937-22940

[203] Deutsch D. G., Omeir R., Arreaza G., Salehani D., Prestwich G. D., Huang Z., Howlett A. Methyl arachidonyl fluorophosphonate: a potent irreversible inhibitor of anandamide amidase. *Biochem. Pharmacol.,* **1997,** *53,* 255-260

S'il est un excellent outil pharmacologique, le MAFP possède un très mauvais profil thérapeutique car il se lie au récepteur CB1 avec une CI_{50} de 20 nM et manque de sélectivité envers la FAAH puisqu'il inhibe également la PLA2.[198] C'est pourquoi, d'autres inhibiteurs dérivés d'acides gras ont été envisagés.

Ainsi, une série de dérivés de l'oléamide initialement décrite par le Pr. Lerner puis reprise par le Pr. Cravatt a permis de mettre en évidence l'importance du groupement électrophile dans l'interaction avec la triade catalytique ainsi que celle de la longueur de la chaîne carbonée.[204,205]



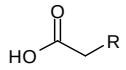
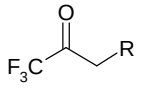
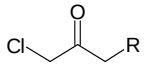
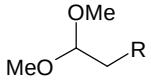
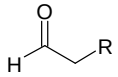
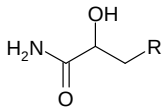
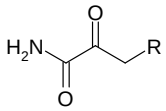
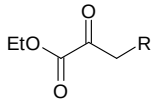
Inhibiteur	Ki (µM)	Inhibiteur	Ki (µM)
	6.0		0.0012
	0.7		>300
	0.19		>100
	0.017		0.009

Figure A. 45. Structures chimiques de quelques inhibiteurs dérivés de l'oléamide

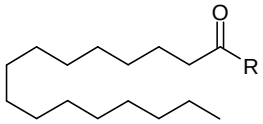
Plus récemment, les propriétés pharmacologiques de molécules dérivées du PEA ont été décrites par le groupe du Pr. Lambert.[206,207]

[204] Patterson J. E., Ollmann I. R., Cravatt B. F., Boger D. L. Wong C. H., Lerner R. A. Inhibition of oleamide hydrolase catalyzed hydrolysis of the endogenous sleep-Inducing lipid cis-9-octadecenamide. *J. Am. Chem. Soc.,* **1996,** *118,* 5938-5945

[205] Boger D. L., Sato H., Lerner A. E., Austin B. J., Patterson J. E., Patricelli M. P., Cravatt B. F. Trifluoromethyl ketone inhibitors of fatty acid amide hydrolase: a probe of structural and conformational features contributing to inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **1999**, *9,* 265-270

[206] Vandevoorde S., Jonsson, K. O., Fowler C. J., Lambert D. M. Modifications of the ethanolamide head in N-palmitoylethanolamine: synthesis and evaluation of new agents interfering with the metabolism of anandamide. *J. Med. Chem.,* **2003,** *46,* 1440-1448

[207] Wallace V. C., Segerdahl A. R., Lambert D. M., Vandevoorde S., Blackbeard J., Pheby T., Hasnie F., Rice A. S. C. The effect of the palmitoylethanolamide analogue, palmitoylallylamide (L-29) on pain behaviour in rodent models of neuropathy. *Br. J. Pharmacol.*, **2007,** *151,* 1117-1128



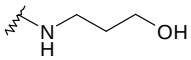
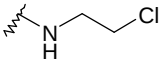
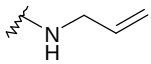
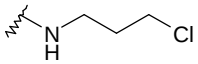
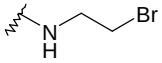
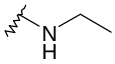
R	FAAH pI_{50}	R	FAAH pI_{50}
	5.42		5.58
	5.47		5.60
	5.45		5.45

Figure A. 46. Structures chimiques de quelques inhibiteurs dérivés du PEA

Pour tous ces analogues de substrat, de nombreuses relations structure-activité ont été dégagées. Ainsi, en étudiant l'importance de la longueur de la chaîne carbonée de l'inhibiteur dans sa capacité à interagir avec l'enzyme, l'équipe de Boger a découvert l'importance du groupement phénylhexyle. En effet, ce dernier constitue une alternative moins lipophile aux longues chaînes grasses présentes dans toutes ces molécules dérivées de substrat. Le groupement phénylhexyle permet de conserver une bonne activité inhibitrice et a, par la suite, été réutilisé pour de nombreux autres composés.[194]

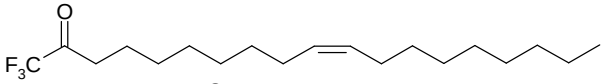
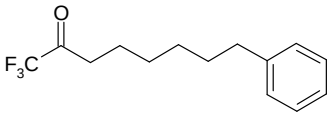
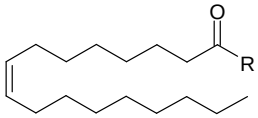
Inhibiteur	K_i (µM)
	0.082
	0.10

Figure A. 47. Comparaison des activités du dérivé du substrat et de son analogue phénylhexyle

Quelques années plus tard, en remplaçant le groupement trifluorométhyle par différents hétérocycles choisis dans le but d'activer la cétone et ainsi, de la rendre plus sensible à l'attaque nucléophile de la Ser241,

ces mêmes chercheurs ont initié l'une des grandes familles d'inhibiteurs de FAAH, les α-cétohétérocycles.[208,209]



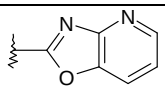
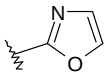
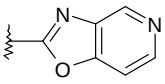
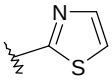
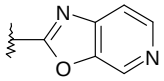
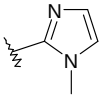
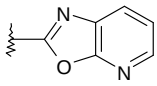
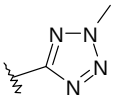
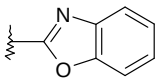
R	K_i (µM)	R	K_i (µM)
CF_3	0.082		0.0023
	0.017		0.0072
	>100		0.0037
	>100		0.011
	0.065		0.37

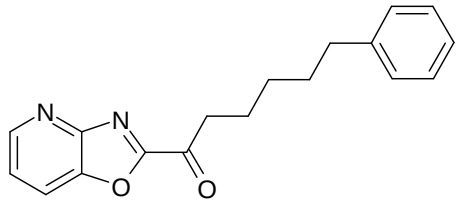
Figure A. 48. Premiers α-cétohétérocycles

Puis en combinant le concept du groupement phénylhexyle à celui des α-cétohétérocycles, le groupe de Boger a synthétisé l'un des inhibiteurs les plus puissants et les plus sélectifs de la FAAH : l'OL-92. Par la suite, le décollement du noyau pyridine a permis d'obtenir l'actuel chef de file de la famille des α-cétohétérocycles, l'OL-135.[210]

[208] Boger D. L., Sato H., Lerner A. E., Hedrick M. P. Fecik R. A., Miyauchi H. Wilkie G. D. Austin B. J., Patricelli M. P., Cravatt B. F. Exceptionally potent inhibitors of fatty acid amide hydrolase: the enzyme responsible for degradation of endogenous oleamide and anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* **2000,** *97,* 5044-5049

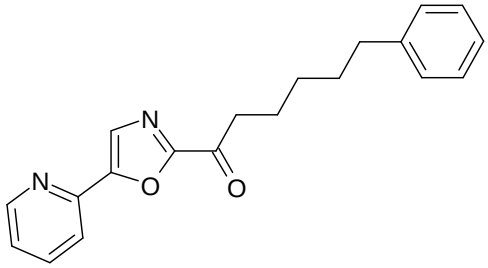
[209] Boger D. L., Miyauchi H., Hedrick M. P. alpha-Keto heterocycle inhibitors of fatty acid amide hydrolase: carbonyl group modification and alpha-substitution. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001,** *11,* 1517-1520

[210] Boger D. L., Miyauchi H., Du W., Hardouin C., Fecik R. A., Cheng H., Hwang I., Hedrick M. P., Leung D., Acevedo O., Guimaraes C. R., Jorgensen W. L., Cravatt B. F. Discovery of a potent, selective and efficacious class of reversible alpha-ketoheterocycle inhibitors of fatty acid amide hydrolase effective as analgesics. *J. Med. Chem.,* **2005,** *48,* 1849-1856



OL-92

FAAH : Ki = 0.20 nM



OL-135

FAAH : Ki = 4.7 nM

Figure A. 49. Structures chimiques de l'OL-92 et de l'OL-135

Les α-cétohétérocycles ont présenté *in vivo* des propriétés pharmacologiques intéressantes, notamment dans le traitement de la douleur. Aussi, ils ont largement été étudiés et de nombreuses relations structure-activité les concernant ont été décrites dans la littérature.[195,211,212,213,214] Récemment, grâce à des études de co-cristallisation, le mécanisme d'inhibition dela FAAH par l'OL-135 a été rapporté.[200]

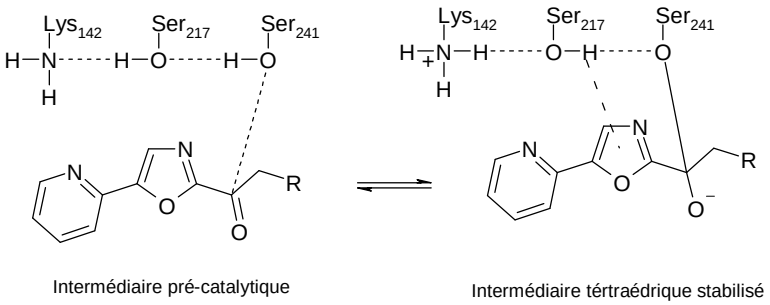


Figure A. 50. Formation de l'intermédiaire tétraédrique lors de l'inhibition de la FAAH par l'OL-135

[211] Hardouin C., Kelso M. J., Romero A., Rayl T. J., Leung D., Hwang I., Cravatt B. F., Boger D. L. Structure-activity relationships of α-ketooxazole inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *J. Med. Chem.,* **2007,** *50,* 3359-3368

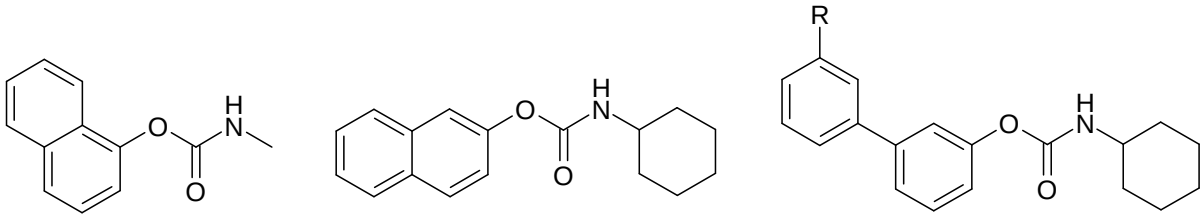
[212] Romero F. A., Du W., Hwang I., Rayl T. J., Kimball F. S., Leung D., Hoover H. S., Apocada R. L. Breitenbucher J. G., Cravatt B. F., Boger D. L. Potent and selective α-ketoheterocycle-based inhibitors of the anandamide and oleamide catabolizing enzyme, fatty acid amide hydrolase. *J. Med. Chem.,* **2007,** *50,* 1058-1068

[213] Garfunkle J., Ezzili C., Rayl T. J., Hochstatter D. G., Hwang I., Boger D. L. Optimization of the central heterocycle of the α-ketoheterocycle inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *J. Med. Chem.,* **2008,** *51,* 4392-4403

[214] Mileni M., Garfunkle J., Ezzili C., Kimball F. S., Cravatt B. F., Stevens R. C., Boger D. L. X-ray crystallographic analysis of alpha-ketoheterocycle inhibitors bound to a humanized variant of fatty acid amide hydrolase. *J. Med. Chem.,* **2010,** *53,* 230-240

Il apparaît alors que la Ser241 de l'enzyme s'additionne sur la cétone de l'OL-135 générant un intermédiaire tétraédrique stabilisé par une liaison π s'établissant entre l'oxazole et le proton de la Ser217. La formation de cet intermédiaire est réversible, c'est pourquoi l'OL-135 est qualifié d'inhibiteur réversible covalent.

La famille des carbamates et des urées constitue à ce jour, la seconde grande famille de molécules inhibitrices de la FAAH. Le chef de file actuel du groupe des carbamates est l'URB597.[215] Ce puissant inhibiteur de l'enzyme a été mis au point à partir de modifications effectuées sur un inhibiteur d'acétylcholinestérase (AChE).[216] Il inhibe l'enzyme de manière covalente avec une CI_{50} de 4.6 nM.



Inhibiteur d'AChE	Intermédiaire	URB524 ; R = H ; FAAH : CI_{50} = 63 nM
FAAH : CI_{50} > 30 000 nM	FAAH : CI_{50} = 324 nM	URB597 ; R = $CONH_2$; FAAH : CI_{50} = 4.6 nM

Figure A. 51. Naissance de l'URB597

L'administration de l'URB597 à des rats a permis d'augmenter significativement les niveaux d'anandamide chez les animaux, sans toutefois induire d'effets cannabinomimétiques comme la catalepsie, l'hyperphagie ou l'hypothermie, observables après l'administration d'agonistes des récepteurs CB1. Aussi, puisque ce composé semble produire les mêmes effets thérapeutiques *in vivo* que les agonistes CB1 sans provoquer d'effets indésirables, il a naturellement été très étudié du point de vue pharmacologique.[194]

Ainsi de nombreuses données concernant ses activités antinociceptives sont disponibles dans la littérature[217,218] : l'URB597 a notamment montré des capacités à inhiber la douleur dans le test de la plaque

[215] Mor M., Rivara S., Lodola A., Plazzi P. V., Tarzia G., Duranti A., Tontini A., Piersanti G., Kathuria, S., Piomelli D. Cyclohexylcarbamic acid 3'- or 4'-substituted biphenyl-3-yl esters as fatty acid amide hydrolase inhibitors: synthesis, quantitative structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *J. Med. Chem.,* **2004,** *47,* 4998-5008

[216] Tarzia G., Duranti A., Tontini A., Piersanti G., Mor M., Rivara S., Plazzi P. V., Park C., Kathuria S., Piomelli D. Design, Synthesis, and structure-activity relationships of alkylcarbamic acid aryl esters, a new class of fatty acid amide hydrolase inhibitors. *J. Med. Chem.,* **2003,** *46,* 2352-2360

[217] Jayamanne A., Greewood R., Mitchell V. A., Aslan S., Piomelli D., Vaughan C. W. Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. *Br. J. Pharmacol.,* **2006,** *147,* 281-288

[218] Haller V. L., Cichewicz D. L., Walch S. P. Non-cannabninoid CB1, non-cannabinoid CB2 antinociceptive effects of several novel compounds in the PPQ stretch test in mice. *Eur. J. Pharmacol.,* **2006,** *546,* 60-68

chaude, lesquelles ont été enrayées par l'administration de SR141716A. Des expériences menées sur un modèle murin représentatif de la douleur inflammatoire ont également mis en évidence les propriétés antinociceptives de l'inhibiteur qui, dans ce cas, seraient médiées par les récepteurs PPAR-α.[219] En revanche, concernant les propriétés anxiolytiques et antidépressives de l'URB597, les données reportées dans la littérature sont assez contradictoires.[220,221] Enfin, d'autres études ont également rapporté un intérêt de la molécule dans le sevrage tabagique ainsi que dans le traitement de l'inflammation.[222,15]

Les multiples propriétés thérapeutiques de l'URB597 ont naturellement incité les chercheurs à rechercher son mécanisme d'action. Ainsi, grâce à des études de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse, celui-ci a pu être identifié et implique l'addition de la Ser241 sur le carbonyle du carbamate suivie d'une rupture de la liaison C-O permettant la libération du groupement biphényle dans le milieu.[223]

[219] Sagar D. R., Kendall D. A., Chapman V. Inhibition of fatty acid amide hydrolase produces PPAR-alpha-mediated analgesia in a rat model of inflammatory pain. *Br. J. Pharmacol.,* **2008,** *155,* 1297-1306

[220] Kathuria S., Gaetani S., Fegley D., Valino F., Duranti A., Tontini A., Mor M., Tarzia G., La Rana G., Calignano A., Giustino A., Tattoli M., Palmery M., Cuomo V., Piomelli D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat. Med.,* **2003,** *9,* 76-81

[221] Naidu P. S., Varvel S. A., Ahn K., Cravatt B. F., Martin B. R., Lichtman A. H. Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacology (Berlin),* **2007,** *192,* 61-70

[222] Scherma M., Panlilio L. V., Fadda P., Fattore L., Gamaleddin I., Le Foll B., Justinova Z., Mikics E., Haller J., Medalie J., Stroik J., Barnes C., Yasar S., Tanda G., Piomelli D., Fratta W., Goldberg S. R. Inhibition of anandamide hydrolysis by cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-3-yl ester (URB597) reverses abuse-related behavioral and neurochemical effects of nicotine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **2008,** *327,* 482-490

[223] Alexander J. P., Cravatt B. F. Mechanism of carbamate inactivation of FAAH: implications for the design of covalent inhibitors and in vivo functional probes for enzymes. *Chem. Biol.,* **2005,** *12,* 1179-1187

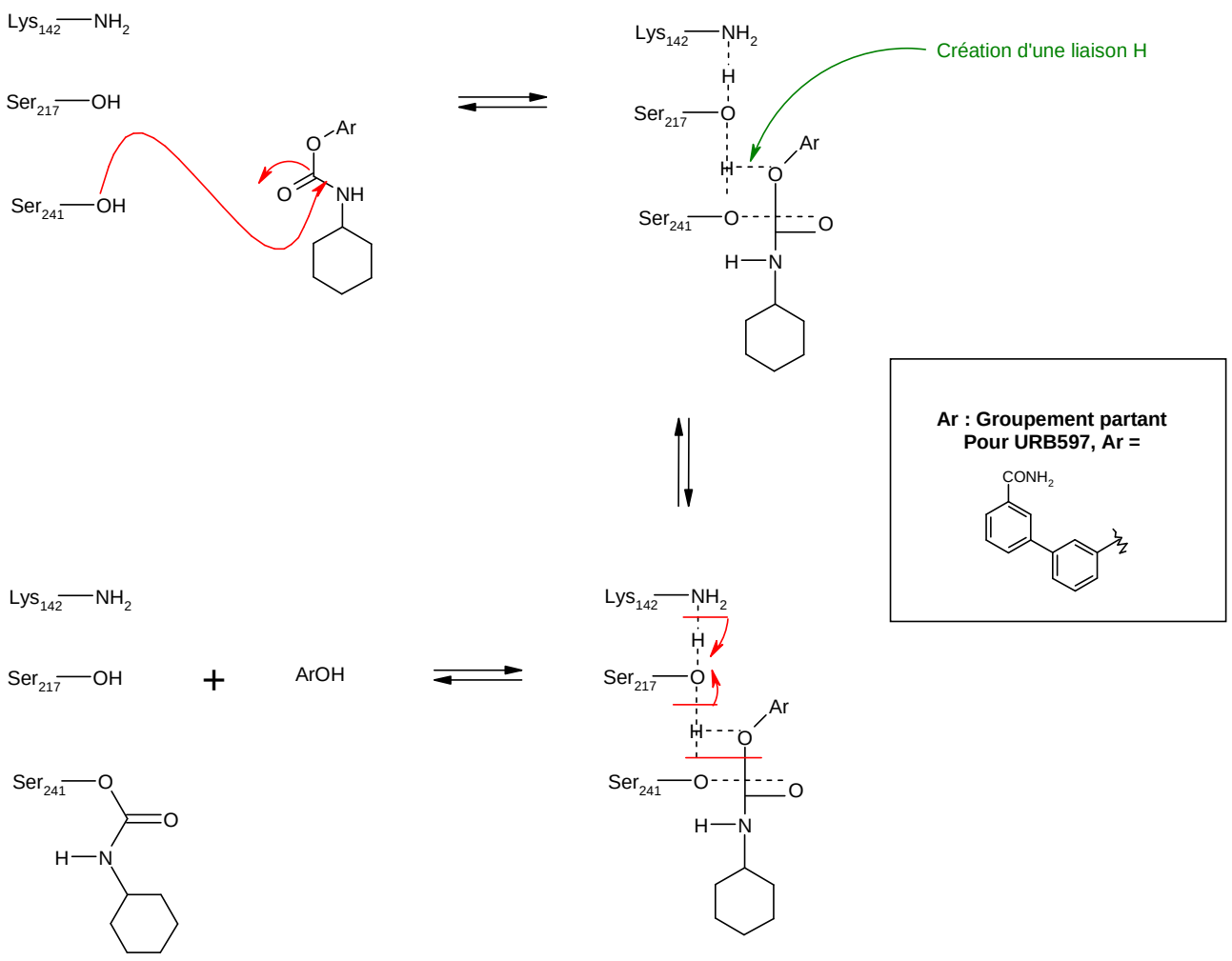


Figure A. 52. Mécanisme de l'inactivation de la FAAH par les URB

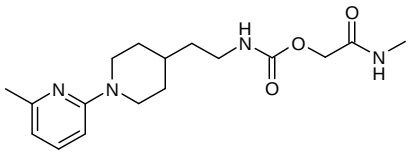
Grâce à la découverte de ce mécanisme d'action ainsi que des nombreuses propriétés thérapeutiques de l'URB597, de nombreuses firmes pharmaceutiques, parmi lesquelles Sanofi-Aventis[224,225,226,227] et Bristol-Myers Squibb,[228,229] se sont lancées dans la conception et la synthèse de carbamates.

[224] Abouabdellah A., Bartsch-Li R., Hoornaert C., Ravet A. Aryl- and heteroaryl-alkylcarbamates derivatives, their preparation, and use as fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors for treating FAAH-related pathologies. WO2005090292, **2005**

[225] Abouabdellah, A., Almario Garcia A., Hoornaert C., Li A. T. Alkyl(homo)piperazine-carboxylate derivatives, their preparation and use as fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors for treating FAAH-related pathologies. WO 2005090322, **2005**

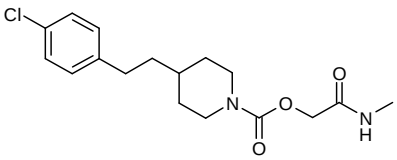
[226] Abouabdellah A., Almario Garcia A., Hoornaert C., Lardenois P., Marguet F. Aryl- and heteroaryl-piperidinecarboxylate derivatives, their preparation and use as fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors for treating FAAH-related pathologies. WO 2005090347, **2005**

[227] Abouabdellah A., Bas M., Dargazanli G., Hoornaert C. Li A. T., Medaisko F. Dioxane-2-alkylcarbamates, their preparation and use as fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors for treating FAAH-related pathologies. WO2004020430, **2004**



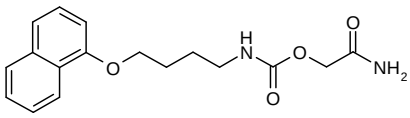
SA-47

WO 2004 099176



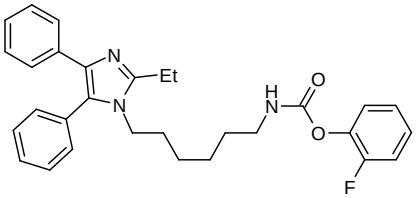
SA-57

WO 2005 090347

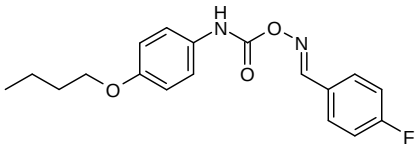


SA-58

WO 2005 077898



BMS-1



BMS-469908

Figure A. 53. Principaux carbamates revendiqués par Sanofi-Aventis et Bristol-Myers Squibb

Afin d'apporter de l'originalité aux structures, d'autres firmes pharmaceutiques comme Takeda[230] et Janssen[231,232] ont remplacé le groupement carbamate par un motif urée, ce qui a été à l'origine des inhibiteurs de type pipérazine et pipéridine arylurée.

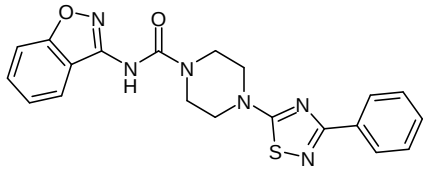
[228] Sit S. Y., Conway C., Bertekap R., Xie K., Bourin C., Burris K., Deng H. Novel inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2007,** *17,* 3287-3291

[229] Sit S. Y., Xie K. Preparation of bisarylimidazolyl fatty acid amide hydrolase inhibitors for treatment of pain. WO 2002087569, **2002**

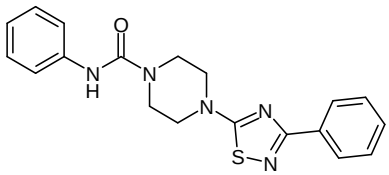
[230] Matsumoto T., Kori M., Miyazaki J., Kiyota Y. Preparation of piperidinecarboxamides and piperazinecarboxamides as fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors. WO2006054652, **2006**

[231] Apocada R., Breitenbucher J. G., Pattabiraman K., Seirstad M., Xiao, W. Preparation of thiadiazolylpiperazinecarboxamides as modulators of fatty acid amide hydrolase (FAAH). WO 2007005510, **2007**

[232] Apocada R., Breitenbucher J. G., Pattabiraman K., Seirstad M., Xiiao W. Piperazinyl and piperidinyl ureas as modulators of fatty acid amide hydrolase. WO2006074025, **2006**

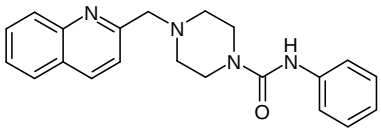


WO 2006 054652



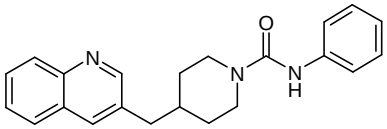
JNJ-1661010

FAAH : CI_{50} = 12 nM



PF-622

FAAH : CI_{50} = 19 nM



PF-750

FAAH : CI_{50} = 16 nM

Figure A. 54. Principaux inhibiteurs de type pipérazine et pipéridine arylurée revendiqués par Takeda, Janssen et Pfizer

Comme les carbamates, les urées inhibent l'enzyme de manière covalente[233] et présentent des propriétés thérapeutiques intéressantes.[234] Par ailleurs, des études protéomiques ont montré que ces inhibiteurs, notamment le PF-622, étaient sélectifs de la FAAH, contrairement à l'URB597.

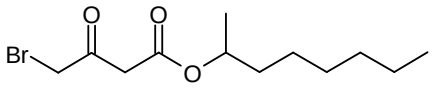
A côté des deux principales familles d'inhibiteurs que constituent celle des α-cétohétérocycles et celle des carbamates et urées, de nombreuses autres molécules inhibitrices de la FAAH aux structures originales ont été décrites dans la littérature. Parmi elles, on retrouve notamment le 2-octyl-γ-bromoacétoacétate (OγBr) qui inhibe la FAAH avec un Ki de 0.82 µM[235] et le *(E)*-6-(bromométhylène)tétrahydro-3-(1-naphtalényl)-2*H*-pyran-2-one (BNTP) qui lui, inactive l'enzyme de manière covalente avec une CI_{50} de 0.8 µM.[236]

[233] Ahn K., Johnson D. S., Fitzgerald L. R., Liimatta M., Arendse A., Stevenson T., Lund E. T., Nugent R. A., Nomanbhoy T. K., Alexander J. P., Cravatt B. F. Novel mechanistic class of fatty acid amide hydrolase inhibitors with remarkable selectivity. *Biochemistry,* **2007,** *46,* 13019-13030

[234] Breitenbucher J. G. Inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *In nociception: taking the pain out of drug discovery,* SCI: London, U. K., **2006**

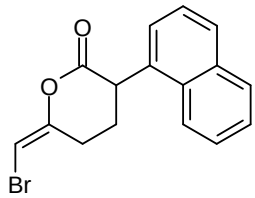
[235] Patricelli M. P., Patterson J. E., Boger D. L., Cravatt B. F. An endogenous sleep-inducing compound is a novel competitive inhibitor of fatty acid amide hydrolase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **1998,** *8,* 613-618

[236] Beltramo M., Di Tomaso E., Piomelli D. Inhibition of anandamide hydrolysis in rat brain tissue by (E)-6-(bromomethylene) tetrahydro-3-(1-naphthalenyl)-2H-pyran-2-one. *FEBS Lett.,* **1997,** *403,* 263-267



OγBr

FAAH : Ki = 0.82 µM

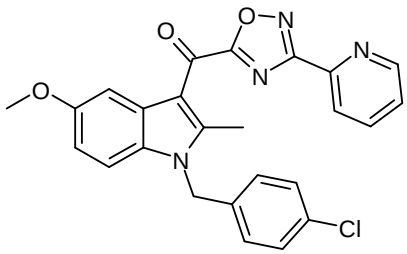


BNTP

FAAH : CI_{50} = 0.8 µM

Figure A. 55. Structures chimiques du OγBr et du BNTP

Des inhibiteurs mixtes COX/FAAH ont également été décrits par Microbia. Ces inhibiteurs inactivent la FAAH avec une CI_{50} inférieure à 1 µM mais aucune relation structure-activité n'a à ce jour été décrite pour ce type de composés.



WO 2007 070892

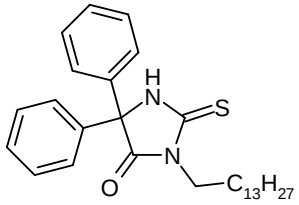
FAAH : CI_{50} < 1 µM

Figure A. 56. Inhibiteur mixte COX/FAAH

Lors d'un screening de ligands des récepteurs CB1, le groupe du Pr. Lambert a identifié une série unique de molécules inhibitrices basées sur un motif de type thiohydantoïne.[237] Le plus actif des composés inactive l'enzyme avec un pI_{50} de 5.94. L'équipe a également mis en évidence une relation entre la taille de la chaîne aliphatique et l'affinité des composés, montrant qu'une chaîne comportant entre 10 et 14 carbones était optimale pour l'activité. Des études cinétiques ont par la suite confirmé que les composés étaient des inhibiteurs compétitifs de l'hydrolyse de l'anandamide et que l'inhibition n'était pas temps-dépendante.

[237] Muccioli G. G., Fazio N., Scriba G. K., Poppitz W., Cannata F., Poupaert J. H., Wouters J., Lambert D. M. Substituted 2-thioxoimidazolidin-4-ones and imidazolidine-2,4-diones as fatty acid amide hydrolase inhibitors templates. *J. Med. Chem.*, **2006,** *49,* 417-425

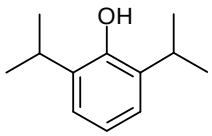
Enfin, une étude subséquente de modélisation moléculaire a suggéré que ce type de composés s'accommodait dans l'ABP de la FAAH mais n'interagissait pas avec la machinerie catalytique de la protéine.[238]



FAAH : pI_{50} = 5.94

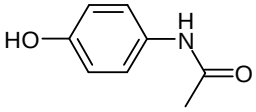
Figure A. 57. Inhibiteur de type thiohydantoïne

De nombreux médicaments présents sur le marché sont également des inhibiteurs de la FAAH. C'est le cas du Propofol, un anesthésique général, qui inhibe l'enzyme avec une CI_{50} de 14 µM dans des expériences menées sur des membranes de cerveau de rat[239] et du Paracétamol qui, après biotransformation conduirait à un métabolite qui inhiberait à la fois la FAAH et serait également un agoniste des récepteurs TRPV1.[240]



Propofol

FAAH : CI_{50} = 14 µM



Paracétamol

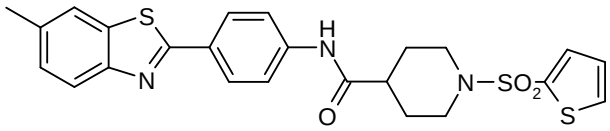
Figure A. 58. Structures chimiques du Propofol et du Paracétamol

[238] Michaux C., Muccioli G. G., Lambert D. M., Wouters J. Binding mode of new (thio)hydantoin inhibitors of fatty acid amide hydrolase: comparison with two original compounds, OL-92 and JP104. *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2006,** *16,* 4772-4776

[239] Patel S., Wohlfeil E. R., Rademacher D. J., Carrier E. J., Perry L. J., Kundu A., Falck J. R., Nithipatikom K., Campbell W. B., Hillard C. J. The general anesthetic propofol increases brain N-arachidonylethanolamine (anandamide) content and inhibits fatty acid amide hydrolase. *Br. J. Pharmacol.,* **2003,** *139,* 1005-1013

[240] Hogestatt E. D., Jonsson B. A., Ermund A., Andersson D. A., Bjork H., Alexander J. P., Cravatt B. F., Basbaum A. I., Zygmunt P. M. Conversion of acetaminophen to the bioactive *N*-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J. Biol. Chem.,* **2005,** *280,* 31405-31412

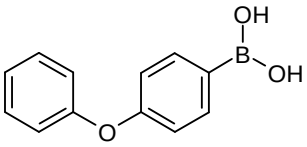
Un certain nombre de campagne de criblage à haut débit a été entrepris au cours de ces dernières années et a permis d'identifier de nouveaux chefs de file. C'est grâce à cette méthode que Wang *& al.* ont découvert la série des benzothiazoles. Ces composés ont un mécanisme d'action proche de celui de l'OL-135 puisqu'ils miment l'intermédiaire tétraédrique observé lors de l'inhibition de la FAAH par l'OL-135.[241]



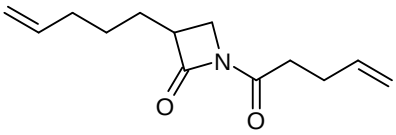
FAAH : CI_{50} = 18 nM

Figure A. 59. Structure chimique d'un inhibiteur de type benzothiazole

Enfin une série de dérivés boroniques susceptibles d'inhiber la FAAH de manière covalente[242] ainsi qu'une série de β-lactames dont le mécanisme d'inhibition n'a pas été décrit,[243,244] ont été rapportées dans la littérature.



FAAH : Ki < 10 nM



FAAH : CI_{50} = 4.5 µM

Figure A. 60. Inhibiteurs de type acide boronique et β-lactame

[241] Wang X., Sarris K., Kage K., Zhang D., Brown S. P., Kolasa T., Surowy C., El Kouhen O. F., Muchmore S. W., Brioni J. D., Stewart A. O. Synthesis and evaluation of benzothiazole-based analogues as novel, potent, and selective fatty acid amide hydrolase inhibitors. *J. Med. Chem..,* **2009,** *52,* 170-180

[242] Adams J., Behnke M. L., Castro A. C., Evans C. A., Grenier L., Grogan M. J., Liu T., Snyder D. A., Tibbitts T. T. Inhibitors of fatty acid amide hydrolase. WO 2008063300, **2008**

[243] Urbach A., Muccioli G. G., Stern E., Lambert D. M., Marchand-Brynaert J. 3-Alkenyl-2-azetidinones as fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2008,** *18,* 4163-4167

[244] Feledziak M., Michaux C., Urbach A., Labar G., Muccioli G. G., Lambert D. M., Marchant-Brynaert J. Beta-lactams derived from a carbapenem chiron are selective inhibitors of human fatty acid amide hydrolase versus human monoacylglycerol lipase. *J. Med. Chem.,* **2009,** *52,* 7054-7068

De récentes études suggèrent l'existence d'une seconde enzyme présentant une activité FAAH. Le gène FAAH-2 a été identifié chez les primates et certains vertébrés mais pas chez les rongeurs. La distribution, la spécificité de substrat et la sensibilité aux inhibiteurs de la FAAH-2 sont comparables à celles de la FAAH-1.

La FAAH-1 et la FAAH-2 présentent 20 % d'homologie entre elles. Comme la FAAH-1, la FAAH-2 possède une extrémité *N*-terminale transmembranaire et inactive ses substrats par le biais d'une triade catalytique de type Ser-Ser-Lys.[245]

Si la FAAH est certainement l'enzyme de biodégradation impliquée dans le métabolisme des endocannabinoïdes qui a été la plus décrite, elle n'est néanmoins pas la seule à prendre en charge ces ligands. En effet, bien que le 2-AG puisse être dégradé par cette enzyme, de récentes études montrent que ce composé serait pris en charge par une autre enzyme, la MAGL. De même, le PEA pouvant être dégradé par la FAAH aurait également son enzyme de biodégradation, la « *N*-acylethanolamine acyl amidase » (NAAA).

7. c) La « monoacylglycerol lipase » (MAGL)

c. α) Structure

Isolée en 1976,[246] la MAGL est une enzyme ubiquitaire de 33 kDa.[247] Chez l'Homme, le rat et la souris où elle a été clonée, elle est constituée de 303 acides aminés et possède de nombreuses caractéristiques des α/β hydrolases.[240,248] La MAGL est une protéine extrêmement bien conservée inter-espèces puisque le degré d'homologie entre l'ADN murin et humain est de 85 %.[249]

Récemment, la diffraction aux rayons X du cristal de la MAGL humaine a été publiée conjointement par le groupe du Pr. Lambert[241] et par une équipe de chercheurs travaillant pour Sanofi-Aventis.[250] Ainsi, il a été démontré que l'enzyme est constituée de deux monomères reliés entre eux par une surface de 884 $Å^2$, ce

[245] Wei B. Q., Mikkelsen T. S., McKinney M. K., Lander E. S., Cravatt B. F. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J. Biol. Chem.,* **2006,** *281,* 36569-36578
[246] Tornqvist H., Belfrage P. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, **1976**, *251,* 813-819
[247] Basavarajappa B. S. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein. Pept. Lett.,* **2007,** *14,* 237-246
[248] Labar G., Bauvois C., Borel F., Ferrer J. L., Wouters J., Lambert D. M. Crystal structure of the human monoacylglycerol lipase, a key actor in endocannabinoid signaling. *Chembiochem.*, **2010,** *11,* 218-227
[249] Karlsson M., Reue K., Xia Y. R., Lusis A. J., Langin D., Tornqvist H., Holm C. Exon-intron organization and chromosomal localization of the mouse monoglyceride lipase gene. *Gene,* **2001,** *272,* 11-18
[250] Bertrand T., Augé F., Houtmann J., Rak A., Vallée F., Mikol V., Berne P. F., Michot N., Cheuret D., Hoornaert C., Mathieu M. Structural basis for human monoglyceride lipase inhibition. *J. Mol. Biol.,* **2010,** *396,* 663-673

qui représente environ 7 % du monomère. Comme ce qui a été précédemment décrit pour la FAAH, les entrées du site actif de la MAGL se trouvent face à la membrane et sont alors susceptibles de recruter des substrats.

D'un point de vue structural, la MAGL s'articule autour d'un feuillet central constitué de sept brins parallèles et d'un brin antiparallèle, encerclé par six hélices α. Un domaine couronne, variable selon les membres de la famille des α/β hydrolases, surmonte le feuillet central ainsi que le site actif et cache la triade catalytique composée de la Ser122, de l'Asp239 et de l'His269. La Ser122 s'insère dans la séquence consensus GXSXG entre l'hélice α3 et le brin β5, au niveau de la partie appelée « coude nucléophile ». Enfin, la poche à oxanion stabilisant l'intermédiaire anionique lors de l'hydrolyse, est constituée de l'extrémité -NH de l'Ala51 et de la Met123.

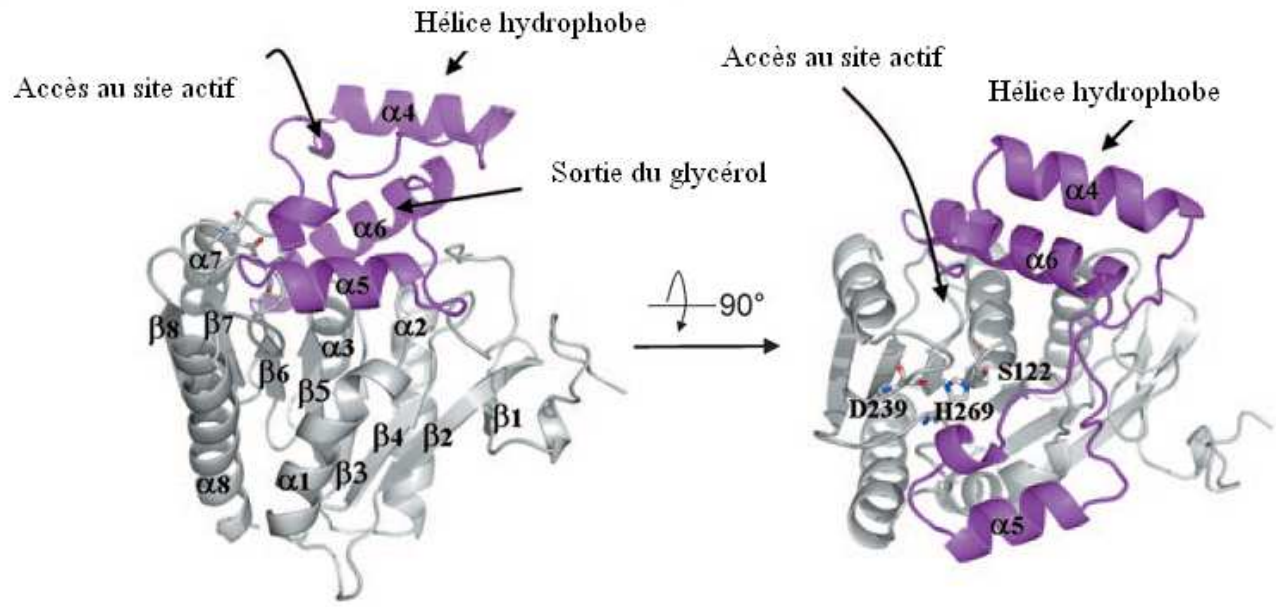


Figure A. 61. Organisation d'un monomère de la MAGL avec le domaine couronne en violet

La comparaison de la MAGL avec des enzymes structuralement homologues comme les halopéroxydases, la chloropéroxydase issue de *Streptomyces Lividans* ou encore la protéine hypothétique PA2218 dont la fonction demeure inconnue, a révélé l'importance et l'originalité du domaine couronne. En effet, bien que ces enzymes soient très proches de la MAGL au niveau structural, l'homologie de séquence de leurs domaines couronnes respectifs atteint au mieux les 20 %. Chez les protéines citées précédemment, le domaine couronne se compose de quatre hélices α s'organisant pour former deux structures en forme de V superposées. En revanche, le domaine couronne de la MAGL comprenant les résidus 151 à 225 s'organise différemment : dans la partie supérieure du domaine, la première hélice (α4) a été déplacée de 15 Å vers

l'extérieur tandis que la seconde hélice a été remplacée par une longue boucle connectant α4 à α5. De manière similaire, dans la partie inférieure du domaine, une longue boucle comprenant dix résidus (de 197 à 206) connecte α5 à α6. Ainsi, du fait de ces modifications structurales, l'organisation en forme de V retrouvées chez les halopéroxydases et les estérases est remplacée par une structure évasée en forme de U offrant à la MAGL un accès plus large pour ses substrats.

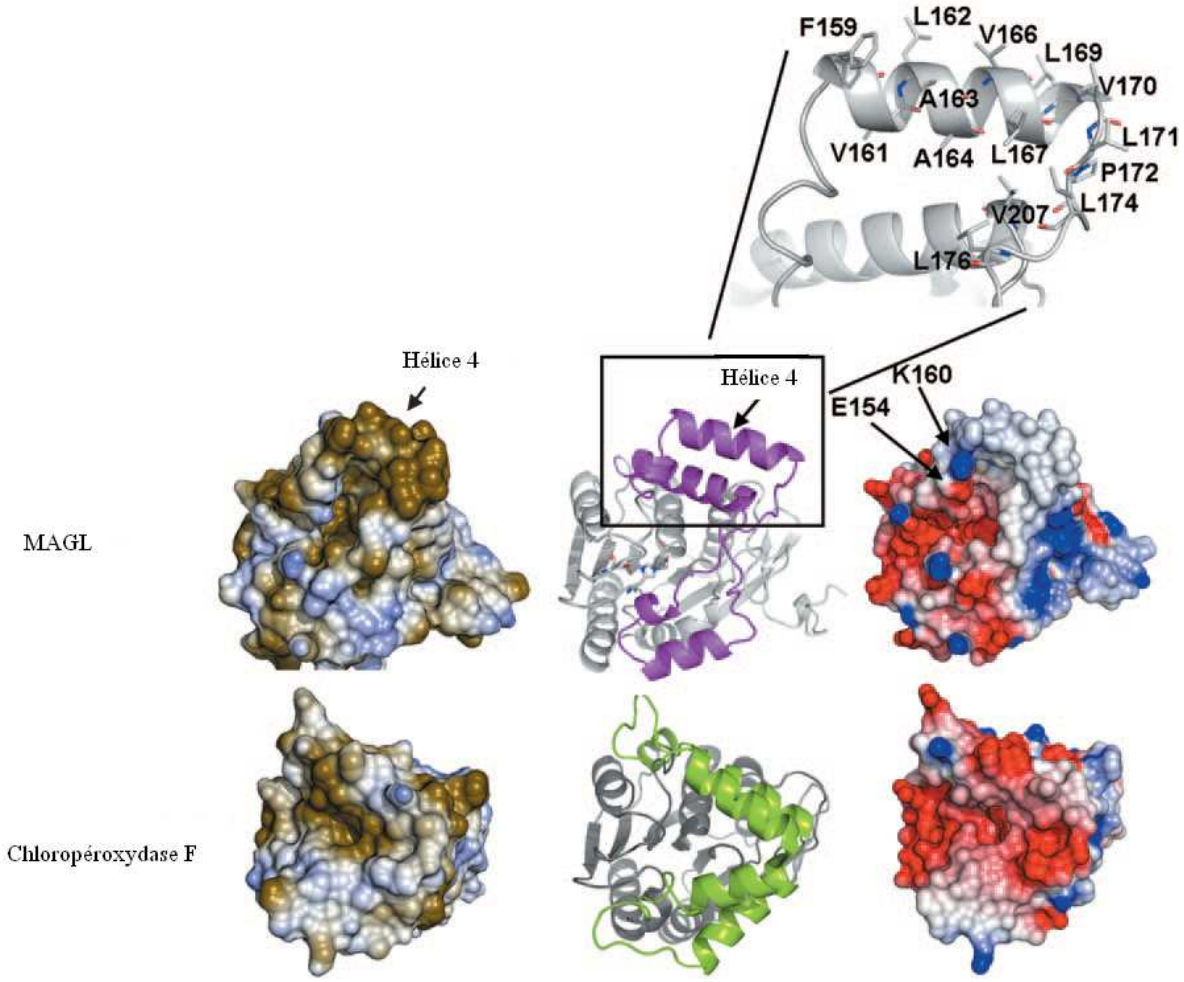


Figure A. 62. Comparaison des domaines couronnes de la MAGL et de la chloropéroxydase F

c. β) Distribution et spécificité de substrat

Comme la FAAH, la distribution de la MAGL est à la fois centrale et périphérique. Elle est exprimée dans de nombreux tissus comme le foie, le tissu adipeux ou encore le tractus gastro-intestinal.[251,252] Dans le cerveau,

[251] Long J. Z., Nomura D. K., Cravatt B. F. Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chem. Biol.,* **2009,** *16,* 744-753

les concentrations de l'enzyme sont élevées au niveau des zones riches en récepteur CB1 comme l'hippocampe, le cortex et le cerebellum.[253]

La MAGL hydrolyse principalement les dérivés d'acides gras à longue ou moyenne chaîne comme l'acide myristique, palmitique, oléique, stéarique et arachidonique. Toutefois les meilleurs taux d'hydrolyse ont été observés pour des dérivés de l'acide oléique et de l'acide arachidonique.[254]

c. γ) Propriétés catalytiques

La MAGL interagit avec ses substrats par le biais d'une triade catalytique caractéristique des sérines hydrolases faisant intervenir un résidu sérine dont la nucléophilie est augmentée par la présence d'un acide aspartique et d'une histidine. Des études de mutagénèse dirigée ont montré que dans le cas de la MAGL, la triade catalytique se compose de la Ser122, de l'Asp239 et de l'His269.[255]

Ainsi, comme dans le cas de la FAAH, on peut supposer que l'His269 jouant le rôle de base déprotonne l'Asp239 qui, à son tour, arrache le proton de la Ser122. L'alcoolate ainsi formé réalise alors une réaction d'addition-élimination sur le carbonyle de la fonction ester du 2-AG induisant la rupture de la liaison C-O et la libération de glycérol dans le milieu.

[252] Duncan M., Thomas A. D., Cluny N. L., Patel A., Patel K. D., Lutz B., Piomelli D., Alexander S. P., Sharkey K. A. Distribution and function of monoacylglycerol lipase in the gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **2008,** *295,* 1255-1265

[253] Dinh T. P., Carpenter D., Leslie F. M., Freund T. F., Katona I., Sensi S. L., Kathuria S., Piomelli D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **2002**, *99,* 10819-10824

[254] Saario S. M., Laitinen J. T. Monoglyceride lipase as an enzyme hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biodivers.,* **2007,** *4,* 1903-1913

[255] Karlsson M., Contreras J. A., Hellman U., Tornqvist H., Holm C. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J. Biol. Chem.,* **1997,** *272,* 27218-27223

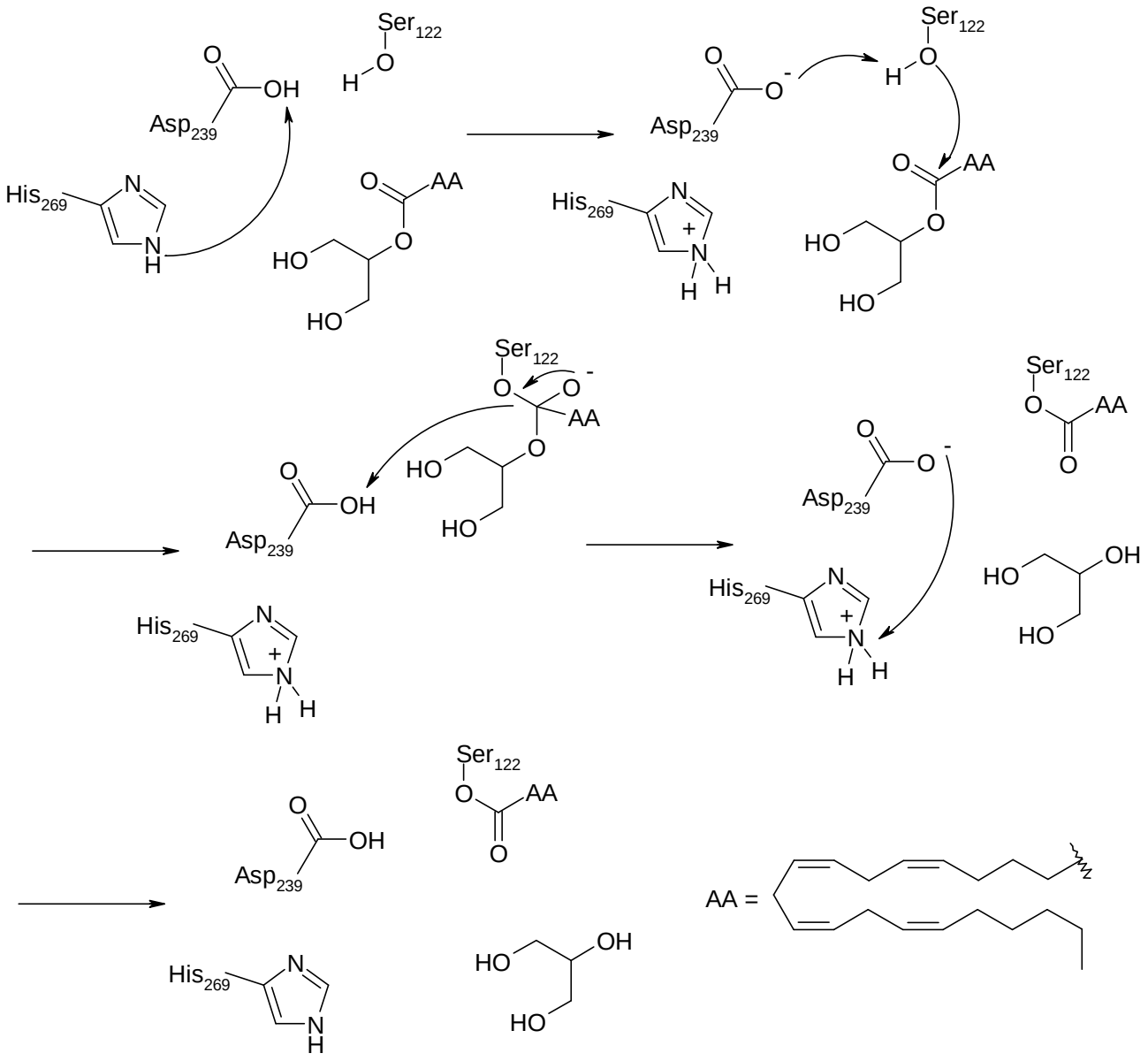


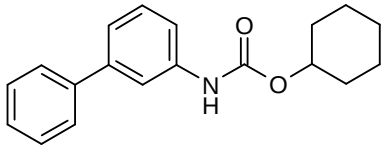
Figure A. 63. Mécanisme supposé pour l'hydrolyse du 2-AG par la MAGL

c. δ) Les inhibiteurs de la MAGL

Si les données sur l'inhibition de la MAGL sont moins nombreuses que pour la FAAH, de récentes études permettent de classer les inhibiteurs de l'enzyme en trois catégories.[256] La première inclut des inhibiteurs

[256] Bertrand T., Augé F., Houtmann J., Rak A., Vallée F., Mikol V., Berne P. F., Michot N., Cheuret D., Hoornaert C., Mathieu M. Structural basis for human monoglyceride lipase inhibition. *J. Mol. Biol.,* **2010,** *396,* 663-673

non-compétitifs partiellement réversibles comme l'URB602 qui, bien qu'il présente une faible affinité ainsi qu'une faible sélectivité pour la MAGL, possède des propriétés analgésiques.[257258]

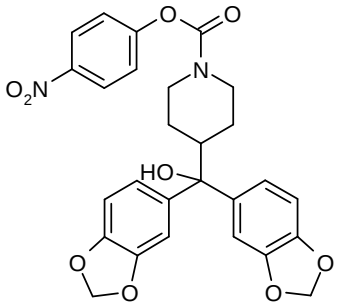


URB602

MAGL : CI_{50} = 28 µM

Figure A. 64. Structure chimique de l'URB602

La deuxième catégorie regroupe les agents sérine-réactifs comme le 4-nitrophényl-carbamate JZL184, qui a récemment été décrit comme un inhibiteur irréversible.[259,260]



JZL184

MAGL : CI_{50} = 8 nM

Figure A. 65. Structure chimique du JZL184

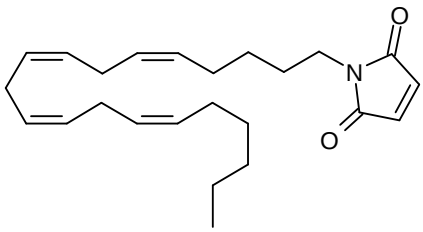
[257] Guindon J., Desroches J., Dani M., Beaulieu P. Pre-emptive antinociceptive effects of a synthetic cannabinoid in a model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.,* **2007,** *568,* 173-176

[258] Hohmann A. G., Suplita R. L., Bolton N. M., Neely M. H., Fegley D., Mangieri R., Krey J. F., Walker J. M., Holmes P. V., Crystal J. D., Duranti A., Tontini A., Mor M., Tarzia G., Piomelli D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature,* **2005,** *435,* 1108-1112

[259] Long J. Z., Li W., Booker L., Burston J. J., Kinsey S. G., Schlosburg J. E., Pavon F. J., Serrano A. M., Selley D. E., Parsons L. H., Lichtman A. H., Cravatt B. F. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat. Chem. Biol.,* **2009,** *5,* 37-44

[260] Long J. Z., Nomura D. K., Cravatt B. F. Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chem. Biol.,* **2009,** *16,* 744-753

Enfin, la troisième catégorie comprend des agents cystéine-réactifs tels que le *N*-arachidonoylmaléimide (NAM), qui établissent une liaison covalente avec la Ser122.[261,262]



NAM

MAGL : CI_{50} = 140 nM

Figure A. 66. Structure chimique du NAM

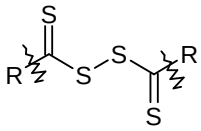
En 2009, King *& al.* ont décrit une nouvelle série de molécules de type isothiazolone qui inhibent l'enzyme par le biais d'un mécanisme unique, partiellement réversible, impliquant spécifiquement la Cys208.[263] Ce résidu semble tenir une importance capitale au niveau des mécanismes d'inhibition puisque d'autres inhibiteurs possédant un groupement disulfure inhibent la MAGL par le biais d'une liaison avec ce résidu.[264]

[261] Saario S. M., Salo O. M., Nevalainen T., Poso A., Laitinen J. T., Jarvinen T., Niemi R. Characterization of the sulfhydryl-sensitive site in the enzyme responsible for hydrolysis of 2-arachidonoyl-glycerol in rat cerebellar membranes. *Chem. Biol.,* **2005,** *12,* 649-656

[262] Maruszak N., Muccioli G. G., Labar G., Lambert D. M. Synthesis and in vitro evaluation of N-substituted maleimide derivatives as selective monoglyceride lipase inhibitors. *J. Med. Chem.,* **2009,** *52,* 7410-7420

[263] King A. R., Lodola A., Carmi C., Fu J., Mor M., Piomelli D. A critical cysteine residue in monoacylglycerol lipase is targeted by a new class of isothiazolinone-based enzyme inhibitors. *Br. J. Pharmacol.,* **2009,** *157,* 974-983

[264] Kapanda C. N., Muccioli G. G., Labar G., Poupaert J. H., Lambert D. M. Bis(dialkylaminethiocarbonyl)disulfides as potent and selective monoglyceride lipase inhibitors. *J. Med. Chem.,* **2009,** *52,* 7310-7314



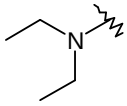
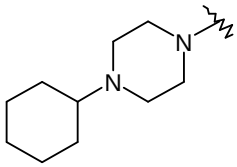
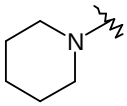
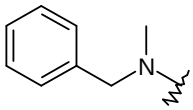
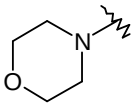
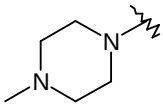
R	hMAGL : pIC_{50}	R	hMAGL : pIC_{50}
	5.90 ± 0.04		6.78 ± 0.03
	6.57 ± 0.08		6.36 ± 0.07
	6.66 ± 0.08		6.96 ± 0.05

Figure A. 67. Inhibiteurs de type Bis(dialkylaminethiocarbonyl)disulfures

Contrairement à la FAAH, peu de données concernant l'inhibition de la MAGL et notamment relatant l'utilisation d'animaux génétiquement invalidés pour l'enzyme sont disponibles dans la littérature. Toutefois, il apparaît que cette enzyme puisse être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de la douleur.[265]

7. d) La « *N*-acyléthanolamine acyl amidase » (NAAA)

d. α) Structure

Mise en évidence en 2001 par Ueda *& al.*, la NAAA n'a été clonée que très récemment. Cette glycoprotéine de la famille des cystéines hydrolases comprend 359 acides aminés chez l'Homme, possède un poids moléculaire de 31 kDa et dégrade son substrat, le PEA, à un pH d'action optimal de 5.[266,267]

[265] Desroches J., Guindon J., Lambert C., Beaulieu P. Modulation of the anti-nociceptive effects of 2-arachidonoyl glycerol by peripherally administered FAAH and MGL inhibitors in a neuropathic pain model. *Br. J. Pharmacol.,* **2008,** *155,* 913-924

[266] Ueda N., Yamanaka K., Yamamoto S. Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J. Biol. Chem.,* **2001,** *276,* 35552-35557

A ce jour, la NAAA n'a pas été cristallisée.[268] Cependant, en se basant sur les coordonnées cristallographiques de la CBAH (Conjugated Bile Acid Hydrolase), une enzyme appartenant au même groupe que la NAAA, les chercheurs ont pu établir un modèle tridimensionnel théorique.[269] Dans ce modèle, l'intermédiaire tétraédrique issu de l'attaque de la Cys131 sur le PEA est stabilisé par le biais d'interactions électrostatiques s'établissant entre l'oxygène du carbonyle du PEA et la poche à oxanion de l'enzyme comprenant les asparagines 292 et 209. L'Asp150 est, quant à lui, impliqué dans la stabilisation de la Cys131 tandis que la chaîne latérale du substrat se loge dans une cavité hydrophobe comprenant entre autres résidus, la Tyr151.

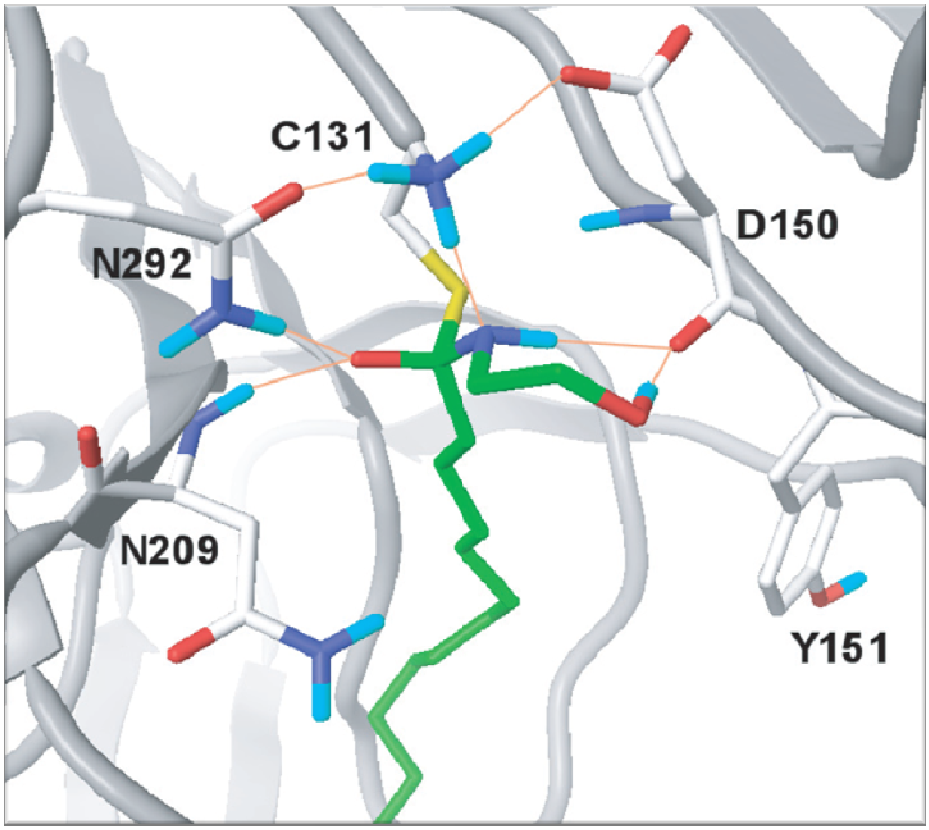


Figure A. 68. Caractéristiques du site actif de la NAAA

[267] Tsuboi K., Sun Y. X., Okamoto Y., Araki N., Tonai T., Ueda N. Molecular characterization of N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *J. Biol. Chem.,* **2005,** *280,* 11082-11092

[268] Vandevoorde S., Lambert D. M. Focus on the three key enzymes hydrolysing endocannabinoids as new drug targets. *Curr. Pharm. Des.,* **2005,** *11,* 2647-2668

[269] Solorzano C., Zhu C., Battista N., Astarita G., Lodola A., Rivara S., Mor M., Russo R., Maccarrone M., Antonietti F., Duranti A., Tontini A., Cuzzocrea S., Tarzia G., Piomelli D. Selective N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase inhibition reveals a key role for endogenous palmitoylethanolamide in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **2009,** *106,* 20966-20971

d. β) Distribution et spécificité de substrat

La NAAA est essentiellement présente au niveau périphérique. On la retrouve surtout au niveau du poumon, de la rate, du petit intestin, du thymus, du caecum ainsi qu'au niveau des macrophages péritonéaux et alvéolaires. Elle est également présente, mais en quantité plus faible, au niveau du cerveau, de la glande submaxillaire, du cœur, de l'estomac, du foie, du gros intestin, du rein et des testicules.[257]

La NAAA hydrolyse de nombreux *N*-acyléthanolamides mais affiche une préférence pour les composés saturés. En effet, le PEA est le substrat le plus facilement hydrolysé devant le *N*-myristoyléthanolamide (C14 : 0), le *N*-stéaroyléthanolamide (C18 : 0), le *N*-oléoyléthanolamide (C18 : 1), le *N*-linoléoyléthanolamide (C18 : 2) et l'AEA qui, lui, n'est que très faiblement clivé par l'enzyme.[270]

d. γ) Propriétés catalytiques

A ce jour, le mécanisme d'action de la NAAA n'a pas encore été clairement défini. Toutefois il apparait que la Cys131, par le biais de la nucléophilie de sa fonction thiol, attaque le carbonyle du PEA et provoque la rupture de la liaison C-N, permettant la libération d'éthanolamine dans le milieu.[271]

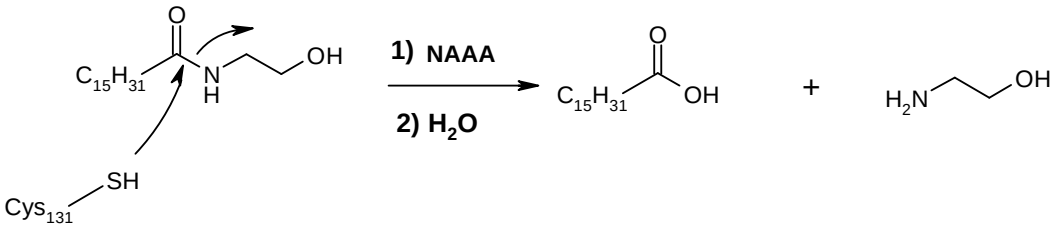


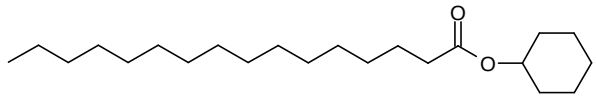
Figure A. 68. Hydrolyse du PEA par la NAAA

d. δ) Les inhibiteurs de la NAAA

Actuellement, peu d'inhibiteurs de la NAAA ont été décrits dans la littérature. L'enzyme hydrolysant préférentiellement le PEA, les inhibiteurs existants dérivent de l'acide palmitique. Parmi eux, le

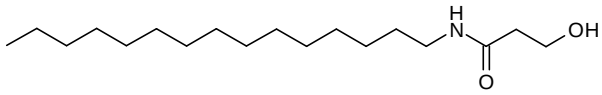
[270] Ueda N., Kurahashi Y., Yamamoto S., Tokunaga T. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J. Biol. Chem.,* **1995,** *270,* 23823-23827
[271] Tsuboi K., Takezaki N., Ueda N. The N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Chem. Biodivers.,* **2007,** *4,* 1914-1925

cyclohexylpalmitate et le *N*-(3-hydroxypropionyl)pentadécanamide ont présenté des CI_{50} de 19 et 31 µM, respectivement. Par ailleurs ces composés n'ont pas présenté d'affinité pour les récepteurs aux cannabinoïdes et n'inhibent pas la FAAH.[272]



cyclohexylpalmitate

NAAA : CI_{50} = 19 µM

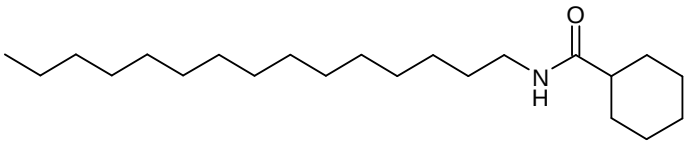


N-(3-hydroxypropionyl)pentadécanamide

NAAA : CI_{50} = 31 µM

Figure A. 70. Structures chimiques du cyclohexylpalmitate et du *N*-(3-hydroxypropionyl)pentadécanamide

La cyclohexanecarbonylpentadecylamine est à ce jour, l'un des inhibiteurs de NAAA les plus puissants puisqu'elle inhibe l'enzyme avec une CI_{50} de 4.5 µM.[273]



cyclohexanecarbonylpentadecylamine

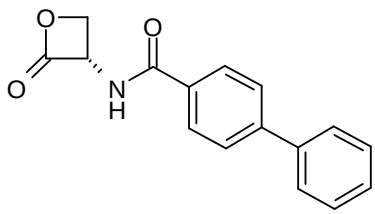
NAAA : CI_{50} = 4.5 µM

Figure A. 71. Structure chimique de la cyclohexanecarbonylpentadecylamine

Très récemment, Solorzano *& al.* ont découvert le (S)-N-(2-oxo-3-oxetanyl)biphényl-4-carboxamide qui inhibe la NAAA avec une CI_{50} de 115 nM.

[272] Vandevoorde S., Tsuboi K., Ueda N., Jonsson K. O., Fowler C. J., Lambert D. M. Esters, retroesters, and a retroamide of palmitic acid: pool for the first selective inhibitors of N-palmitoylethanolamine-selective acid amidase. *J. Med. Chem.,* **2003,** *46,* 4373-4376

[273] Saturnino C., Petrosino S., Ligresti A., Palladino C., De Martino G., Bisogno T., Di Marzo V. Synthesis and biological evaluation of new potential inhibitors of N-acylethanolamine hydrolyzing acid amidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2010,** *20,* 1210-1213



(S)-N-(2-oxo-3-oxetanyl)biphényl-4-carboxamide

NAAA : CI_{50} = 115 nM

Figure A. 72. Structure chimique du (S)-N-(2-oxo-3-oxetanyl)biphényl-4-carboxamide

Les données sur l'inhibition de la NAAA sont, comme celles de la MAGL, peu nombreuses. En revanche, l'intérêt thérapeutique des inhibiteurs de la FAAH a largement été développé. C'est pourquoi dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des MICI, nous nous sommes intéressés au blocage chimique de la FAAH.

A. III) Intérêt de l'inhibition de la FAAH dans le traitement des MICI

Plusieurs études suggérant un rôle protecteur du système endocannabinoïde dans le contrôle de l'inflammation ont été recensées. Massa *& al.* ont notamment comparé l'intensité de l'inflammation du côlon de souris KO CB1 à celle de souris sauvage. Cette équipe a ainsi montré que les côlons des souris KO CB1 ont été significativement plus endommagés que ceux des souris sauvages. Par ailleurs, l'administration d'un antagoniste CB1, le SR141716A, aux souris sauvages a montré une inflammation des tissus comparable à celle observée chez les souris KO CB1, indiquant que le récepteur CB1 joue un rôle protecteur dans la colite. De même l'invalidation génétique de la FAAH chez des animaux dont la colite avait été induite par l'injection intrarectale d'acide 2,4-dinitrobenzène sulfonique (DNBS), a permis de réduire notablement l'inflammation des tissus.[274]

[274] Massa F., Marsicano G., Hermann H., Cannich A., Monory K., Cravatt B. F., Ferri G. L., Sibaev A., Storr M., Lutz B. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J. Clin. Invest.,* **2004,** *113,* 1202-1209

Une autre étude menée par l'équipe du Pr. Andreu a montré une surexpression des récepteurs CB2, de la MAGL ou encore de la DAG-lipase au niveau du tractus gastro-intestinal de patients atteints de MICI. Ceci permet de confirmer le rôle protecteur du système endocannabinoïde dans l'inflammation du côlon.[275]

Storr *& al.* ont, quant à eux, évalué l'efficacité d'un inhibiteur de la FAAH, l'URB597 et celle du VDM11, un inhibiteur du transport de l'anandamide chez des souris dont la colite a été induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS). Un groupe d'animaux a reçu l'URB597 en traitement d'attaque tandis qu'un autre s'est vu administré l'inhibiteur en traitement préventif, soit trois jours avant l'induction de la colite et en traitement d'attaque jusqu'au jour du sacrifice. Dans les deux cas, l'administration de l'inhibiteur a amélioré le taux de survie des animaux, permettant même la survie de tous les sujets composant le groupe dans lequel l'URB597 a été administré trois jours avant l'induction de la colite. L'évaluation des scores des dommages macroscopiques a montré une préservation des tissus chez les animaux ayant reçu l'URB597 ainsi qu'une nette diminution de l'activité MPO (myélopéroxidase).[15]

Cette étude montre de manière concluante l'intérêt des inhibiteurs de la FAAH dans le traitement de la colite induite par le TNBS.

Ces résultats sont les premiers à avoir été publiés et leur caractère encourageant nous a naturellement incités à concevoir, puis à synthétiser de nouvelles molécules inhibitrices dans le but de les évaluer par la suite de manière similaire à ce qui a été rapporté dans l'étude de Storr.

[275] Marquéz L., Suarez J., Iglesias M., Bermudez-Silva F. J., Rodriguez de Fonseca F., Andreu M. Ulcerative colitis induces changes on the expression of the endocannabinoid system in the human colonic tissue. *PLoS One.,* **2009,** *4,* e6893

B) Conception des composés

La découverte du système endocannabinoïde au niveau du tractus gastro-intestinal et les dernières études menées sur l'effet protecteur exercé par l'anandamide dans la colite[276] nous ont incités à concevoir de nouveaux inhibiteurs de la FAAH et à évaluer leur potentiel anti-inflammatoire en cas de colite.

Pour cela, nous avons envisagé trois séries de composés. Les séries A et B ont été conçues à partir de l'étude de relations structure-activité (RSA) d'inhibiteurs existants. Les composés de la série C, sont quant à eux issus d'un criblage virtuel.

B. I) Conception d'inhibiteurs de type 4-aminopipéridine urée : série A

La conception de cette série s'est appuyée sur les RSA décrites pour la famille des urées et plus précisément celles d'inhibiteurs de type pipérazine urée développés par Janssen Pharma ainsi que sur le mode de fixation du PF-750.

I. 1) Etude des relations structure-activité des inhibiteurs de type pipérazine et pipéridine urée

En 2006, les industries Janssen Pharma ont déposé un brevet d'invention revendiquant la synthèse de composés inhibiteurs de la FAAH potentiellement utilisables dans le traitement de la douleur, de l'inflammation, des troubles du sommeil ou encore de la sclérose en plaques.[227] Ces molécules s'articulent autour d'un connecteur de type pipéridine ou pipérazine portant une fonction urée susceptible d'interagir avec la sérine 241 de l'enzyme. De part et d'autre de la fonction urée et du connecteur on trouve des groupements aromatiques volumineux capables d'occuper les cavités hydrophobes de la protéine.

[276] Engel M. A., Kellermann C. A., Rau T., Burnat G., Hahn E. G., Konturek P. C. Ulcerative colitis in AKR mice is attenuated by intraperitoneally administered anandamide. *J. Physiol. Pharmacol.,* **2008,** *59,* 673-689

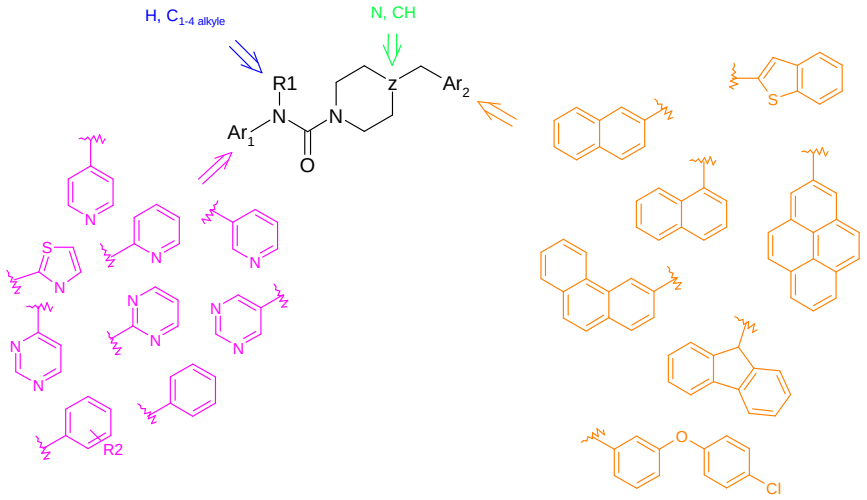
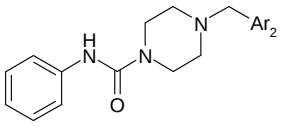


Figure B. 1. Structure générale des inhibiteurs issus du brevet Janssen

L'étude des composés construits autour d'un connecteur de type pipérazine portant un noyau phényle en position Ar_1 et un atome d'hydrogène en R1 a permis de révéler des molécules inhibant la FAAH avec des CI_{50} de l'ordre du nanomolaire.



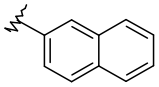
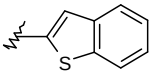
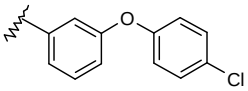
Ar_2			
CI_{50} (nM)	17	19	9

Figure B. 2. Activités d'inhibiteurs à connecteur pipérazine

Par ailleurs, des études de cristallographie portant sur le PF-750 possédant une structure chimique proche des inhibiteurs Janssen ont permis d'élucider le mécanisme d'inhibition covalent de cet inhibiteur. Ainsi la

sérine 241 de la FAAH attaque le carbonyle de la fonction urée et permet la libération d'aniline sous forme de groupe partant.[277]

Afin d'établir des RSA, nous avons, en collaboration avec le laboratoire de modélisation moléculaire du Professeur Philippe Chavatte, réalisé le docking du PF-750 et d'un inhibiteur issu du brevet Janssen dans le site actif de la FAAH.

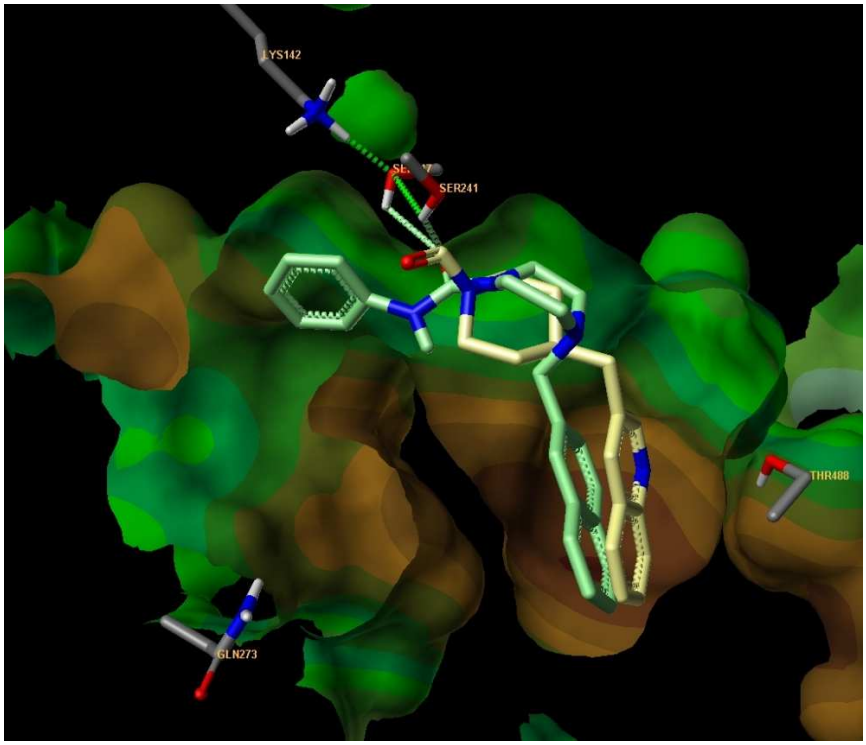


Figure B. 3. Docking du PF-750 dans le site actif de la FAAH (jaune) et d'un inhibiteur Janssen (vert)

Ces expériences ont montré que les composés adoptaient un mode de fixation proche. En effet, les interactions hydrophobes grâce aux groupements 3-méthylquinoléine et 2-méthylnaphtyle, qui se placent dans l'ABP, cavité qui accueille habituellement la chaîne grasse de l'anandamide, sont maximisées. Le carbonyle de la fonction urée des inhibiteurs se trouve à proximité de la Ser241 de la protéine, de manière à ce que l'attaque nucléophile du carbone par le groupement hydroxyle de l'acide aminé soit rendue possible. Enfin, le groupement partant, sous forme d'aniline, occupe la poche à oxanion.

[277] Mileni M., Johnson D. S., Wang Z., Everdeen D. S., Liimatta M., Pabst B., Bhattacharya K., Nugent R. A., Kamtekar S., Cravatt B. F., Ahn K., Stevens R. C. Structure-guided inhibitor design for human FAAH by interspecies active site conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **2008,** *105,* 12820-12824

Puisque le PF-750 et l'inhibiteur Janssen choisi présentent un mode de fixation semblable, on peut émettre l'hypothèse que ces molécules ont un mécanisme d'action identique.

I. 2) Conception d'inhibiteurs de type 4-aminopipéridine urée

Le premier objectif de nos travaux a consisté à développer de nouvelles molécules inhibitrices de la FAAH s'articulant autour d'un connecteur de type 4-aminopipéridine.

Cette série s'appuie sur les RSA et le mécanisme d'action du PF-750 ainsi que sur l'étude des inhibiteurs issus du brevet Janssen. Ces composés possédent un mécanisme d'inhibition de type irréversible. Il est probable alors que nos molécules adoptent elles aussi ce type de mécanisme.

Ainsi, nous avons envisagé diverses pharmacomodulations portant notamment sur le connecteur pipérazine, sur le groupement partant, ainsi que sur les groupements interagissant avec l'ABP.

2. 1) Remplacement du connecteur

Les études de modélisation moléculaire réalisées sur le PF-750 et sur l'un des inhibiteurs Janssen ont révélé que l'hétérocycle pipéridine ou pipérazine jouait le rôle de connecteur et permettait d'orienter correctement les groupements alentours dans l'espace. Ainsi, les groupements 3-méthylquinoléine et 2-méthylnaphtyle se positionnent dans l'ABP tandis que le groupement partant aminophényle se loge dans la poche à oxanion.

Dans un souci d'originalité de structures, nous avons décidé de remplacer la pipéridine du PF-750 par un motif 4-aminopipéridine. Ce groupement possède de nombreux avantages comme celui d'avoir été précédemment étudié au laboratoire[278] ou celui d'introduire dans la molécule un atome d'azote salifiable susceptible de constituer un obstacle au franchissement de la barrière hématoencéphalique par nos molécules, les privant ainsi d'effets centraux indésirables.

[278] Millet R., Domarkas J., Houssin R., Gilleron P., Goossens J. F., Chavatte P., Logé C., Pommery N., Pommery J., Hénichart J. P. Potent and selective farnesyl transferase inhibitors. *J. Med. Chem.,* **2004,** *47,* 6812-6820

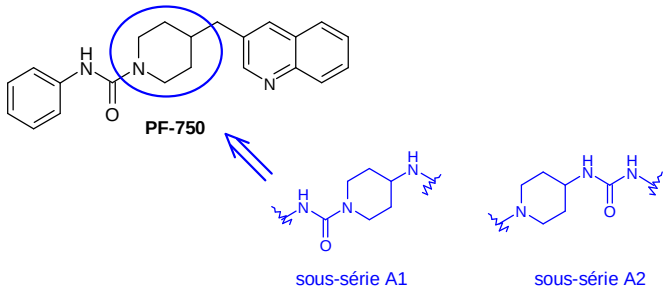


Figure B. 4. Remplacement de la pipérazine par un connecteur 4-aminopipéridine

Par ailleurs, la conception de nos composés autour du motif 4-aminopipéridine nous permet d'envisager deux sous-séries : la sous-série A1 dans laquelle la fonction urée inclut l'azote hétérocyclique et la sous-série A2 dans laquelle l'urée est extra-cyclique.

2. 2) Remplacement des groupements interagissant avec l'ABP

Le PF-750 possède un groupement 3-méthylquinoléine qui se loge dans la poche ABP de l'enzyme. Les inhibiteurs issus du brevet Janssen possèdent quant à eux différents groupements comme le groupement 2-méthylnaphtyle ou 2-méthylbenzyl[b]thiophène. Pour la conception de nos molécules, nous avons choisi d'introduire des groupements de type 1-méthylnaphtyle, 2-méthylnaphtyle, 1-benzyle ainsi qu'un groupement aliphatique de type *n*-pentyle.

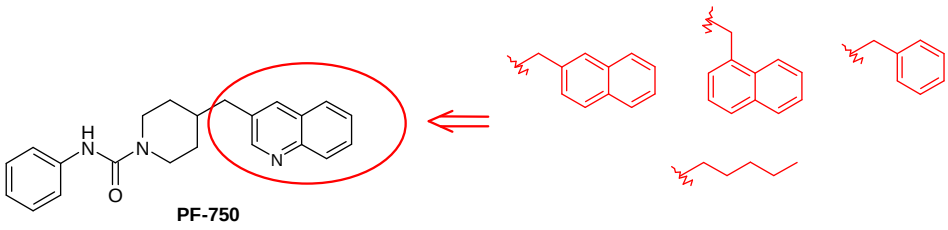


Figure B. 5. Remplacement du groupement se liant à l'ABP

L'intérêt de l'introduction du groupement *n*-pentyle, sera de nous renseigner sur la nécessité de la présence d'un groupement aromatique en cette position.

2. 3) Pharmacomodulations autour du groupement partant

De nombreux inhibiteurs irréversibles comme le PF-750 et l'URB597 possèdent des groupements partants de nature aromatique dont la délocalisation électronique permet de favoriser la réaction de carbamoylation effectuée par la Ser241.

Pour la conception de nos molécules, nous avons choisi d'introduire en cette position un noyau phényle substitué ou non par différents groupements. Ces derniers possèdent de préférence un caractère électroattracteur de manière à fragiliser la liaison C-N qui doit être rompue lors de la réaction de carbamoylation. Toutefois, l'introduction d'un groupement électrodonneur nous permettra d'établir une comparaison et de conclure sur l'intérêt du caractère électronique du groupement partant.

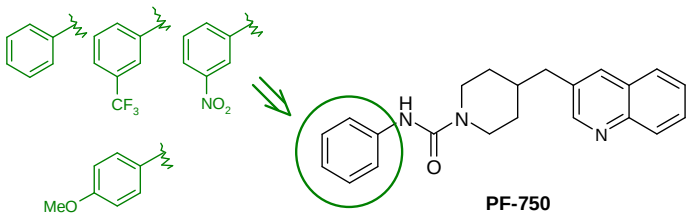


Figure B. 6. Substitution du noyau phényle partant

Les pharmacomodulations envisagées nous mènent alors vers deux séries de molécules construites autour d'un connecteur de type 4-aminopipéridine urée.

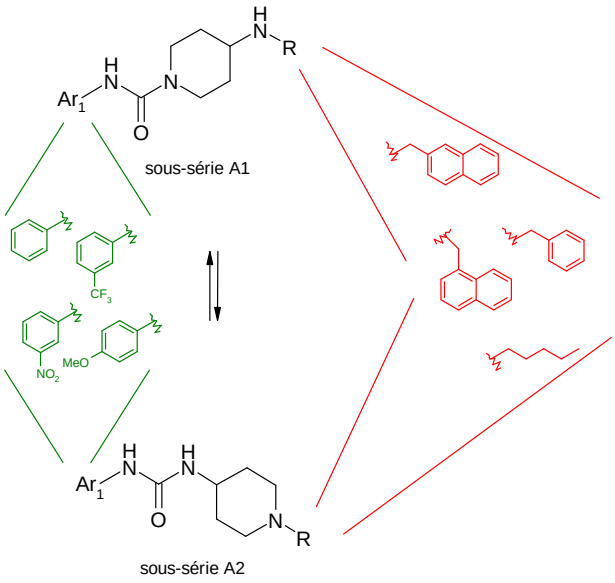


Figure B. 7. Structures générales des composés de la série A

B. II) Conception d'inhibiteurs de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole : série B

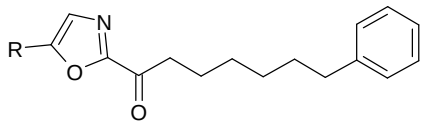
Cette série est née de modifications structurales envisagées autour du chef de file des inhibiteurs de la famille des α-cétohétérocycles : l'OL-135. Pour cela, nous avons dans un premier temps étudié les RSA décrites pour cette famille de composés.

II. 1) Etude des relations structure-activité des α-cétohétérocyles

Les propriétés analgésiques de l'OL-135 ont encouragé les chercheurs à éclaircir ses RSA.[279] Ainsi, les premières études de pharmacomodulations de l'OL-135 ont porté sur la nature du groupement aromatique porté par le carbone C5 de l'oxazole ainsi que sur l'importance et le positionnement de la fonction cétone.[207]

Dans ce contexte, la pyridine en C5 a dans un premier temps été remplacée par des groupements de type 2-furyle, 2-thiényle et phényle, qui ont tous les trois diminué l'affinité des composés.

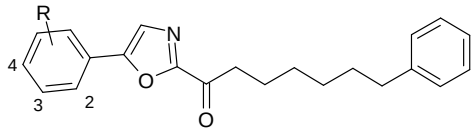
[279] Lichtman A. H., Leung D., Shelton C. C., Saghatelian A., Hardouin C., Boger D. L., Cravatt B. F. Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **2004,** *311,* 441-448



R	Ki (µM)
2-pyridyle (OL-135)	0.0047
2-furyle	0.012
2-thiényle	0.055
phényle	0.08

Figure B. 8. Remplacement de la pyridine par d'autres groupements aromatiques

Par la suite, le groupement phényle en C5 a été conservé et les chercheurs ont étudié l'influence de la substitution en position ortho, méta et para de ce noyau. De manière générale, la substitution en position méta semble être la plus favorable à l'activité. Toutefois, les résultats demeurent globalement moins bons que ceux obtenus avec la pyridine, sauf lorsque le groupement introduit en méta est un sulfonamide.

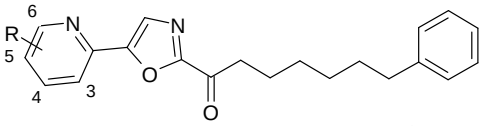


	Ki (µM)		
R	position 2	position 3	position 4
NO_2	0.13	0.028	0.05
NH_2	0.75	0.019	0.09
CO_2CH_3	0.06	0.012	0.04
CO_2H	6.0	0.005	0.06
F	0.11	0.05	0.062
OCH_3	0.4	0.04	0.1
OH	0.17	0.05	0.14
SO_2NH_2	1.5	0.002	0.01
$CONH_2$	0.3	0.006	0.01
$COCF_3$	5.0	0.016	0.065
CN	0.13	0.015	0.04

Figure B. 9. Influence de la substitution du noyau phényle

Au vu des résultats précédents, la pyridine semble donc être le meilleur substituant pour le carbone C5 de l'oxazole. C'est, par conséquent, assez naturellement que les chercheurs se sont penchés sur l'étude de la substitution de la pyridine.

Les meilleures activités inhibitrices ont été obtenues pour les composés substitués en C4 par des groupements méthyle ou méthoxy. De manière générale, la substitution en C3 s'est révélée défavorable pour l'activité tandis que celle en C5 ou C6 varie selon le type de groupements introduits.

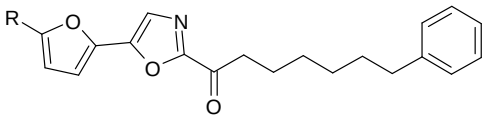


R = H ; Ki = 0.0047 µM

R	Ki (µM)	R	Ki (µM)
3-CH_3	0.015	3-CO_2CH_3	0.13
4-CH_3	0.0006	4-CO_2CH_3	0.0013
5-CH_3	0.0028	5-CO_2CH_3	0.0035
6-CH_3	0.0033	6-CO_2CH_3	0.008
4-OCH_3	0.0008	3-CO_2H	>0.05
4-CN	0.0011	4-CO_2H	0.05
4-CF_3	0.0035	5-CO_2H	0.007
4-NO_2	0.0032	6-CO_2H	0.02
4-NH_2	0.025	5-$CONH_2$	0.0012
4-F	0.002	6-$CONH_2$	0.001

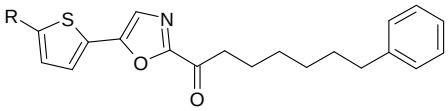
Figure B. 10. Influence de la substitution de la pyridine

Ces mêmes études ont également évalué l'influence de la substitution du thiophène et du furane. Il apparaît alors que la substitution de ces deux hétérocycles par des groupements électroattracteurs, de type ester ou sulfonamide, se révèle très favorable à l'inhibition de la FAAH.



R = H ; Ki = 0.012 µM

R	Ki (µM)	R	Ki (µM)
$-CO_2CH_3$	0.0055	$-CO_2H$	0.015



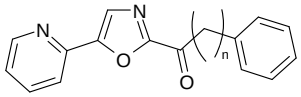
R = H ; Ki = 0.055 µM

R	Ki (µM)
$-CO_2CH_3$	0.007
$-CO_2H$	0.011
$-SO_2NH_2$	0.003

Figure B. 11. Influence de la substitution du thiophène et du furane

De manière similaire, la substitution en position C5 de l'oxazole par des groupements aliphatiques a donné des résultats semblables à ceux obtenus pour l'OL-135. Toutefois, si les groupements introduits sont de nature électroattractrice, l'activité s'en trouve alors améliorée.

Par la suite, les chercheurs ont étudié l'influence de la longueur de la chaîne *n*-alkylphényle sur l'activité ainsi que sur la sélectivité des composés pour la FAAH. Aussi, après des études de protéomiques, la TGH (« triglycéride hydrolase ») s'est révélée être une cible potentielle pour les α-cétohétérocycles.[206]



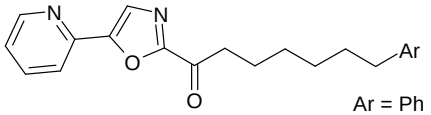
	Ki (µM)	Sélectivité (FAAH *vs* TGH)
n = 3	0.12	N.D.
n = 4	0.033	4
n = 5	0.011	7
n = 6	0.0047	65
n = 7	0.0075	125
n = 8	0.008	150
n = 10	0.022	280

Figure B. 12. Influence de la chaîne *n*-alkylphényle sur l'activité ainsi que sur la sélectivité des composés

On constate qu'il existe une relation parabolique entre l'activité et la longueur de la chaîne latérale séparant la fonction cétone du noyau phényle terminal. En effet, le maximum d'activité a été décrit pour l'OL-135 dont la fonction cétone est séparée du noyau phényle terminal par six carbones.

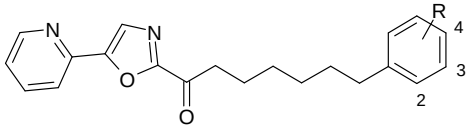
En revanche, la sélectivité des composés semble croître avec le nombre de carbones introduits sur la chaîne latérale, indiquant que la FAAH possède un site spacieux et hydrophobe capable d'accueillir de longues chaînes grasses.

Par la suite, ces mêmes études ont évalué l'influence du remplacement du noyau phényle terminal ainsi que l'importance de sa substitution.

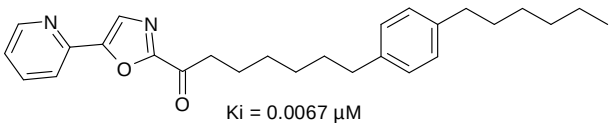


Ar = Ph ; Ki = 0.0047 µM

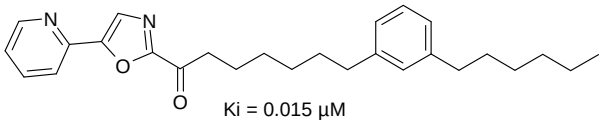
Ar	Ki (µM)	Ar	Ki (µM)
2-thiényle	0.0043	2-naphtyle	0.011
3-thiényle	0.0051	2-pyridyle	0.12
1-naphtyle	0.0026	3-pyridyle	0.032



R	Ki (µM)	R	Ki (µM)
2-CH_3	0.0030	2-CF_3	0.004
3-CH_3	0.0033	3-CF_3	0.004
4-CH_3	0.0028	4-CF_3	0.001
2-OCH_3	0.0058	2-CO_2CH_3	0.001
3-OCH_3	0.0025	3-CO_2CH_3	0.0019
4-OCH_3	0.0062	4-CO_2CH_3	0.0015
3-NH_2	0.030	2-CO_2H	>0.6
4-NH_2	0.0030	3-CO_2H	>0.6
3-NHBOC	0.0024	4-CO_2H	>0.6
4-NHBOC	0.0056	2-Cl	0.0019
2-F	0.0017	3-Cl	0.0009
3-F	0.0022	4-Cl	0.0027
4-F	0.0032	2,3-Cl_2	0.0009
2-SCH_3	0.0033	2-SO_2CH_3	0.037
3-SCH_3	0.0042	3-SO_2CH_3	0.0013
4-SCH_3	0.0025	4-SO_2CH_3	0.019
4-NO_2	0.0065		



Ki = 0.0067 µM



Ki = 0.015 µM

Figure B. 13. Influence du remplacement et de la substitution du phényle terminal

Dans ce contexte, il semble que le remplacement du phényle terminal par un aromatique isostère n'influe pas sur l'activité puisque les Ki obtenus sont du même ordre que celui de l'OL-135. En revanche, la

substitution du phényle par un atome ou un groupe d'atomes de nature électroattractrice permet une augmentation de l'activité. Enfin, il apparaît que la position de la substitution joue également un rôle puisqu'on observe une augmentation de l'activité, dès lors que les substituants sont introduits en C3.

D'autres pharmacomodulations ont également été effectuées dans le but d'étudier l'influence de la substitution de la chaîne latérale, ou encore sa cyclisation, mais les résultats obtenus sont globalement moins bons que ceux de l'OL-135.

Après avoir étudié l'influence de la pyridine en C5, la longueur de la chaîne latérale et l'influence de la substitution du phényle terminal, les chercheurs se sont penchés sur la modification de l'hétérocycle central.[208] Ainsi, l'oxazole central a été remplacé par différents hétérocycles, substitués en C5 par différents groupements.

	H						
hétérocycle \ R =							
	48	4.7	12	55	80	8.0	20
	1.0	0.29	0.56	0.80	2.2	3.0	14
	1.0	0.34	1.0	1.6	-	3.0	13
	7.0	1.1	8.5	44	-	7.0	53
	800	24	1500	2000	-	500	10000
	1.4	0.80	7.4	27	-	7.7	50
	140	25	40	46	-	110	360
	>1000	>100000	>1000	>1000	-	-	-
	>1000	1.1	5.0	8.5	16	-	-

Figure B. 14. Modulations de l'hétérocycle central

L'importance de la fonction cétone a également été décrite dans cette étude. En effet, une comparaison a été établie entre différents composés possédant la fonction cétone et d'autres, analogues des premiers, dépourvus du groupement carbonyle.

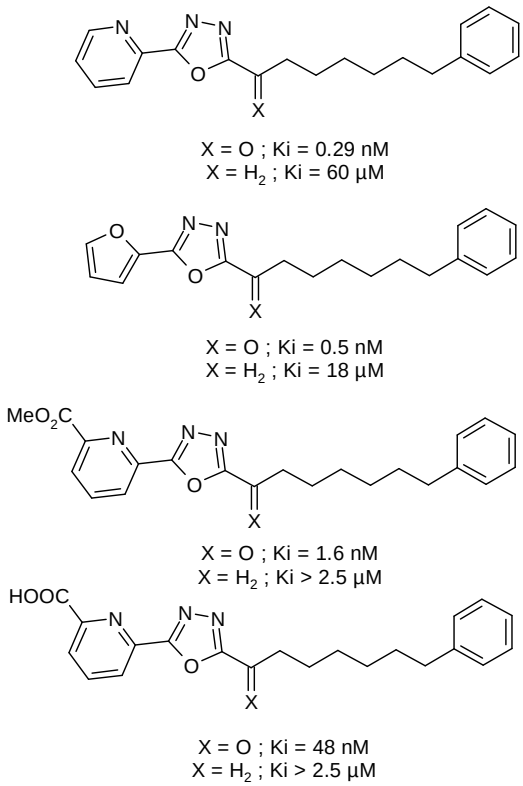


Figure B. 15. Importance de la fonction cétone

Au vu des résultats obtenus, on peut décrire la cétone comme indispensable à l'activité puisque sa suppression entraîne une multiplication du Ki par un facteur mille.

Une dernière étude a quant à elle révélé d'autres composés intéressants dont le phényle terminal était remplacé par un groupement biphényle.[280]

Actuellement, de nombreuses publications traitant des relations structure-activité de l'OL-135 et de ses dérivés sont répertoriées.[195, 206-209] La quantité remarquable des données existant sur les inhibiteurs de type α-cétohétérocycles ainsi que les propriétés thérapeutiques de l'OL-135, font de lui un chef de file prometteur pour la conception de nouvelles molécules inhibitrices de la FAAH.

[280] Kimball F. S., Romero F. A., Ezzili C., Garfunkle J., Rayl T. J., Hochstatter D. G., Hwang I., Boger D. L. Optimization of alpha-ketooxazole inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *J. Med. Chem.,* **2008,** *51,* 937-947

II. 2) Conception d'inhibiteurs de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole

2. 1) Remplacement de l'hétérocycle central

L'une des études citées précédemment s'est penchée sur l'influence que peut avoir la nature de l'hétérocycle central sur l'activité des composés. Ainsi, des composés comprenant un noyau thiazole, oxadiazole ou tétrazole ont été synthétisés.

Dans notre conception, nous avons choisi de remplacer l'oxazole de l'OL-135 par son isomère de position, l'isoxazole. Dans les études citées précédemment, les bons résultats obtenus par des composés possédant un hétérocycle différent de l'oxazole suggèrent que ce dernier n'interagit pas de manière directe avec la FAAH, mais permet d'orienter les groupements dans l'espace.[208] Ainsi, en conservant un hétérocycle à cinq sommets nous devrions conserver l'orientation des groupements alentours.

Par ailleurs, de nombreux composés possédant un groupement isoxazole ont été décrits dans la littérature pour leurs effets anti-inflammatoires.[281]

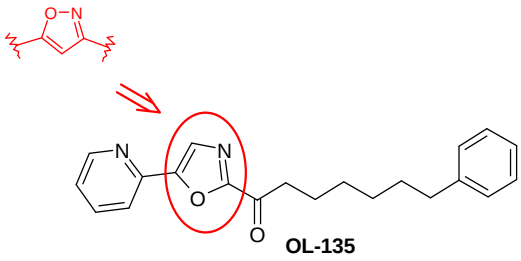


Figure B. 16. Remplacement de l'oxazole de l'OL-135 par un noyau isoxazole

Par la suite, il nous sera possible d'envisager l'iodation de l'isoxazole en position 4, ce qui nous permettra de faire réagir le composé généré avec un dérivé boronique dans un couplage de Suzuki afin d'étudier l'influence de la substitution en cette position.

[281] Talley J. J., Rogers K. L., Brown D. L., Nagarajan S., Carter J. S., Weier R. M., Stealey M. A., Collins P. W., Seibert K., Graneto M. J., Xu X., Partis R. Substituted isoxazoles for the treatment of inflammation. WO1996025405, **1996**

2. 2) Remplacement de la fonction cétone

L'électrophilie de la fonction cétone s'est révélée indispensable à l'activité puisque c'est à ce niveau que la sérine 241 réalise une réaction d'addition nucléophile.

Afin de concevoir de nouvelles molécules originales, nous avons choisi de remplacer la fonction cétone de l'OL-135 par une fonction amide possédant des caractéristiques électroniques proches.

Actuellement, peu d'inhibiteurs de FAAH possèdent une fonction amide. Les seuls à avoir été décrits sont les analogues de l'anandamide.[282] Le remplacement de la fonction cétone par une fonction amide est donc un critère d'originalité.

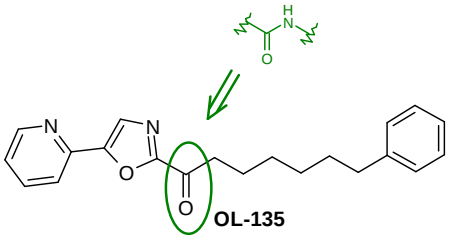


Figure B. 17. Remplacement de la fonction cétone par une fonction carboxamide

2. 3) Remplacement de la pyridine

Dans notre conception, nous avons également remplacé la pyridine de l'OL-135 par différents groupements aromatiques et aliphatiques. Les groupements introduits sont assez volumineux et ont été choisis de manière à potentialiser les interactions hydrophobes avec le site actif de la protéine. Par ailleurs, nous avons introduit des groupements originaux comme le groupement 2-naphtyle, phénantryle ou *p*-biphényle qui n'ont, à ce jour, pas été décrits dans les publications traitant des relations structure-activité des α-cétohétérocycles.

Au vu des premiers résultats pharmacologiques, le groupe *p*-biphényle s'est révélé être le meilleur groupement pour cette position. Aussi, nous avons envisagé d'étudier ses analogues de position, que sont les groupements, *o*-biphényle et *m*-biphényle. La variation de substitution faisant chuter l'activité, nous

[282] Bisogno T., Melck D., De Petrocellis L., Bobrov M. Y., Gretskaya N. M., Bezuglov W., Sitachitta N., Gerwick W. H., Di Marzo V. Arachidonoylserotonin and other novel inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **1998,** *248,* 515-522

avons ensuite fixé le groupement *p*-biphényle en position 5 de l'isoxazole et fait varier la nature des groupements substituant l'azote de la fonction amide en C3.

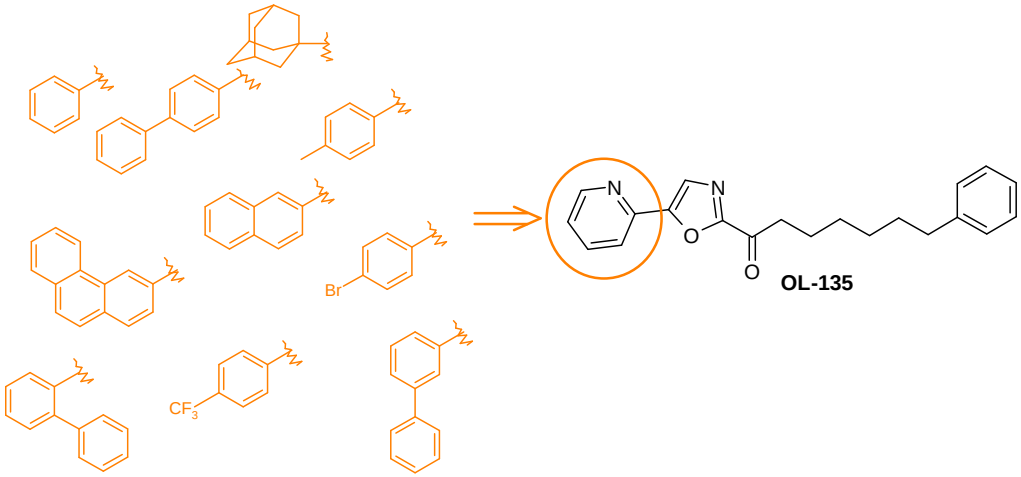


Figure B. 18. Remplacement de la pyridine

Par la suite, nous avons introduit en cette position un noyau phényle substitué par une chaîne *O*-alkyle. Cette pharmacomodulation est à l'origine de la conception de la série B' visant à développer de nouvelles molécules mixtes, agonistes des récepteurs CB2 / inhibitrices de la FAAH. Cette série sera décrite ultérieurement dans ce mémoire.

2. 4) Remplacement du motif phénylhéxyle

Dans un premier temps, nous avons remplacé le motif phénylhexyle de l'OL-135 par deux motifs : le motif phénylpropyle et le motif 3,4-méthylènedioxyphényléthyle. Ceci nous a permis de synthétiser deux sous-séries de molécules : la sous-série B1 dont les molécules contenaient le motif phénylpropyle et la sous-série B2 dont les composés comportaient le motif 3,4-méthylènedioxyphényléthyle.

Puis, après l'obtention des premiers résultats pharmacologiques, nous avons choisi de synthétiser les homologues inférieurs du meilleur composé obtenu dans les deux sous-séries respectives. Ainsi, nous avons remplacé le motif phénylpropyle par les groupements phényléthyle et benzyle et le motif 3,4-méthylènedioxyphényléthyle par les groupements 3,4-méthylènedioxyphényleméthyle et 3,4-méthylènedioxyphényle.

Comme décrit précédemment, le groupement *p*-biphényle en C5 s'est révélé être le groupement permettant le maximum d'activité des composés. Nous avons donc envisagé une sous-série B3, caractérisée par un groupement *p*-biphényle en C5 constant et dont les composés varient en fonction de la nature de leurs substituants remplaçant le groupement phénylhexyle. Pour, cela nous avons choisi des groupements aliphatiques et aromatiques comprenant parfois des centres de chiralité. La séparation des énantiomères grâce à des techniques de chromatographies chirales, nous permettra de conclure quant à une éventuelle énantiosélectivité de l'enzyme.

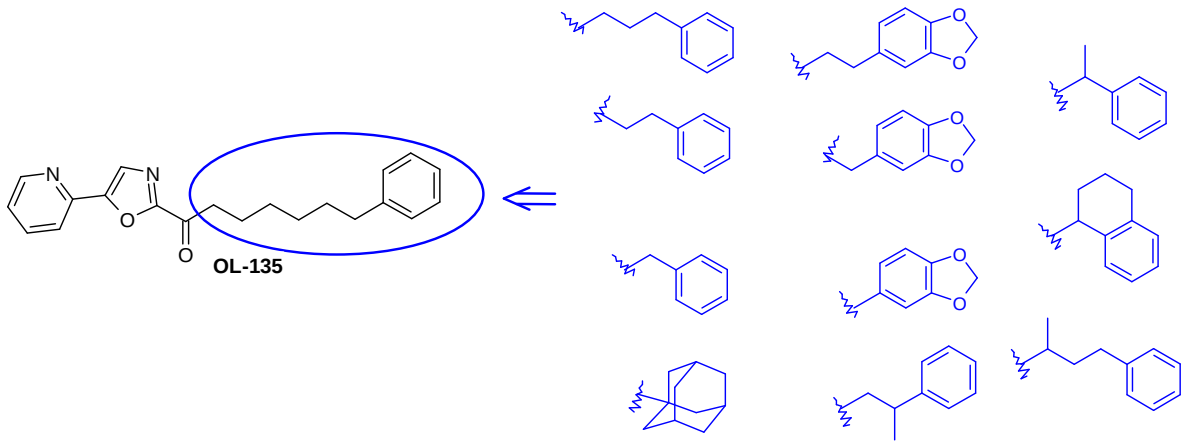


Figure B. 19. Remplacement du groupement phénylhexyle

Les pharmacomodulations envisagées nous mènent alors à la conception de trois sous-séries chimiques différant de part la nature du groupement se substituant au phényle terminal de l'OL-135. Ainsi, la sous-série B1 comprend des composés avec un noyau phényle terminal, la sous-série B2 des molécules dont la chaîne latérale est substituée par un groupement 3,4-méthylènedioxyphényle et la sous-série B3 inclut des composés dont l'amide porte des groupements variables, souvent chiraux mais qui sont toujours caractérisés par un noyau *p*-biphényle en C5 de l'isoxazole.

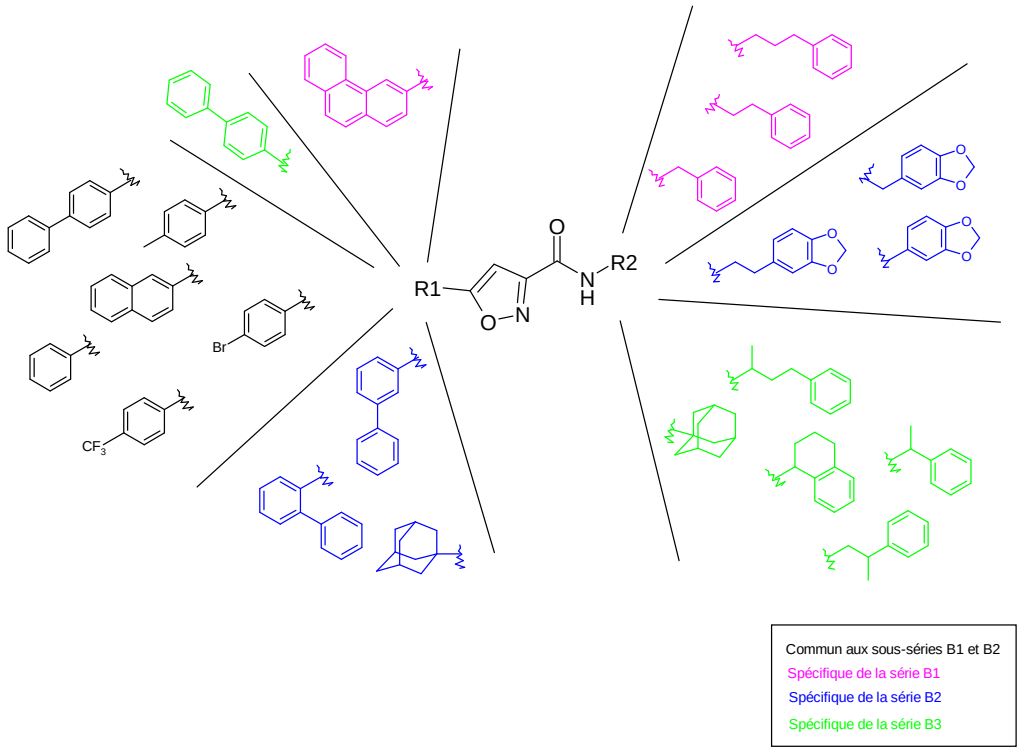


Figure B. 20. Structures générales des composés de la série B

II. 3) De la conception de nouveaux inhibiteurs de la FAAH vers la conception de molécules mixtes, inhibitrices de FAAH, agonistes des récepteurs CB2

On sait aujourd'hui, d'après plusieurs études réalisées *in vivo* et *in vitro,* que le récepteur CB2 joue un rôle important dans la régulation de l'inflammation intestinale. En effet, il a été montré que le JWH015, un agoniste sélectif du récepteur CB2, inhibe la production d'interleukine 8, une cytokine pro-inflammatoire dans la lignée cellulaire HT-29. Cet effet n'a pas été observé avec un agoniste sélectif des récepteurs CB1 et se trouve contrecarré lors de l'ajout d'un agoniste CB2.[283] Plus récemment, d'autres études ont démontré la capacité du JWH133, un autre agoniste sélectif des récepteurs CB2, à diminuer l'inflammation du côlon dans des modèles murins de colites induites par différents agents irritants comme l'huile de moutarde, le DSS ou encore le TNBS.[284,285] Enfin, il apparaît que l'agoniste sélectif du récepteur CB2 AM1241 possède un effet

[283] Ihenetu K., Molleman A., Parsons M. E., Whelan C. J. Inhibition of interleukin-8 release in the human colonic epithelial cell line HT-29 by cannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.,* **2003,** *458,* 207-215

[284] Kimball E. S., Schneider C. R., Wallace N. H., Hornby P. J. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.,* **2006,** *291,* 364-371

[285] Storr M. A., Keenan C. M., Zhang H., Patel K. D., Makriyannis A., Sharkey K. A. Activation of the cannabinoid 2 receptor (CB2) protects against experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.,* **2009,** *15,* 1678-1685

protecteur contre la colite induite à des souris par transfert de cellules T invalidées génétiquement pour la sous-unité $G_{\alpha12}$.[286]

Ces nombreuses études permettent de conclure quant au fait que le récepteur CB2 est également, comme la FAAH, une cible thérapeutique de choix dans le traitement des MICI.

Aussi, dans la conception de la série B', nous avons envisagé le développement de molécules mixtes, inhibitrices de la FAAH, agonistes des récepteurs CB2.

Cette série est née à partir de deux molécules initiales : le composé **110** possédant une activité FAAH (CI_{50} = 500 nM), mais pas d'activité CB2 (Ki > 3000 nM) et le composé **117** se liant au récepteur CB2 (Ki = 197 nM) mais ne présentant pas de propriétés inhibitrices vis-à-vis de la FAAH.

110	**117**
FAAH : CI_{50} = 500 nM	FAAH : CI_{50} > 1000 µM
CB2 : Ki > 3000 nM	CB2 : Ki = 197 nM

Figure B. 21. Molécules à l'origine de la conception de la série B'

Ces composés diffèrent uniquement par la présence d'une chaîne *O*-pentyle sur le phényle en C5 de l'isoxazole. Cette longueur de chaîne avait été initialement choisie car elle s'était révélée indispensable dans de nombreuses études établies au laboratoire portant sur les RSA de composés agonistes des récepteurs CB2.[287,288]

[286] Ziring D. A., Braun J. AM1241, a CB2-specific agonist protects against immune but not acute colitis. *Gastroenterology,* **2007,** *132,* A232

[287] Stern E., Muccioli G. G., Millet R., Goossens J. F., Farce A., Chavatte P., Poupaert J. H., Lambert D. M., Depreux P., Hénichart J. P. Novel 4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide derivatives as new CB2 cannabinoid receptors agonists: synthesis, pharmacological properties and molecular modeling. *J. Med. Chem.,* **2006,** *49,* 70-79

[288] Stern E., Muccioli G. G., Bosier B., Hamtiaux L., Millet R., Poupaert J. H., Hénichart J. P., Depreux P., Goossens J. F., Lambert D. M. Pharmacomodulations around the 4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamides, a class of potent CB2-selective cannabinoid receptor ligands: consequences in receptor affinity and functionality. *J. Med. Chem.,* **2007,** *50,* 5471-5484

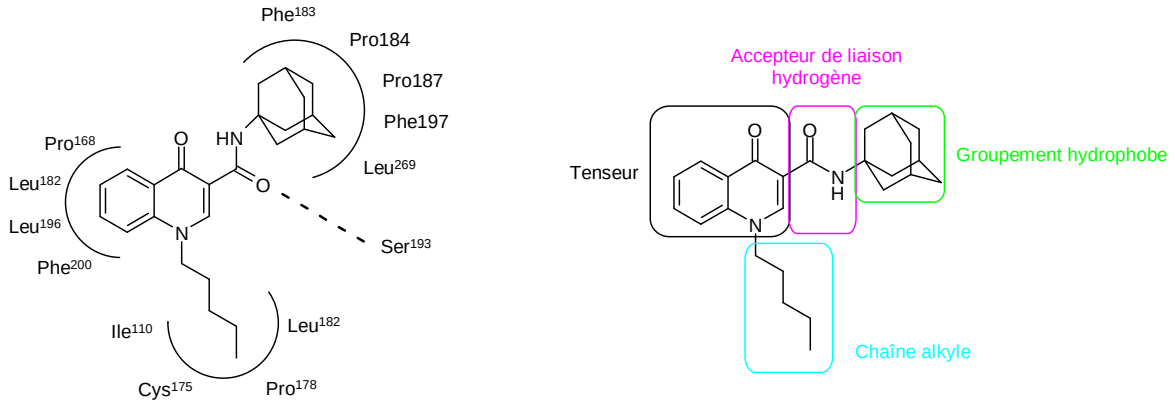


Figure B. 22. Pharmacophore CB2 mis au point au laboratoire

Aussi, dans le premier temps de notre conception, nous nous appliquerons à vérifier que, pour nos molécules, la chaîne pentyle est également la longueur optimale pour l'activité en synthétisant l'homologue inférieur (*O*-butyle) et l'homologue supérieur (*O*-hexyle) de la molécule **117**.

Puis, nous étudierons si la position ortho de la chaîne *O*-pentyle sur le noyau phényle a une influence sur l'activité des composés en envisageant les analogues de positions méta-*O*-pentyle et para-*O*-pentyle.

Nous vérifierons ensuite l'importance de la présence du noyau phényle portant le groupement $-OC_5H_{11}$, en greffant directement la chaîne pentyle sur la position C5 de l'isoxazole.

Des études menées antérieurement au laboratoire, ont montré que la présence d'une chaîne pentyle est nécessaire à l'activité CB2 mais, d'après le composé **117**, néfaste à l'activité FAAH. Nous devrons alors trouver une longueur de chaîne optimale permettant à nos composés de garder une activité inhibitrice de FAAH tout en se liant au récepteur CB2. C'est pourquoi nous réaliserons la synthèse des composés, *O*-méthyle, *O*-éthyle et *O*-propyle.

Enfin, nous ferons varier la nature du groupement porté par l'azote de la fonction amide. L'adamantane avait été initialement choisi pour les mêmes raisons que la chaîne O-pentyle : ce groupement s'était révélé optimal pour l'activité des agonistes CB2 de type 4-oxo-1,4-dihydroquinoléine-3-carboxamides synthétisés antérieurement au laboratoire. Aussi, afin de vérifier que dans notre cas le groupement adamantyle est également optimal pour l'activité, nous le remplacerons par d'autres groupements aliphatiques et aromatiques.

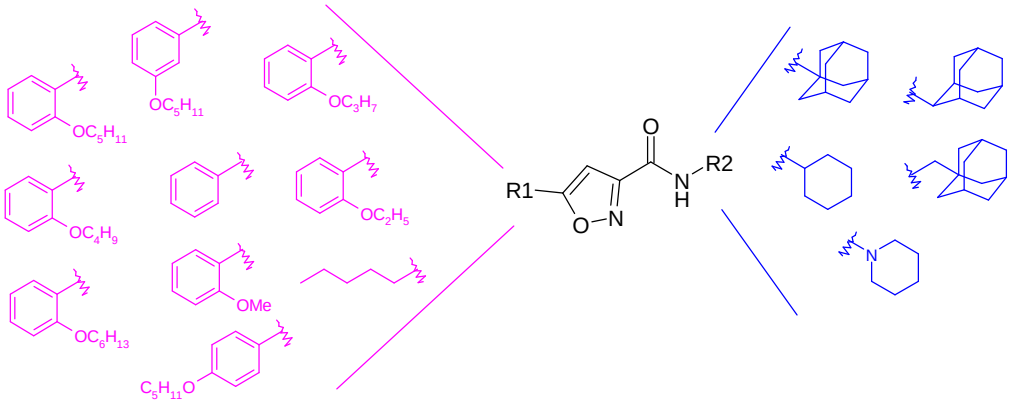


Figure B. 23. Structures des composés de la série B'

B. III) Sélection de composés par criblage virtuel : série C

III. 1) Choix de la chimiothèque

Afin de développer de nouvelles molécules originales, nous avons effectué un criblage virtuel sur la chimiothèque du laboratoire de chimie thérapeutique dirigé par le Pr. Pascal Berthelot.

Ainsi, à partir d'une banque de 1998 produits, nous avons sélectionné 892 molécules libres d'exploitation dont 96 sulfonamides, 10 sulfones, 357 benzoxazoles et 24 carbamates. Ces composés ont été choisis pour leur groupement carbonyle électrophile susceptible d'interagir avec la sérine 241 de la FAAH.

III. 2) Docking

Les 892 produits sélectionnés ont ensuite été modélisés dans le site actif de la FAAH en utilisant une méthode de docking déterministique.

Par opposition aux méthodes systématique et empirique qui recherchent respectivement toutes les conformations et uniquement la conformation de plus basse énergie, la méthode déterministique permet de rechercher des conformations en imposant une ou plusieurs contraintes au logiciel.

Le programme que nous avons utilisé pour le docking des molécules est un algorithme génétique qui consiste à générer plusieurs positionnements de la molécule dans le site. Le logiciel choisit les meilleurs

descendants par sélection naturelle et fournit au bout d'un nombre d'itérations déterminé par l'utilisateur un panel de positionnements préférentiels en termes d'interaction ligand-récepteur et de conformation.

Ainsi, *Gold*, le programme utilisé, nous a permis de sélectionner les 30 meilleurs positionnements des 892 composés issus de la chimiothèque. Ces expériences ont été menées sous le contrôle de 6 ligands jouant le rôle de témoins dont l'affinité pour la FAAH est connue : l'OL-135, le JP-104, l'ATFMK, l'URB597, l'AF-SO_2 et le MAFP.

III. 3) Scoring

Les 30 positionnements obtenus pour chacun des 892 composés ont ensuite été soumis à des expériences de scoring. Lors de cette étape, il s'agit d'effectuer une estimation des interactions ligand-récepteur grâce à différentes fonctions.

Pour le criblage virtuel de nouveaux inhibiteurs de la FAAH, nous avons préalablement sélectionné les positionnements pour lesquels au moins une liaison hydrogène avec la triade catalytique était observable. Parallèlement à cela, nous avons conservé les meilleurs positionnements établis selon l'analyse orthogonale de deux fonctions chimiques différentes.

Afin d'affiner au mieux nos résultats, nous avons également pondéré les fonctions chimiques précédentes par la masse molaire de chaque composé. Au total, nous avons sélectionné le top 4 % des quatre manipulations, soit 54 composés qui ont ensuite été évalués dans un test d'inhibition compétitive de la FAAH.

Grâce à l'approche rationnelle conférée par le criblage virtuel, nous espérons ainsi constater l'émergence d'un lead qui nous servira pour la conception de futures molécules inhibitrices de la FAAH.

C) Stratégies de synthèse

C. I) Stratégies de synthèse employées pour la série A

Les molécules de la série A ont pour site de carbamoylation une fonction urée et s'articulent autour d'un connecteur de type 4-aminopipéridine. Ce connecteur permet d'envisager deux sous-séries, selon que la fonction urée inclut l'azote intra ou extra-cyclique.

I. 1) Sous-série A1 : fonction urée portée par l'azote intra-cyclique

1. 1) Schéma général

La synthèse des composés **7** à **9** appartenant à la sous-série A1, s'effectue en trois étapes à partir de la 4-*N*-boc aminopipéridine. Dans la première étape, la 4-*N*-boc aminopipéridine réagit avec un isocyanate dans une réaction d'addition nucléophile permettant d'obtenir la fonction urée. Les urées **1** à **3** sont ensuite déprotégées au moyen d'une solution isopropylique saturée en acide chlorhydrique générant ainsi les chlorhydrates **4** à **6**. Ces derniers subissent ensuite une réaction d'amination réductrice avec le 1-naphtaldéhyde pour conduire aux amines désirées qui sont ensuite chlorhydratées.

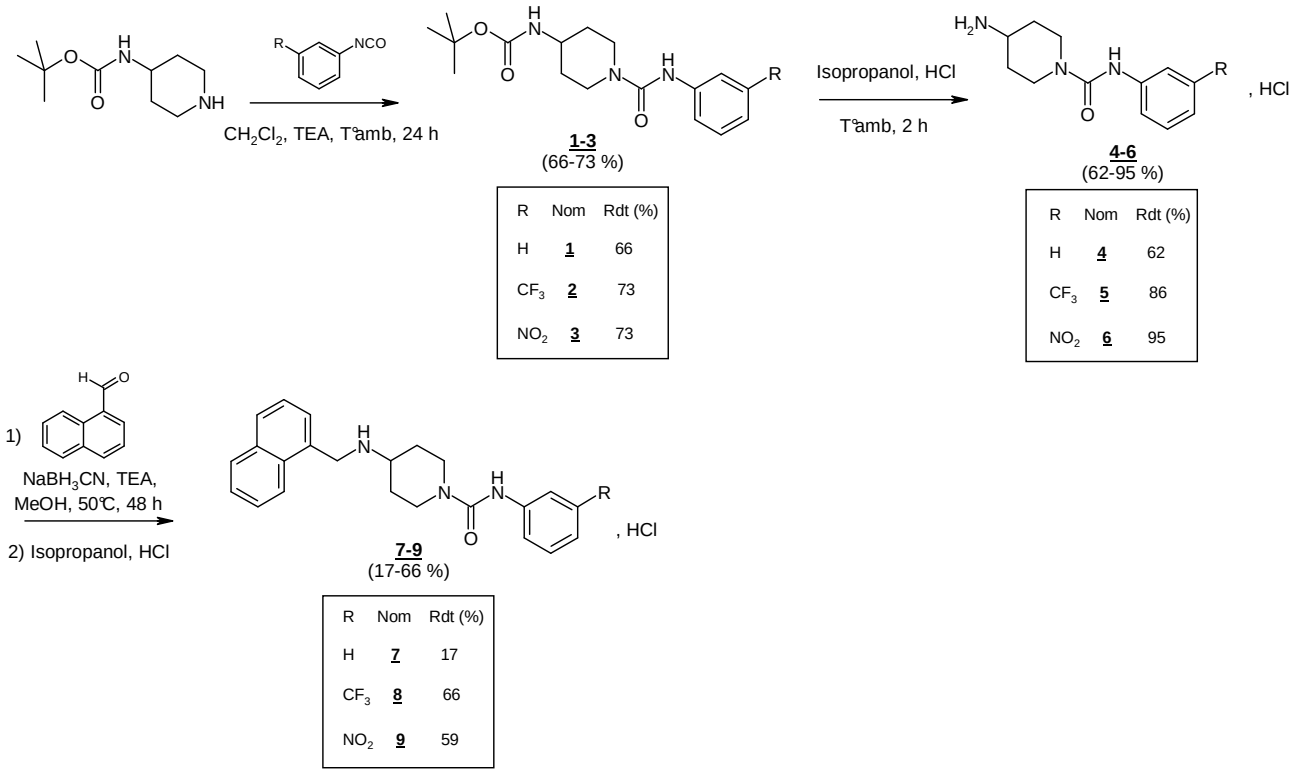


Figure C. 1. Synthèse des composés **7** à **9**

1. 2) Addition de la 4-*N*-boc aminopipéridine sur l'isocyanate

La réaction entre une amine et un isocyanate est une méthode classique permettant de préparer des urées avec un bon rendement. Toutefois, les isocyanates étant des entités très réactives, il est nécessaire de protéger le milieu réactionnel avec une garde à chlorure de calcium.

Nous avons réalisé cette réaction en présence de triéthylamine. Cette base faible permet de catalyser la réaction en formant un complexe bimoléculaire.[289,290]

[289] Baker. J. W., Holdsworth J. B. The mechanism of aromatic side-chain reactions with special reference to the polar effects of substituents. Part XIII. Kinetic examination of the reaction of aryl isocyanantes with methyl alcohol. *J. Chem. Soc.,* **1947,** *19,* 713-726

[290] Pestemer M., Laurer D. Infrared spectroscopic detection of the addition of catalytically active electron donors and acceptors on molecules with polar multiple bonds. *Angew. Chem.,* **1960,** *72,* 612-618

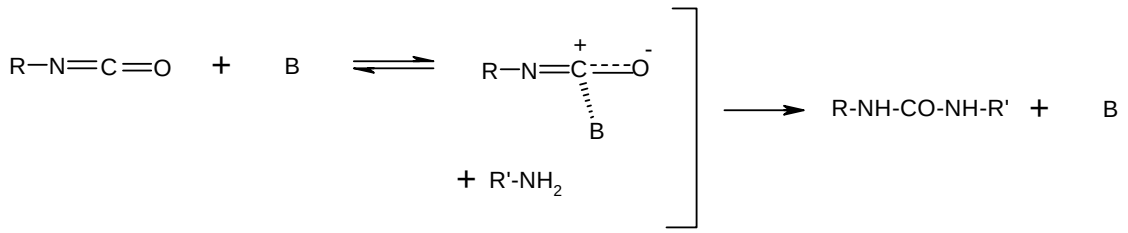


Figure C. 2. Formation du complexe bimoléculaire

Les rendements obtenus lors de cette étape sont relativement bons (supérieurs à 66 %) et homogènes, confirmant que l'addition d'une amine sur un isocyanate est une méthode efficace conduisant à la synthèse d'urées.

1. 3) Déprotection de la fonction amine par une solution isopropylique saturée en acide chlorhydrique

Traditionnellement, les carbamates de *tert*-butoxycarbonyle sont déprotégés au moyen d'une solution d'acide trifluoroacétique. Toutefois, l'utilisation d'une solution isopropylique saturée en acide chlorhydrique est un moyen reconnu permettant à la fois la déprotection et la chlorhydratation de l'amine.

La déprotection du groupement *tert*-butoxycarbonyle s'effectue en milieu acide fort favorisant une élimination de type E_1. Le milieu acide permet de protonner l'oxygène qui devient alors extrêmement électroattracteur. Le groupement *tert*-butyle permet de palier le manque d'électrons de l'oxygène et de générer un carbocation tertiaire ainsi qu'un acide carbamique. Du fait de son instabilité, l'acide carbamique se décarboxyle en même temps que le carbocation se réarrange pour former l'isobutène.

Pour cette étape, les rendements obtenus sont relativement bons et varient de 62 à 95 %. Le moins bon rendement est obtenu pour le composé **4** (R = H). On peut alors penser que l'effet électroattracteur des subtituants portés par le noyau phényle facilite la déprotection par effet électronique. En effet, les composés **5** et **6** étant substitués en méta respectivement par un groupement trifluorométhyle et nitro, sont obtenus avec des rendements de 86 et 95 %.

1. 4) Réaction d'amination réductrice entre les amines **4** à **6** et le 1-naphtaldéhyde

Les composés finaux **7** à **9** sont obtenus par réaction d'amination réductrice des amines **4** à **6** avec le 1-naphtaldéhyde.

L'amination réductrice est une réaction en deux étapes. La première est une addition électrophile suivie d'une élimination d'eau, qui justifie l'utilisation de tamis moléculaire 3 Å. Elle conduit à la formation d'une imine qui, lors de la seconde étape est réduite par le cyanoborohydrure de sodium, permettant de générer la fonction amine.

Les amines obtenues étant des huiles, nous avons souhaité les chlorhydrater afin de faciliter leurs conservations et leurs pesées.

Les rendements obtenus pour cette étape sont variables puisque les composés **7** à **9** sont respectivement générés avec des rendements de 17, 66 et 59 %.

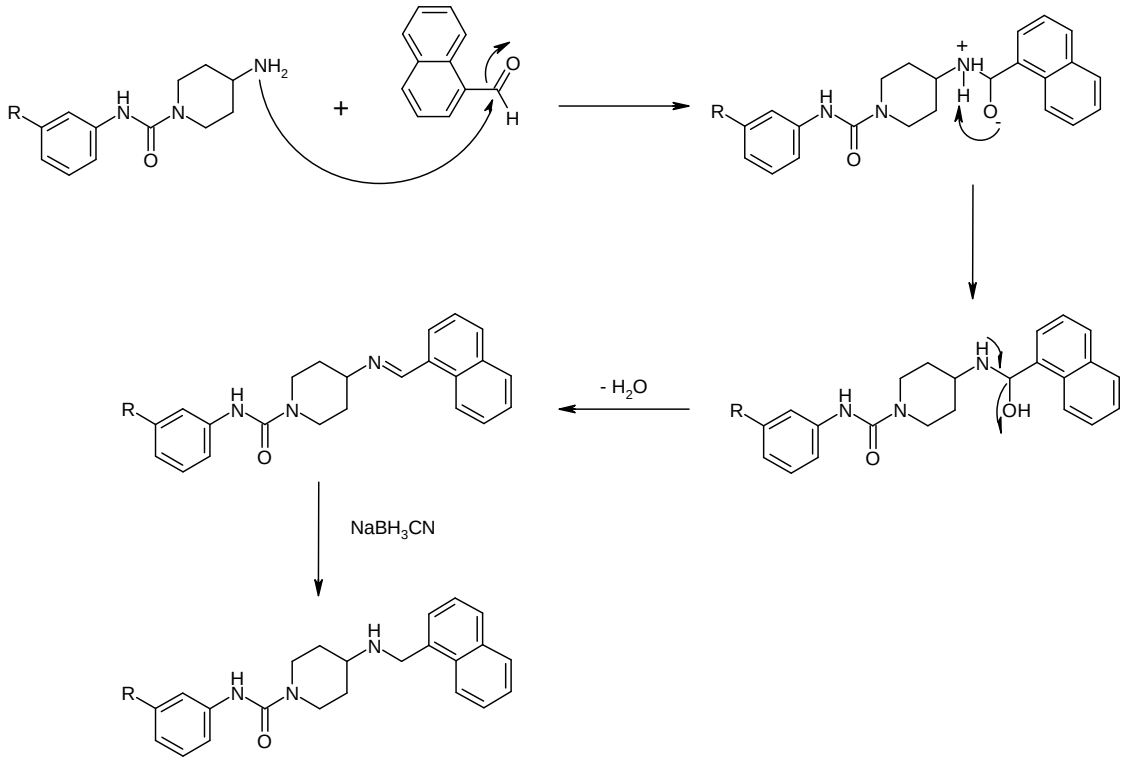


Figure C. 3. Mécanisme de l'amination réductrice

I. 2) Sous-série A2 : fonction urée portée par l'azote extra-cyclique

2. 1) Schéma général

Les composés **10** à **14** appartenant à la sous-série A2, sont obtenus à partir de l'addition de la 4-amino-1-benzylpipéridine commerciale sur différents isocyanates. Ceci, nous permet d'obtenir rapidement des molécules satisfaisant le pharmacophore énoncé précédemment. Le composé **10** a ensuite été débenzylé au moyen de formiate d'ammonuim et en présence de charbon palladié pour générer une amine secondaire qui est chlorhydratée pour donner le composé **15**. Ce dernier est ensuite mis en réaction soit avec le 2-bromométhylnaphtalène pour donner le composé **16,** soit avec le 1-bromopentane pour générer le composé **17**.

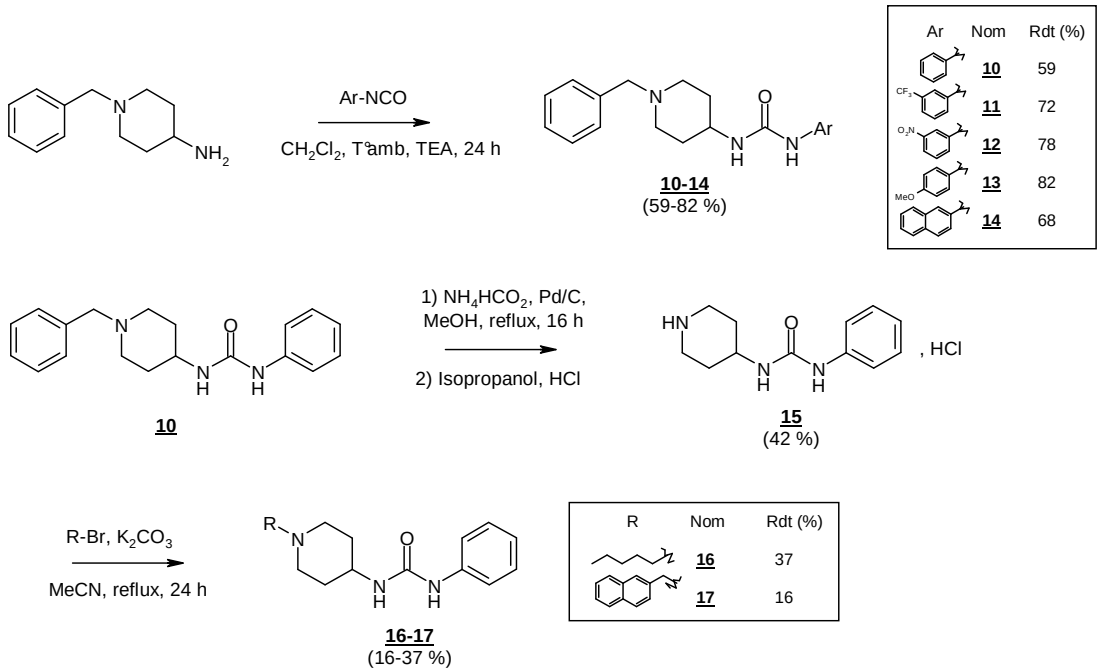


Figure C. 4. Synthèse des composés **10** à **14**, **16** et **17**

L'addition d'une amine sur un isocyanate ayant été décrite précédemment, nous ne détaillerons par la suite que les étapes de déprotection et de substitution nucléophile.

2. 2) Débenzylation du composé **10**

Traditionnellement, la débenzylation se réalise sous hydrogène en présence d'un catalyseur comme le charbon palladié. Dans notre cas, nous avons utilisé du formiate d'ammonium qui permet de générer *in situ* de l'hydrogène. Le gaz va s'adsorber à la surface du catalyseur et s'additionner sur le carbone benzylique.

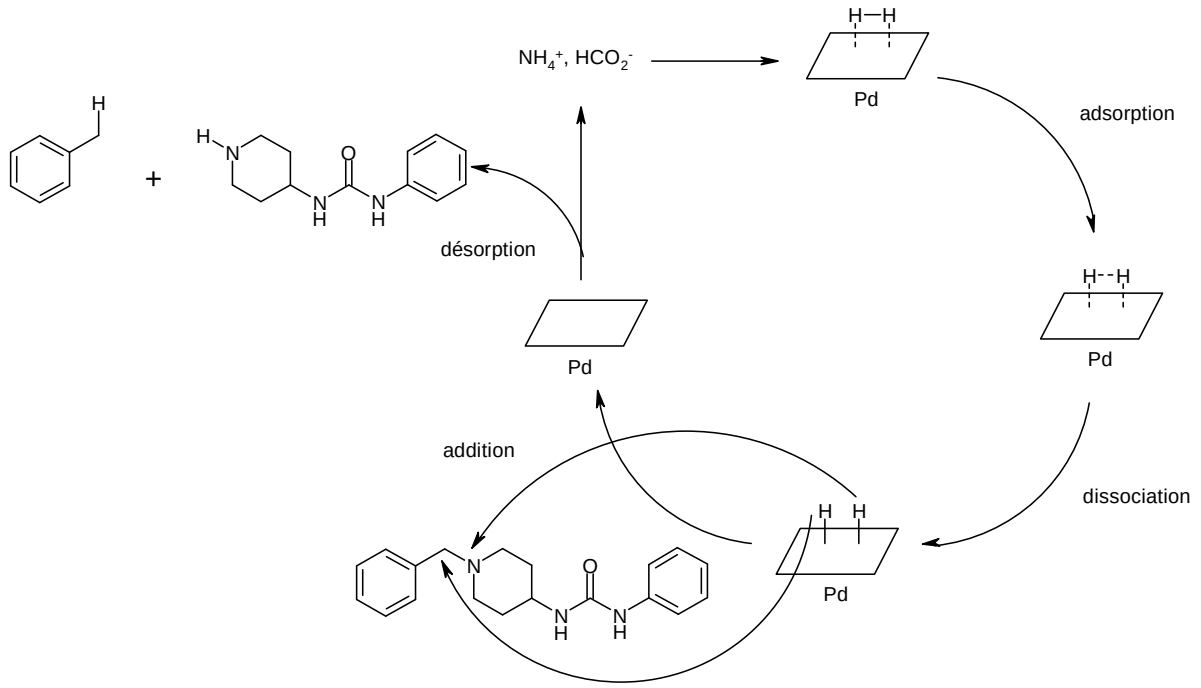


Figure C. 5. Mécanisme de la débenzylation de l'amine **10** par le formiate d'ammonium

Dans un premier temps, l'hydrogène généré par le formiate d'ammonium s'adsorbe à la surface du palladium. Puis, le palladium catalyse la dissociation de la molécule de dihydrogène en hydrogène monoatomique H. L'hydrogène monoatomique s'additionne alors sur la liaison C-N et permet de libérer la fonction amine.

Celle-ci est ensuite chlorhydratée au moyen d'une solution isopropylique saturée en acide chlorhydrique, ce qui nous permet d'obtenir le chlorhydrate **15** avec un rendement moyen (42 %). Il est toutefois à noter que ce rendement n'a pas été optimisé puisque la réaction n'a été effectuée qu'une seule fois.

2. 3) Substitution nucléophile de type 2 (SN_2)

En présence d'une base, le chlorhydrate **15** libère sa fonction amine secondaire alors susceptible de réagir avec différents dérivés halogénés dans une réaction de type SN_2. Ainsi, nous avons mis en réaction le composé **15** avec le 2-bromométhylnaphtalène et le 1-bromopentane, ce qui nous a permis de générer les produits **16** et **17**.

Le mécanisme de la SN_2 est un mécanisme concerté comprenant une étape unique. On observe une attaque en anti du nucléophile qui, dans un premier temps cohabite avec le nucléophuge pour former un intermédiaire non isolable plan. Puis, le nucléophuge est relargué dans le milieu réactionnel, permettant une inversion de Walden, soit, un changement de conformation de la molécule.

Les solvants aprotiques polaires tels que l'acétonitrile, le diméthylformamide et l'acétone favorisent ce type de mécanisme. Toutefois, bien que nous ayons utilisé de l'acétonitrile ainsi que du carbonate de potassium dans le but de libérer la fonction amine chlorhydratée, les rendements obtenus sont faibles (16 % pour le composé **16** et 37 % pour le composé **17**). Ceci peut être dû à l'encombrement stérique des entités mises en réaction ou à la faiblesse de la base employée, qui n'a pas été capable de déplacée d'équilibre vers la forme libre de l'amine.

Au final, les différentes stratégies de synthèse employées nous ont permis de synthétiser dix composés pour la série A. Trois font partie de la sous-série A1 et sept appartiennent à la sous-série A2. Les composés de cette série sont peu nombreux car les voies de synthèse présentées ne sont pas celles qui avaient initialement été envisagées. En effet, avant celles-ci, d'autres voies de synthèses avaient été proposées mais n'ont pas permis d'aboutir aux composés désirés.

Par ailleurs, il est à noter qu'il a été difficile d'optimiser la susbtitution nucléophile terminale présente dans l'une et l'autre sous-série.

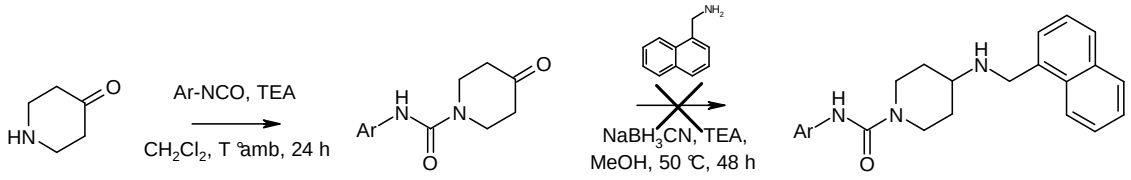


Figure C. 6. Exemple de voie de synthèse initialement envisagée pour la sous-série A1

C. II) Stratégies de synthèse employées pour la série B

Qu'elles appartiennent aux sous-séries B1, B2, B3 ou B', les molécules de la série B, ont un squelette commun s'articulant autour d'un groupement de type 3-carboxamido-5-aryl isoxazole. Seuls les substituants portés par le carbone C5 de l'isoxazole et ceux portés par l'azote de la fonction amide définissent les différentes sous-séries. Aussi, les molécules de la série B suivent toutes le même schéma de synthèse. Toutefois, pour certains composés des séries B2 et B', une étape supplémentaire est nécessaire.

II. 1) Schéma général

La synthèse des amides **84** à **124** appartenant à la série B, s'effectue à partir de cétones aromatiques ou aliphatiques, commerciales ou synthétisées au laboratoire. Celles-ci subissent dans un premier temps une réaction de Claisen en présence d'une base forte et d'oxalate de diéthyle permettant d'obtenir les céto-énols **27** à **45**. L'addition de chlorhydrate d'hydroxylamine sur les céto-énols **27** à **45** permet de générer l'hétérocycle isoxazole et aboutit aux esters **46** à **64**. Ces derniers sont ensuite saponifiés puis engagés dans une réaction de couplage peptidique en présence d'agents de couplage comme HBTU et HOBt pour donner les amides **84** à **123**.

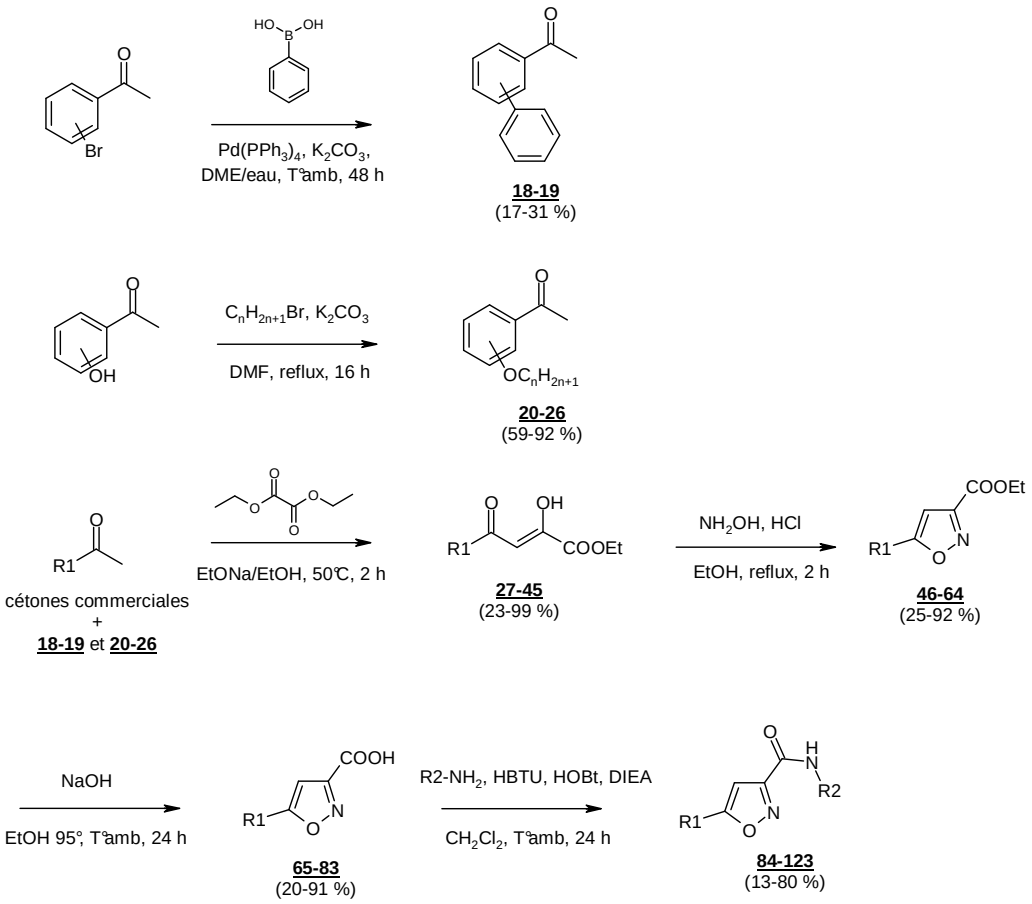


Figure C. 7. Synthèse des amides **84** à **123**

Dans un souci de clarté, les structures des composés seront détaillées plus loin étape par étape, avec les rendements.

*II. 2) Synthèse des composés **18** et **19** par coulage de Suzuki*

Décrit pour la première fois en 1981 par Suzuki, ce type de réaction de couplage permet la création d'une liaison carbone-carbone. Il s'effectue généralement entre un aryle halogéné et un acide arylboronique en présence d'un catalyseur au palladium (Pd^0) et d'une base.

Plus récemment, les conditions réactionnelles mises en œuvre ont fait l'objet de nombreuses modifications et ont permis d'élargir considérablement les applications possibles. Ainsi, cette réaction ne se limite plus seulement aux aryles mais s'applique également aux alkyles, alkenyles et alkynyles. Les organotrifluoroborates de potassium ou encore les esters boroniques se sont avérés de très bons substituts

des acides organoboroniques. Les dérivés halogénés peuvent également être remplacés par des dérivés présentant d'autres bons groupements partants comme les triflates. Un grand nombre de bases et de catalyseurs sont également disponibles pour faire ce type de réaction.

Le mécanisme de la réaction de Suzuki est un cycle catalytique comprenant trois étapes.

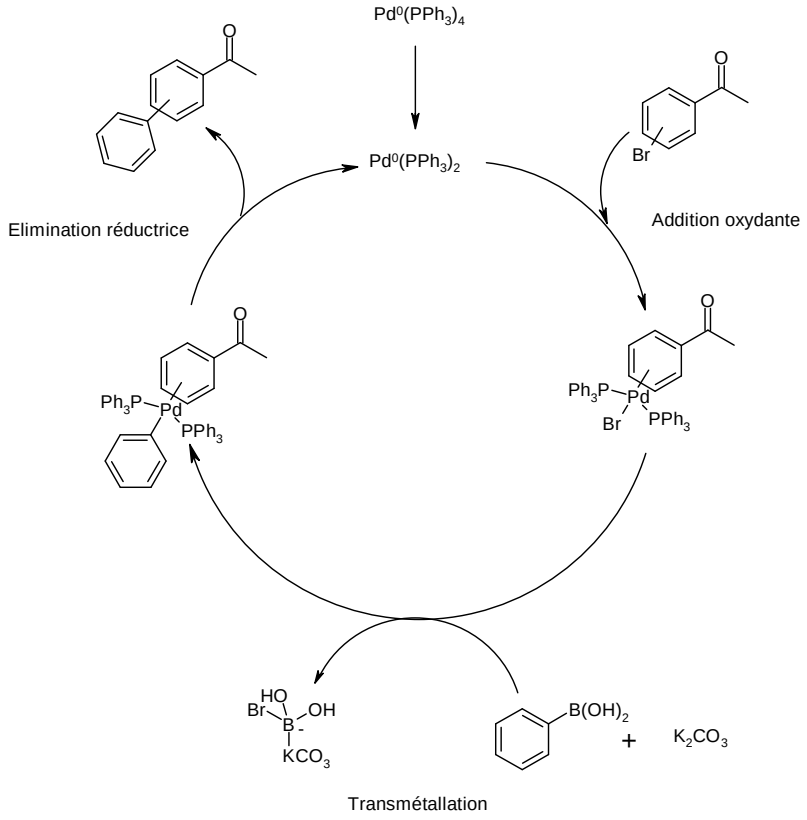


Figure C. 8. Mécanisme de la réaction de Suzuki

Après être passé sous sa forme $Pd(PPh_3)_2$, le palladium tétrakis s'additionnerait de manière oxydative sur le dérivé halogéné. Puis, lors de la transmétallation, l'acide boronique réagirait avec le carbonate de potassium en permettant au noyau phényle de s'intégrer au complexe cétone aromatique-catalyseur. Enfin, l'étape terminale d'élimination réductrice permet la création de la liaison carbone-carbone et la régénération du catalyseur.

Les acides boroniques étant solubles en milieu aqueux, nous avons utilisé un mélange eau/DME (1 : 1) pour effectuer notre réaction. Toutefois, les rendements obtenus pour cette étape sont faibles (17 à 31 %) et sûrement dus à la déshalogénation de la bromo-acetophénone.

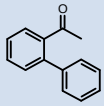
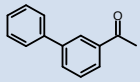
Nom	18	19
Structure		
Rendement (%)	31	17

Tableau C. 1. Structures et rendements des composés **18** et **19**

*II. 3) Réaction de O-alkylation : synthèse des composés **20** à **26***

En présence d'un dérivé halogéné et d'une base, les alcools phénoliques sont susceptibles d'effectuer une réaction de *O*-alkylation. La *O*-alkylation est une réaction de substitution nucléophile de type 2 et a été réalisée de manière classique, dans un solvant aprotique polaire, le DMF, en présence d'une base inorganique, le carbonate de potassium. Les rendements obtenus pour les composés **20** à **26** sont relativement bons (> 59 %).

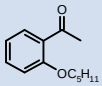
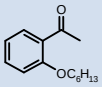
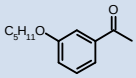
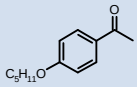
Nom	20	21	22	23	24	25	26
Structure							
Rendement (%)	82	84	78	65	59	90	92

Tableau C. 2. Structures et rendements des composés **20** à **26**

*II. 4) Synthèse des composés **27** à **45** par réaction de Claisen*

La première étape commune de la synthèse des amides **84** à **123** est la formation d'une dicétone obtenue sous sa forme tautomère céto-énolique à partir de cétones commerciales ou précédemment synthétisées au

laboratoire. Il s'agit d'une réaction de Claisen faisant intervenir l'oxalate de diéthyle et l'éthanolate de sodium.[291]

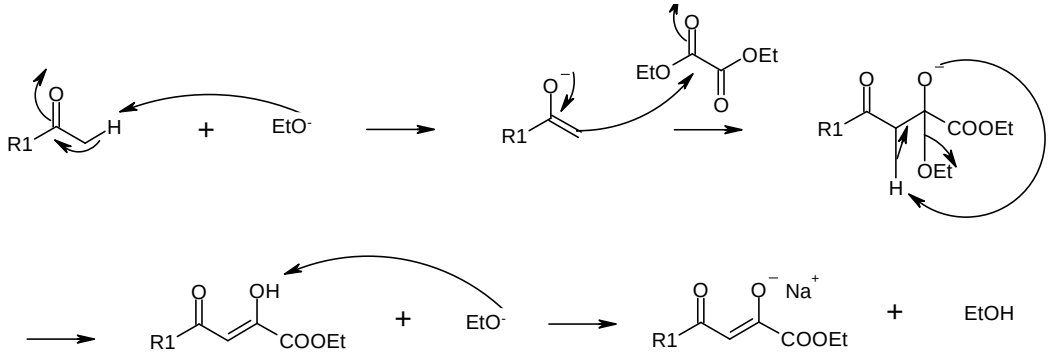
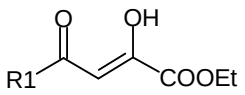


Figure C. 9. Mécanisme de la réaction de Claisen

Dans ce mécanisme, l'éthanolate de sodium arrache l'un des protons en alpha de la cétone aromatique générant ainsi l'énolate qui peut alors attaquer l'un des carbones électrophiles de l'oxalate de diéthyle. L'espèce chimique néoformée n'a alors plus qu'à se réarranger pour donner les céto-énolates de sodium qui sont ensuite réacidifiés au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique 1N.

Les rendements obtenus pour cette étape, bien que bons dans l'ensemble, varient en fonction de plusieurs paramètres. Globalement, les composés possédant des groupements électroattracteurs qui permettent d'augmenter l'acidité des protons en alpha se synthétisent avec de meilleurs rendements. C'est le cas du composé **44** (R1 = *p*-trifluorométhylphényle) qui a été obtenu de manière quantitative.

[291] Jiang X. H., Song L. D., Long Y. Q. Highly efficient preparation of aryl β-diketo acids with *tert*-butyl methyl oxalate. *J. Org. Chem.,* **2003,** *68,* 7555-7558



Nom	27	28	29	30	31	32	33
R1			OMe	OC_2H_5	OC_3H_7	OC_4H_9	OC_5H_{11}
Rendement (%)	37	83	74	90	59	33	62

Nom	34	35	36	37	38	39	40
R1	OC_6H_{13}	$C_5H_{11}O$	$C_5H_{11}O$			Br	
Rendement (%)	31	31	23	53	75	74	78

Nom	41	42	43	44	45
R1				F_3C	
Rendement (%)	85	74	57	99	45

Tableau C. 3. Structures et rendements des composés **27** à **45**

A l'inverse, des composés substitués par des groupements électrodonneurs sont généralement obtenus avec de moins bons rendements. C'est le cas du composé **43** (R1 = *p*-tolyl) obtenu avec un rendement de 57 % et de manière générale, des composés de la série B' possédant une chaîne éther. Ajoutons à cela, la présence d'une chaîne *O*-alkyle stériquement volumineuse, il est donc normal que ces composés soient obtenus avec des rendements de l'ordre de 30 %.

Le composé **37** (R1 = pentyle) a quant à lui été obtenu avec un rendement moyen, de l'ordre de 50 %. Ceci peut s'expliquer par le fait que la 2-heptanone possède deux sites d'attaque pour les protons en alpha. On observe alors la formation d'un produit secondaire.

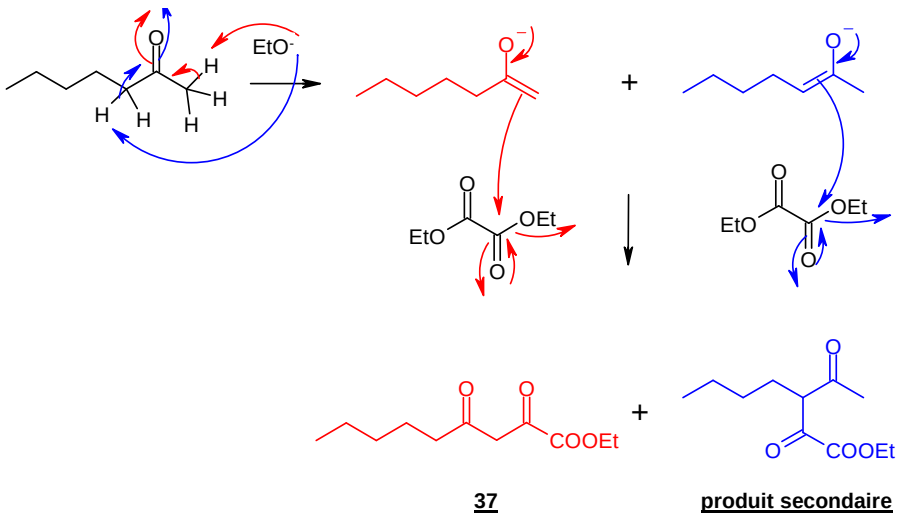


Figure C. 10. Mécanisme de la formation du produit secondaire accompagnant le composé **37**

Enfin, le composé **45** (R1 = 1-adamantyle) est obtenu avec un rendement de 45 %. Ce taux de conversion moyen est sans doute dû à l'encombrement stérique généré par le groupement 1-adamantyle.

*II. 5) Cyclisation en isoxazole : obtention des produits **46** à **64***

En solution, le chlorhydrate d'hydroxylamine est en équilibre avec la forme libre de l'amine. Lorsqu'il est ajouté aux dicétones **27** à **45** obtenues précédemment, il permet de générer l'hétérocycle isoxazole par le biais du mécanisme suivant[292, 293] :

[292] Pei Y., Wickham B. O. S. Regioselective syntheses of 3-aminomethyl-5-substituted isoxazoles: a facile and chemoselective reduction of azide to amine by sodium borohydride using 1,3-propanedithiol as a catalyst. *Tetrahedron Lett.,* **1993,** *34,* 7509-7512

[293] Zeng L. F., Zhang H. S., Wang Y. H., Sanchez T., Zheng Y. T., Neamati N., Long Y. Q. Efficient synthesis and utilization of phenyl-substituted heteroaromatic carboxylic acids as aryl diketo acid isosteres in the design of novel HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2008,** *18,* 4521-4524

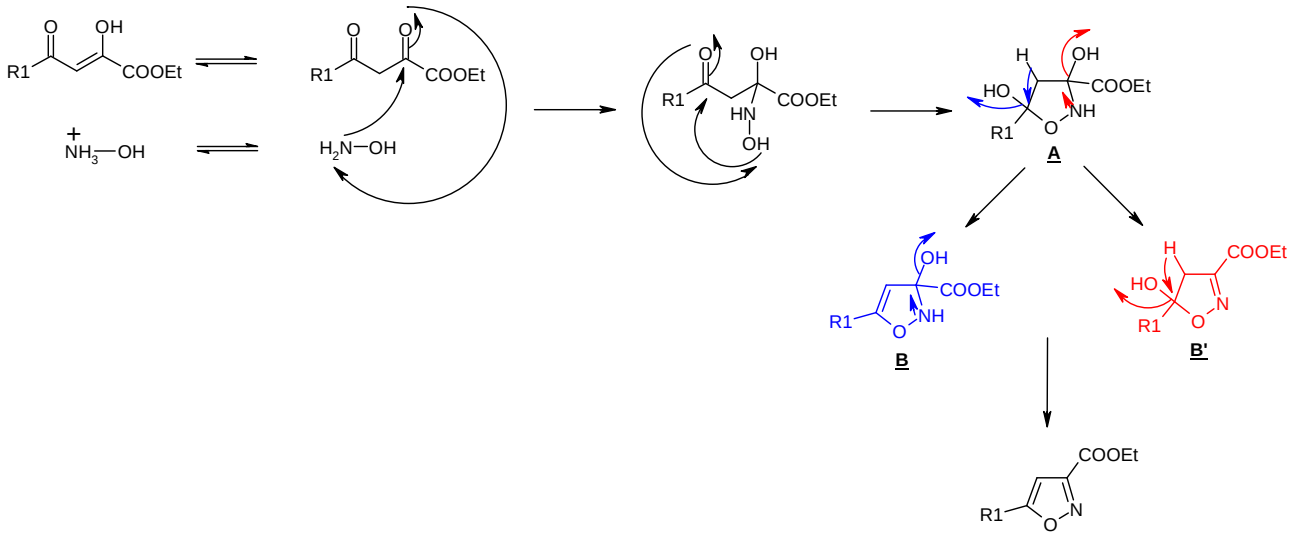


Figure C. 11. Mécanisme de la cyclisation en isoxazole

La formation de l'hétérocycle isoxazole passe par une double déshydratation de l'intermédiaire **A**. Ainsi, la déshydratation peut d'abord être effectuée en 4,5 et générer l'intermédiaire **B** ou en 2,3 et aboutir au composé **B'**.

La cyclisation de nos dicétones en isoxazole a été suivie par chromatographie, ce qui nous a permis de remarquer que, dans nos conditions, cette réaction n'était pas totale. En effet, quelque soit le substituant R1, les isoxazoles attendus étaient accompagnés d'un produit secondaire, dont la masse correspondait à la masse du produit attendu + 18 g. mol^{-1}, soit la masse des alcools **B** et **B'**. Afin de déterminer lequel des alcools **B** ou **B'** accompagnait nos composés **46** à **64**, nous avons, pour l'isoxazole **57** (R1 = phényle), isolé le produit secondaire par « Flash Chromatography » et nous l'avons caractérisé en RMN. L'analyse du spectre proton a révélé la présence d'un CH_2 non-équivalent, observable lorsqu'un groupement méthylène se trouve en alpha d'un carbone asymétrique. Le produit secondaire accompagnant nos isoxazoles **46** à **64** est donc l'alcool **B'**.

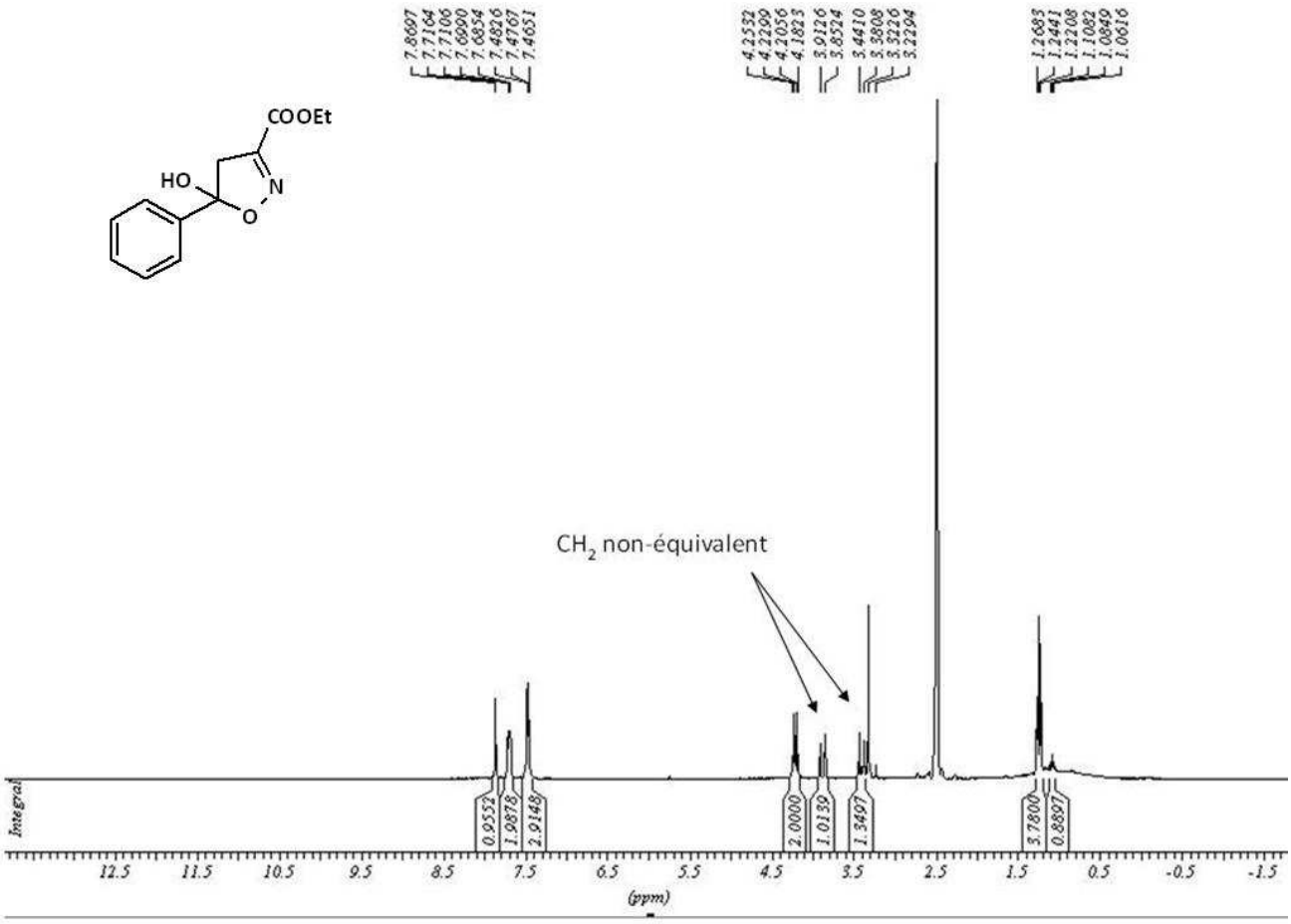


Figure C. 12. Spectre RMN de l'alcool B' obtenu pour R1 = phényle

Afin d'optimiser la réaction, nous avons ensuite souhaité modifier nos conditions réactionnelles. Ainsi, la cyclisation de la dicétone **38** en isoxazole **57** a été effectuée à pH basique, en présence de trois équivalents de diéthlyisopropylamine, et à pH acide, sous un montage de Deen-Stark, en présence de trois équivalents d'acide para-toluène sulfonique (APTS).

En condition basique, nous ne sommes pas parvenus à obtenir le composé **57**. En revanche, nous avons constaté la formation d'un produit secondaire. Comme précédemment, nous l'avons isolé puis analysé par RMN. Le spectre proton a révélé que l'échantillon contenait en fait un mélange de deux produits. Le mélange a ensuite été passé en LC-MS et nous avons observé la présence de deux produits dont les masses correspondaient à la masse du produit **57** + 18 g.mol^{-1}. Nous avons alors supposé que les conditions basiques permettaient d'obtenir les alcools **B** et **B'**. Pour confirmer notre hypothèse, le mélange a été séparé par le Dr. Emmanuelle Lipka, au laboratoire de chimie analytique, par chromatographie liquide haute performance (CLHP). La séparation a nécessité l'utilisation d'une colonne de type Daicel Chiralcel OD-H et d'un éluant

composé d'un mélange hexane / éthanol (90 :10). Deux pics on alors été observés : l'un à 8.90 min et l'autre à 12.55 min. Chacun des produits a ensuite pu être isolé puis caractérisé par RMN. Ainsi, le produit sortant à 8.90 min s'est révélé être l'alcool **B** et celui sortant à 12.55 min, l'alcool **B'**.

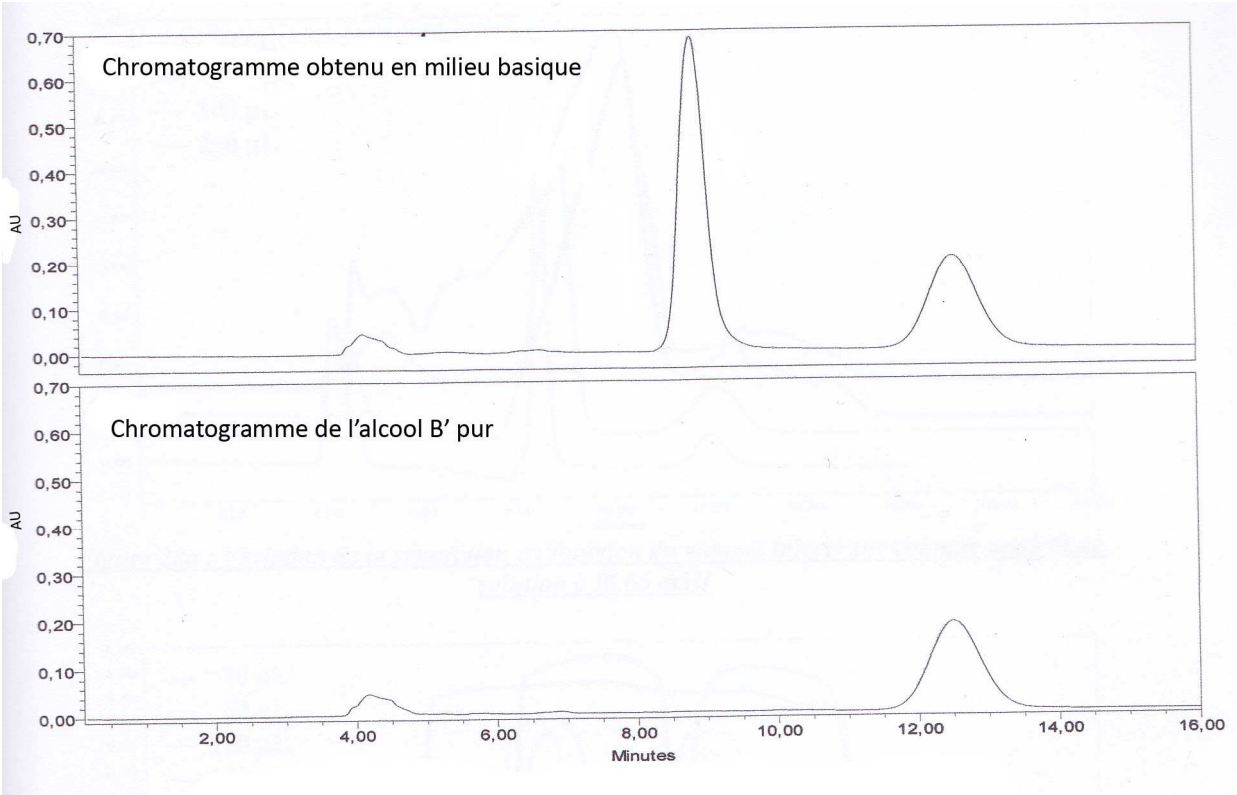


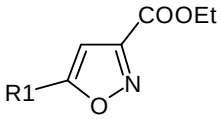
Figure C. 13. Chromatogramme des alcools **B** et **B'**

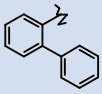
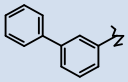
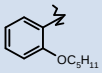
Les conditions basiques n'améliorent donc pas le rendement de la réaction puisque, dans ces conditions, l'isoxazole **57** ne s'est pas formé, mais permet de synthétiser les 4,5- et 2,3-dihydro-hydroxyisoxazoles, qui jusqu'à lors, n'ont jamais été rapportés.

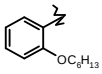
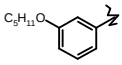
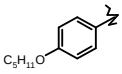
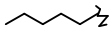
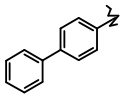
En condition acide, le suivi par chromatographie n'a pas révélé la présence de produits secondaires. Ceci était prévisible car les conditions utilisées (APTS et montage de Deen-Stark permettant l'élimination d'eau par distillation) favorisent la déshydratation. Toutefois, si le produit **57** a été obtenu seul avec un rendement amélioré de 13 % par rapport aux conditions initiales, sa conservation s'est vue altérée et le produit s'est rapidement dégradé. C'est pourquoi, nous avons choisi, pour la suite de nos expériences de conserver nos conditions initiales qui permettent d'obtenir les isoxazoles avec des rendements corrects. De plus, il n'est pas nécessaire de séparer l'isoxazole de son alcool **B'** par chromatographie : une recristallisation dans l'éthanol permet d'obtenir l'isoxazole pur.

Afin de vérifier que nos observations à propos de la formation de l'isoxazole et de ses dérivés 4,5- et 2,3-dihydro-hydroxyisoxazoles, n'étaient pas sous l'influence des effets électroniques du substituant R1, nous avons ensuite exemplifié nos conditions à différents groupements. Nos observations se sont trouvées récurrentes et ont ensuite pu faire l'objet d'une publication.

Pour cette étape, les isoxazoles **46** à **64** ont été obtenus avec des rendements allant de 25 à 92 %.



Nom	46	47	48	49	50	51	52
R1							
Rendement (%)	74	60	74	29	65	54	38

Nom	53	54	55	56	57	58	59
R1							
Rendement (%)	53	27	60	25	82	85	87

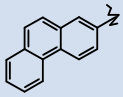
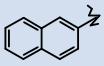
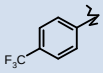
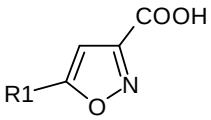
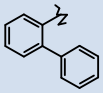
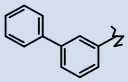
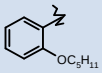
Nom	60	61	62	63	64
R1					
Rendement (%)	90	92	86	73	85

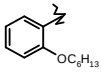
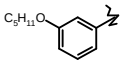
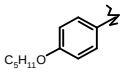
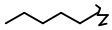
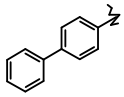
Tableau C. 4. Structures et rendements des composés **46** à **64**

*II. 6) Saponification et obtention des acides **65** à **83***

La saponification des esters **46** à **64** a été réalisée à température ambiante en présence d'un excès de soude (10 équivalents) et a permis d'obtenir les acides **65** à **83** avec des rendements allant de 20 à 91 %.



Nom	65	66	67	68	69	70	71
R1							
Rendement (%)	88	75	68	45	69	71	55

Nom	72	73	74	75	76	77	78
R1							
Rendement (%)	20	60	74	65	79	83	61

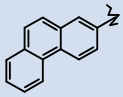
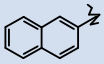
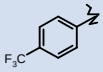
Nom	79	80	81	82	83
R1					
Rendement (%)	84	84	91	87	41

Tableau C. 5. Structures et rendements des composés **65** à **83**

Les acides sont obtenus sous forme de carboxylates après que l'anion hydroxyde ait attaqué le carbonyle de l'ester. Afin d'obtenir les acides **65** à **83** sous leur forme –COOH, nous avons ensuite évaporé l'éthanol et repris les résidus dans une solution d'acide chlorhydrique 1N. Les rendements obtenus sont corrects sauf pour l'acide **72** qui a été obtenu avec un taux de conversion de seulement 20 %. Ceci peut être expliqué par la gêne stérique occasionnée par la chaîne *n*-hexyle.

*II. 7) Couplage de type peptidique, obtention des amides finaux **84** à **123***

Une réaction d'amidification réalisée entre les acides **65** à **83** et les amines désirées en présence des agents de couplage HBTU et HOBt nous a permis d'obtenir les amides terminaux **84** à **123** avec des rendements variables (13 - 80 %). Le mécanisme de la réaction est le suivant :

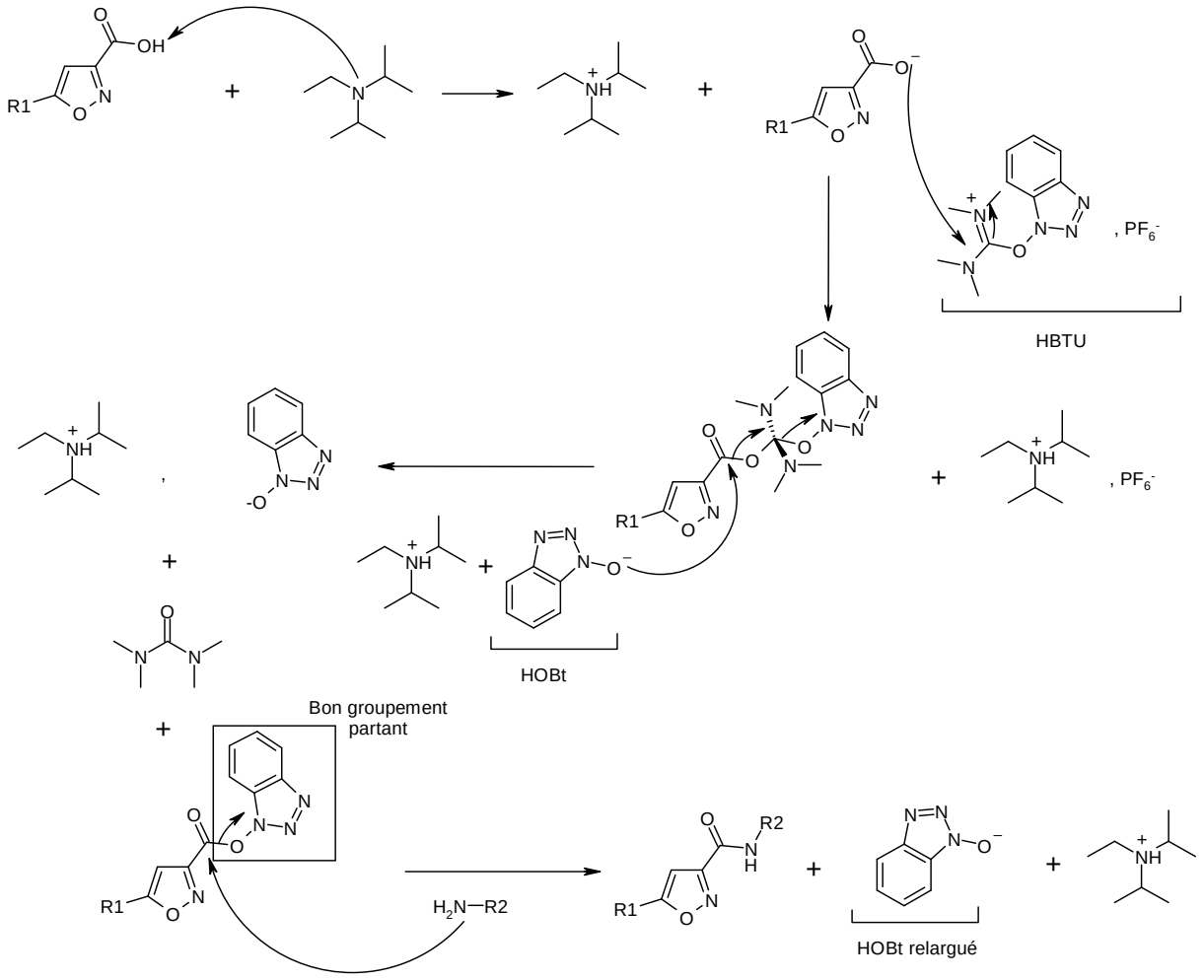


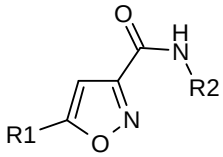
Figure C. 14. Mécanisme de la réaction de couplage de type peptidique réalisée en présence des agents HBTU et HOBt

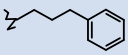
Dans ce mécanisme, l'agent de couplage HBTU joue le rôle d'activateur de l'acide en générant un ester activé, susceptible de réagir avec l'HOBt. Un autre ester activé possédant un excellent groupement partant, l'HOBt, est alors formé puis couplé avec les amines désirées. Cette ultime étape permet de régénérer l'HOBt qui peut ainsi être introduit en quantité catalytique.

Pour certains composés, cette méthode classique de couplage ne s'est pas révélée efficace puisque les amides ont été obtenus avec de faibles rendements. Nous avons alors tenté d'optimiser la réaction en modifiant nos conditions paramètre par paramètre.

Ainsi, suite à l'observation de la dégradation des acides après l'addition de la DIEA, nous avons dans un premier temps remplacé la DIEA par de la triéthylamine. Ceci n'ayant pas permis de réaliser la réaction dans de meilleures conditions, nous avons ensuite choisi de remplacer l'HBTU par un autre agent de couplage, l'EDCI. Là encore, nos efforts se sont révélés infructueux.

Le remplacement du dichlorométhane par d'autres solvants comme le DMF ou le chloroforme n'a pas permis d'aboutir aux composés désirés avec de meilleurs rendements. Enfin, nous avons modifié la température de la réaction et il semble que pour certains composés, comme les composés **105** à **109**, l'addition des réactifs à froid (T° = -2 °C) permette à la réaction de s'effectuer dans de meilleures conditions.



	Nom	R1	R2	Rendement (%)
Série B1	**84**			67

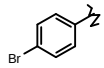
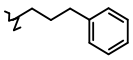
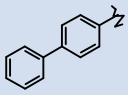
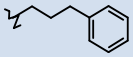
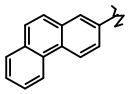
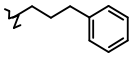
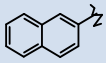
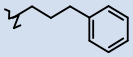
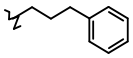
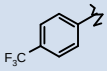
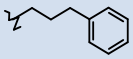
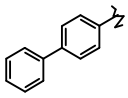
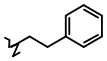
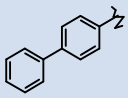
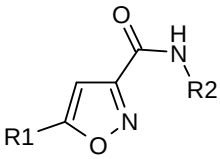
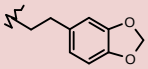
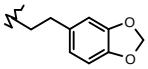
	85			63
	86			52
	87			72
	88			47
	89			80
	90			55
	91			26
	92			31

Tableau C. 6. Structures et rendements des composés de la sous-série B1 (**84** à **92**)



	Nom	R1	R2	Rendement (%)
Série B2	**93**			65
	94			68

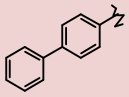
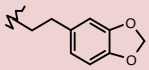
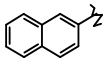
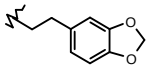
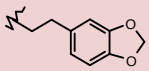
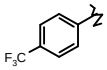
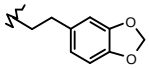
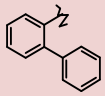
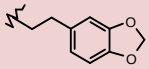
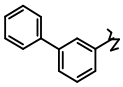
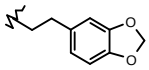
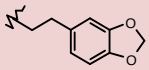
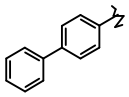
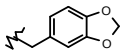
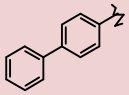
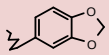
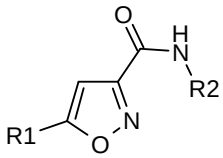
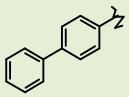
	95			72
	96			31
	97			45
	98			38
	99			18
	100			64
	101			13
	102			17
	103			13

Tableau C. 7. Structures et rendements des composés de la sous-série B2 (**93** à **103**)



	Nom	R1	R2	Rendement (%)
Série B3	104			42

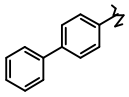
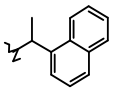
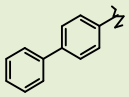
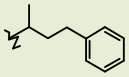
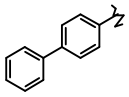
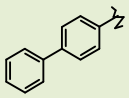
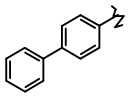
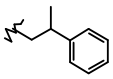
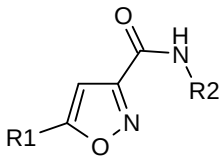
	105			63
	106			25
	107			56
	108			75
	109			51

Tableau C. 8. Structures et rendements des composés de la sous-série B3 (**104** à **109**)



	Nom	R1	R2	Rendement (%)
Série B'	**110**			52

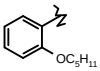
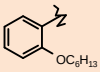
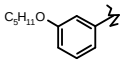
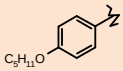
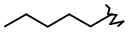
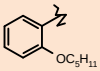
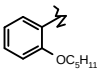
111			51
112			34
113			13
114			24
115			29
116			36
117			65
118			38
119			59
120			47
121			37
122			21
123			27

Tableau C. 9. Structures et rendements des composés de la sous-série B' (**110** à **123**)

Au final, la méthode de synthèse employée nous a permis de synthétiser 40 amides qui ont été ou qui seront prochainement testés en tant qu'inhibiteurs de la FAAH. Pour le meilleur de nos composés, des expériences *in vivo* sur un modèle murin de colite ainsi que des études de stabilité en milieu hépatique ont été réalisées.

Par ailleurs, nous avons également étudié la réaction du chlorhydrate d'hydroxylamine sur une dicétone et nous avons ainsi pu décrire en détail le mécanisme de cette réaction. De plus en réalisant cette manipulation

dans différentes conditions de pH, nous avons pu synthétiser les 2,3- et 4,5-dihydro-hydroxyisoxazoles qui, à ce jour, n'avaient encore jamais été décrits dans la littérature.

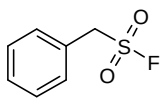
D) Evaluations pharmacologiques

D. I) Evaluations pharmacologiques *in vitro*

I. 1) Mesure de l'activité inhibitrice vis-à-vis de la FAAH

1. 1) Description du protocole

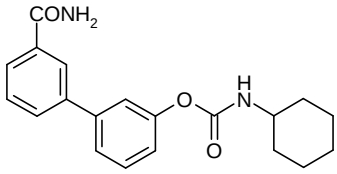
Les mesures d'activités inhibitrices vis-à-vis de la FAAH (valeur de CI_{50}) ont été réalisées à l'Université Catholique de Louvain au sein de l'équipe du Pr. Didier Lambert et plus précisément par le Pr. Giulio Muccioli. Le test consiste à déterminer la concentration pour laquelle le composé à tester inhibe 50 % de l'activité enzymatique. Pour cela, le pourcentage d'inhibition de l'hydrolyse du [^{3}H]-anandamide par la FAAH est évalué à différentes concentrations et quand cela est possible, les CI_{50} sont calculées. Certains composés comme le PMSF et l'URB597 ont été utilisés comme référence lors de ce test.



PMSF

FAAH : CI_{50} = 1.74 µM

(littérature, FAAH : CI_{50} = 13 µM)



URB597

FAAH : CI_{50} = 40 nM

(littérature, FAAH : CI_{50} = 4.6 nM)

Figure D. 1. Structures et activités des composés de référence

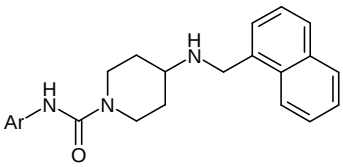
Ces composés présentent des activités inhibitrices différentes de celles décrites dans la littérature. En effet, le PMSF présente dans le test que nous utilisons une CI_{50} de 1.74 µM, pour une valeur de 13 µM dans la littérature. En revanche, l'URB597 présente une activité inhibitrice plus faible que la valeur littéraire.

Les propriétés inhibitrices des composés des séries A et B ont été évaluées vis-à-vis de la FAAH recombinante humaine, à différentes concentrations comprises entre 10^{-8} et 10^{-3} M en présence d'anandamide tritié. Le

substrat radiomarqué permet d'évaluer l'activité résiduelle de la FAAH après incubation de l'enzyme avec nos composés pendant 15 minutes.

1. 2) Evaluation des composés de la série A

2. a) Résultats obtenus pour les composés de la sous-série A1



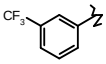
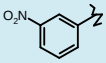
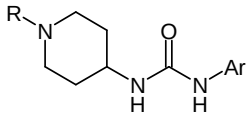
Nom	Ar	FAAH : CI_{50} (µM)
7		> 100
8		61 ± 12
9		> 100

Tableau A. 1. Activités inhibitrices des composés de la sous-série A1

Peu de molécules avaient été synthétisées pour cette sous-série. Il est donc difficile d'établir des relations structure-activité, d'autant plus que seul le composé **8** présente une activité modeste vis-à-vis de la FAAH. Les composés **7** et **9**, quant à eux, n'inhibent pas la FAAH. En comparant ces faibles activités à celle du PF-750 (CI_{50} = 16 nM) possédant une structure assez proche du composé **7**, on peut émettre deux hypothèses quant aux faibles activités de nos composés : soit le connecteur 4-aminopipéridine ne convient pas à l'enzyme, soit le groupement 1-méthylnaphtyle remplaçant le groupement 3-méthylquinoléine, ne se place pas correctement dans l'ABP.

2. b) Résultats obtenus pour les composés de la sous-série A2



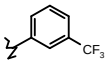
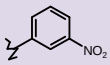
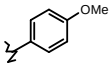
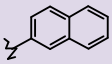
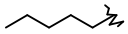
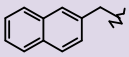
Nom	R	Ar	FAAH : CI_{50} (µM)
10			> 100
11			67 ± 5.1
12			> 100
13			> 100
14			12.3 ± 3.4
16			> 100
17			103 ± 12

Tableau D. 2. Activités inhibitrices des composés de la sous-série A2

Comme pour la sous-série A1, les composés de la sous-série A2 ne possèdent pas ou peu d'activité inhibitrice vis-à-vis de la FAAH. Le meilleur composé est le composé **14** dont la CI_{50} est de 12.3 µM.

Afin de tenter d'expliquer la différence d'activité observée entre les composés **10** et **14**, nous avons calculé les moments dipolaires des deux molécules. Ceux-ci s'étant révélés identiques, l'hypothèse d'un stacking aromatique plus important pour le composé **14** a dû être envisagée.

Au regard des faibles activités de ces molécules, nous avons souhaité vérifier que nos composés, comme le PF-622 et le PF-750, n'étaient pas temps-dépendants. Le composé **14** a donc été préincubé avec la protéine pendant 20, 40 et 60 minutes mais aucune variation d'activité n'a pu être observée.

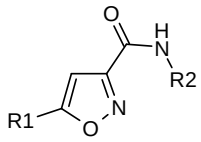
Les molécules de la série A diffèrent des inhibiteurs décrits dans la littérature par la présence d'un connecteur de type 4-aminopipéridine. Il apparaît alors que le fait de « sortir » un azote de l'hétérocycle en passant d'une pipérazine à un motif 4-aminopipéridine est défavorable à l'activité de molécules. Ce connecteur a une conformation spatiale différente d'un connecteur de type pipérazine. Il est alors possible que ce connecteur n'arrive pas à orienter correctement les groupements dans le site actif de l'enzyme.

De plus, le connecteur 4-aminopipéridine possède un azote extra-cyclique supplémentaire par rapport au connecteur pipéridine présent chez le PF-750. Il est alors possible que les pKa de nos molécules ne conviennent pas à l'enzyme.

En conclusion, les composés de la série A, pourtant très proches structuralement du PF-750 n'ont pas présenté d'activité sur la FAAH. Il serait intéressant pour la suite de nos investigations, de synthétiser dans les deux sous-séries A1 et A2, les analogues stricts du PF-750 en conservant le groupement 3-méthylquinoléine et d'évaluer leurs activités inhibitrices. Par ailleurs, les pKa des analogues du PF-750 et de ce dernier pourront être calculés afin de vérifier s'il existe un lien entre ces valeurs et l'activité enzymatique.

1. 3. Evaluation des composés de la série B

3. a) Résultats obtenus pour les composés de la sous-série B1



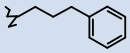
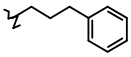
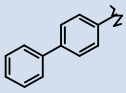
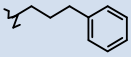
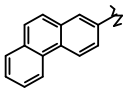
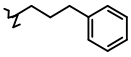
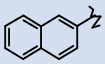
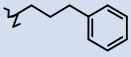
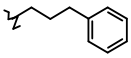
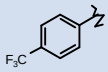
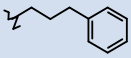
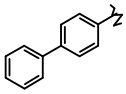
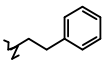
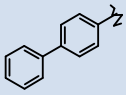
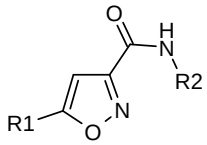
Nom	R1	R2	FAAH : CI_{50} (µM)
84			> 1000
85			251 ± 41
86			0.501 ± 0.1
87			12.6 ± 1.5
88			> 1000
89			125 ± 31
90			25.1 ± 3.7
91			70 ± 10
92			105 ± 15

Tableau D. 3. Activités inhibitrices des composés de la sous-série B1

Les composés de la sous-série B1 ne sont pas très affins pour la FAAH, à l'exception du composé **86** qui présente une CI_{50} pour l'enzyme de 501 nM. Ce composé différant des autres par la nature de son groupement R1 (R1 = 4-biphényle), nous avons ensuite conservé le groupement 4-biphényle et fait varier la

longueur de chaîne séparant l'azote de la fonction amide du phényle terminal en synthétisant les composés **91** et **92**, homologues inférieurs du produit **86.** Dans ce cas, on constate que l'activité inhibitrice des composés décroît avec la diminution du nombre de carbones séparant l'azote de la fonction amide du noyau phényle terminal. On peut alors émettre l'hypothèse qu'une chaîne trop courte n'occupe pas de manière optimale l'ABP de l'enzyme. Afin de confirmer cette hypothèse, il sera intéressant de synthétiser par la suite les homologues supérieurs du composé **86.**

3. b) Résultats obtenus pour les composés de la sous-série B2



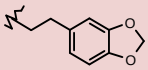
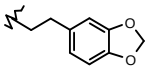
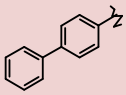
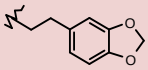
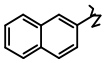
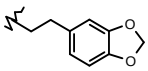
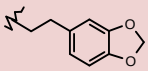
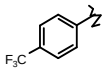
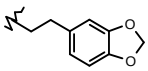
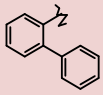
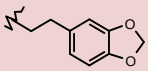
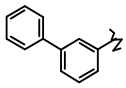
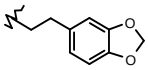
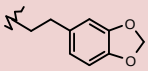
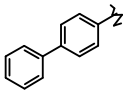
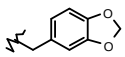
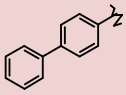
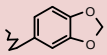
Nom	R1	R2	FAAH CI_{50} (µM)
93			25.1 ± 3.7
94			39.8 ± 5.1
95			0.088 ± 0.004
96			10.0 ± 0.4
97			79.4 ± 14
98			20.0 ± 2.2
99			> 1000
100			43.8 ± 4.8
101			En cours d'évaluation
102			92.1 ± 18
103			57.5 ± 8.5

Tableau D. 4. Activités inhibitrices des composés de la sous-série B2

De manière identique à ce qui avait été observé pour la sous-série B1, peu de molécules ont présenté des activités inhibitrices intéressantes vis-à-vis de la FAAH, à l'exception du composé **95** qui inhibe l'enzyme avec une CI_{50} de 88 nM, une valeur approchant celle de l'URB597 estimée à 40 nM dans notre test. Ce composé possède, comme le composé **86** de la sous-série B1, un groupement 4-biphényle en position C5 de l'isoxazole. Aussi, de manière analogue à ce qui avait effectué pour la sous-série précédente, nous avons synthétisé les homologues inférieurs **102** et **103** du composé **95**. Les amides **102** et **103** ont présenté des activités nettement inférieures à celle du composé **95**. Il sera donc intéressant d'envisager la synthèse des homologues supérieurs du produit **95**.

En comparant les sous-séries B1 et B2, nous avons observé que la substitution de l'isoxazole en position C5 par un groupement 4-biphényle semblait nécessaire à l'activité. Nous avons donc envisagé d'introduire en position C5 de l'isoxazole des analogues de position du groupement 4-biphényle et nous avons synthétisé les produits **99** et **100** possédant respectivement un groupement 2-biphényle et 3-biphényle. Ces composés n'ont pas présenté d'activités inhibitrices intéressantes. Il semble donc que la substitution du groupement biphényle influence l'activité.

Le remplacement du groupement 4-biphényle par des analogues rigidifiés comme les groupements 2-phénantryle ou 2-naphtyle n'a pas permis d'améliorer l'activité des molécules. Il est donc nécessaire qu'il existe un certain degré de liberté entre les deux noyaux phényles pour que ceux-ci puissent se positionner correctement dans le site actif de la FAAH.

Par ailleurs, en mettant en parallèle les résultats obtenus pour la sous-série B1 avec ceux obtenus pour la sous-série B2, on observe que les composés de la sous-série B2 présentent des activités inhibitrices supérieures. Nous avons donc effectué des études de modélisation moléculaire afin d'expliquer cette différence d'activité et nous avons modélisé les composés **86** et **95** dans le site actif de la FAAH.

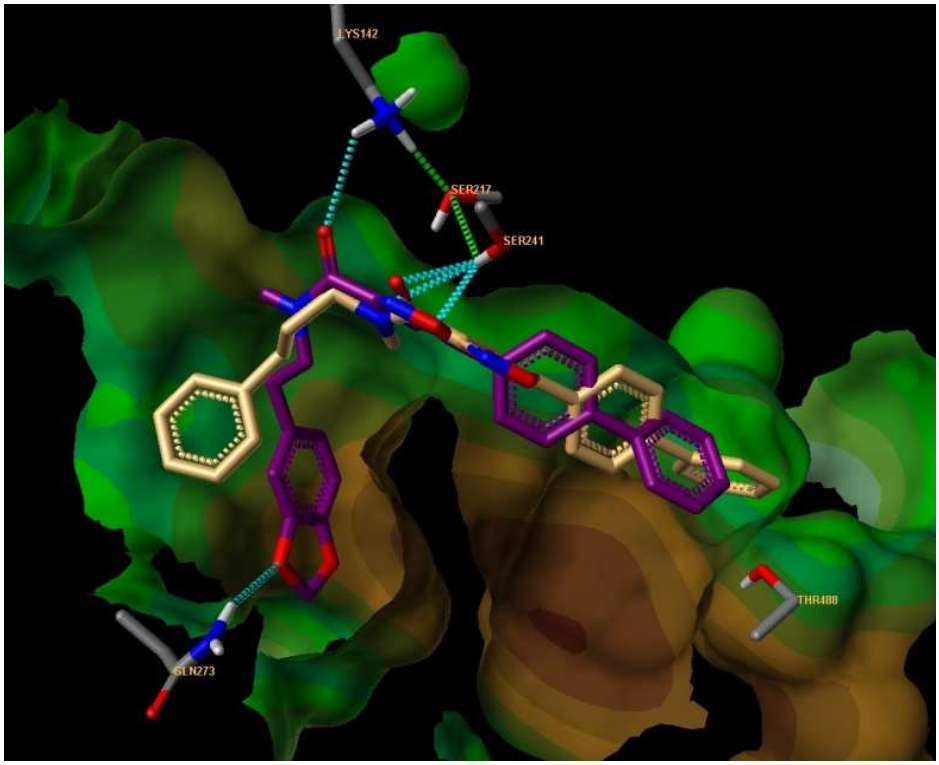
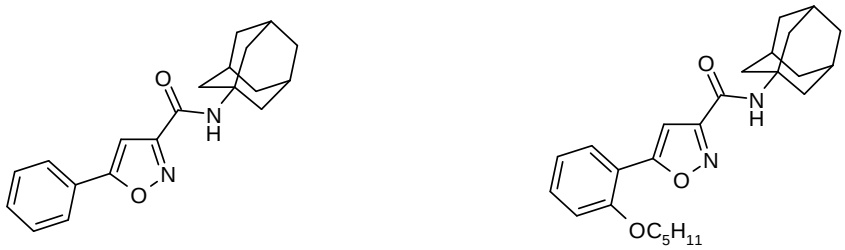


Figure D. 2. « Docking » des composés **86** (jaune) et **95** (violet) dans le site actif de la FAAH

Ainsi en comparant les modes de fixation théoriques de nos composés, nous avons souligné l'établissement d'une liaison hydrogène entre l'un des atomes d'oxygène du groupement benzodioxol et la glutamine 273. Cette interaction supplémentaire pourrait être à l'origine de la différence d'activité existant entre les deux composés et plus généralement, entre les composés de la sous-série B1 et de la sous-série B2.

3. c) Résultats obtenus pour les composés des sous-série B3 et B'

A ce jour, aucun composé de la série B3 et seulement deux de la série B' ont été évalués sur la FAAH. Il s'agit des composés **110** et **117** à l'origine de la conception de la série B'. Comme décrit précédemment dans la partie B, le composé **110** inhibe la FAAH avec une CI_{50} de 500 nM et le composé **117** ne présente pas d'activité inhibitrice pour cette enzyme.

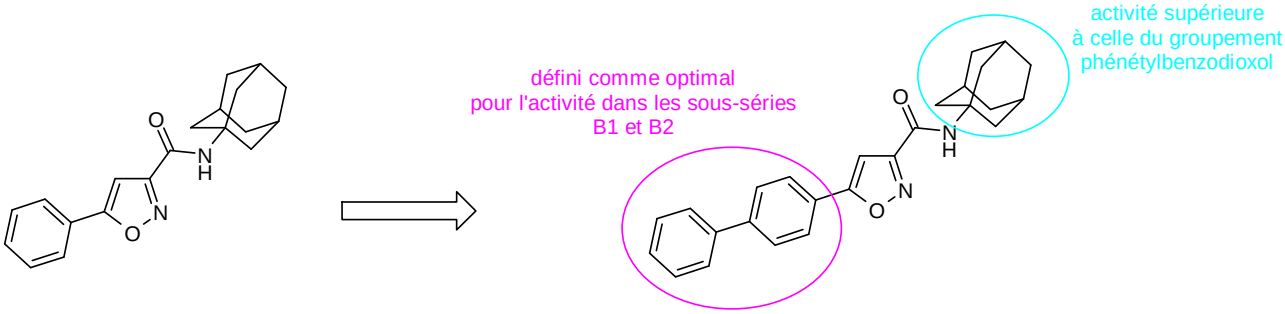


110 **117**

FAAH : CI_{50} = 500 nM FAAH : CI_{50} > 1000 µM

Figure D. 3. Structures et activités inhibitrices des composés **110** et **117**

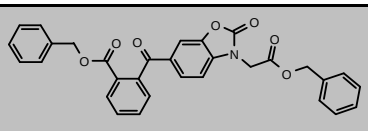
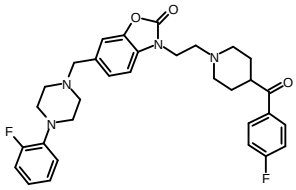
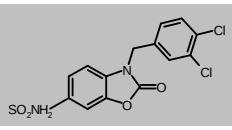
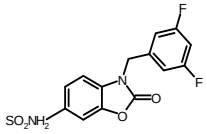
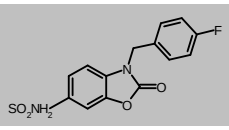
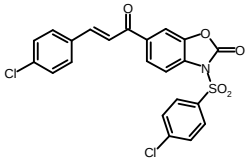
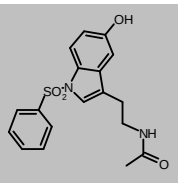
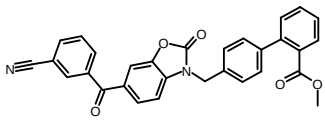
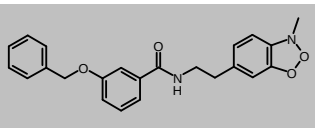
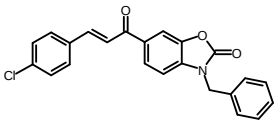
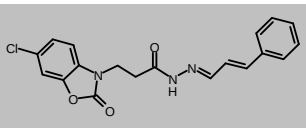
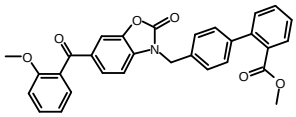
Il est à noter que le composé **110** est à l'origine de la synthèse du composé **104**. En effet, le composé **104** possède en C5 un groupement 4-biphényle défini précédemment comme étant nécessaire à l'activité FAAH et est substitué sur sa fonction amide par un adamantane, groupement également favorable à l'inhibition de la FAAH (**110** *vs* **93**).

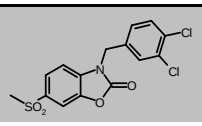
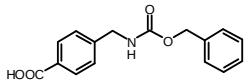
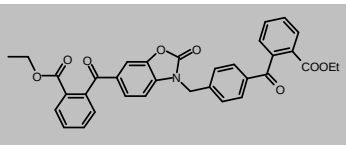
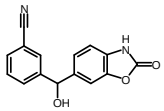
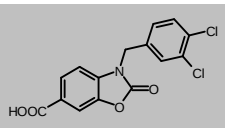
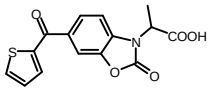
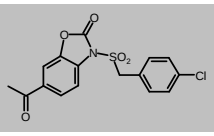
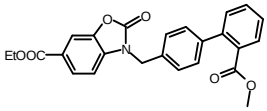
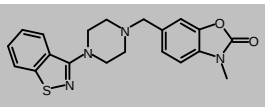
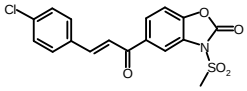
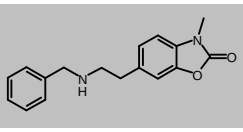
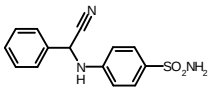
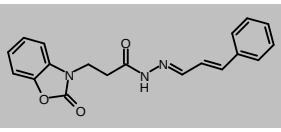
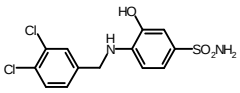
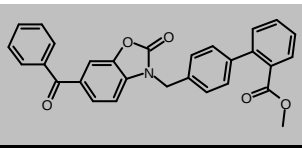


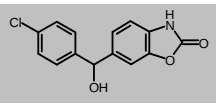
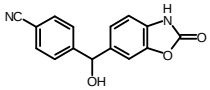
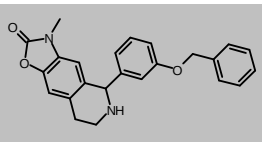
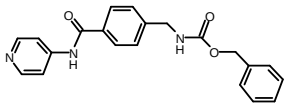
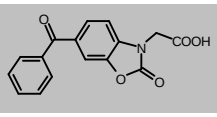
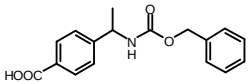
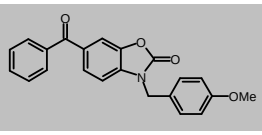
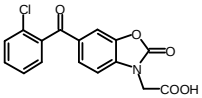
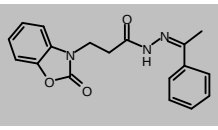
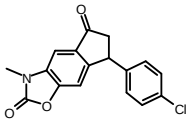
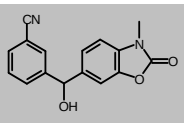
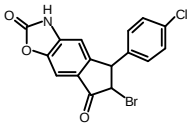
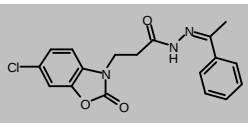
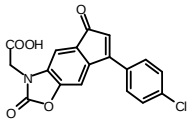
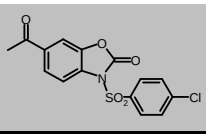
110 **104**

Figure D. 4. Conception du composé **104** à partir du composé **110**

3. d) Résultats obtenus pour les composés issus du criblage virtuel

Nom	Structure	FAAH : % inhibition à 10^{-3} M
1		**86.7**
2		**63.9**
3		**50.9**
4		**39.0**
5		**37.8**
6		**35.4**
7		**35.4**
8		**4.7**
9		**28.9**
10		**32.8**
11		**47.4**
12		**25.2**

Nom	Structure	FAAH : % inhibition à 10^{-3} M
13		29.3
14		44.2
15		37.4
16		67.8
17		67.5
18		15.3
19		27.6
20		27.4
21		20.9
22		10.5
23		68.7
24		63.9
25		85.9
26		57.2
27		81.9

Nom	Structure	FAAH : % inhibition à 10^{-3} M
28		**18.5**
29		**80.9**
30		**85.5**
31		**45.6**
32		**83.3**
33		**42.4**
34		**93.4**
35		**55.0**
36		**71.5**
37		**45.2**
38		**67.3**
39		**27.2**
40		**81.3**
41		**84.3**
42		**79.8**

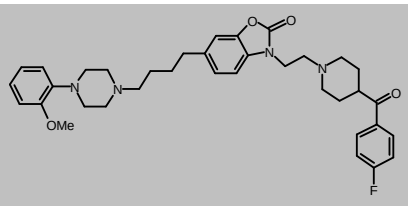
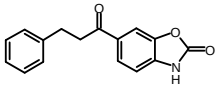
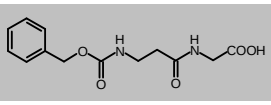
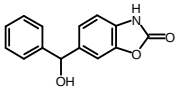
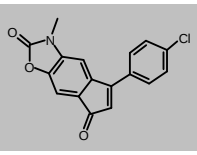
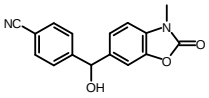
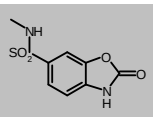
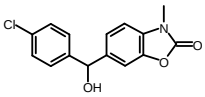
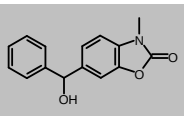
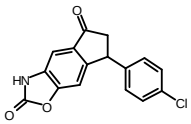
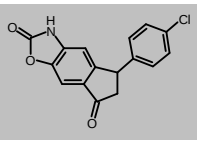
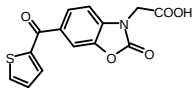
Nom	Structure	FAAH : % inhibition à 10^{-3} M
43		**40.8**
44		**39.0**
45		**59.0**
46		**96.8**
47		**36.5**
48		**29.8**
49		**45.4**
50		**37.9**
51		**65.4**
52		**82.4**
53		**57.6**
54		**35.7**

Tableau D. 5. Pourcentages d'inhibition à 10^{-3} M des composés issus du criblage virtuel

Les molécules **1** à **54** issues du criblage virtuel ont été classées par ordre de score, du meilleur au moins bon. On remarque alors que les pourcentages d'inhibition obtenus sont en désaccord avec les résultats du criblage. En effet, le composé **52** qui possède un score médiocre sur l'enzyme présente un pourcentage

d'inhibition de 82 %. A l'inverse, le composé **4** obtenant l'un des meilleurs scores en docking, n'a inhibé l'enzyme qu'à 39 %, à 10^{-3} M. Ce désaccord peut-être expliqué par plusieurs raisons :

- la première est liée à la nature de l'inhibiteur. Pour réaliser ce criblage nous avons imposé au logiciel de sélectionner les meilleures molécules établissant une liaison hydrogène avec la sérine 241 de la FAAH. Toutefois, dans le cas d'un inhibiteur irréversible, il n'est plus question de liaison hydrogène, mais de liaison covalente. Il est donc plus réaliste d'imposer au logiciel une contrainte de distance entre le carbonyle électrophile de l'inhibiteur et la sérine 241 de l'enzyme lorsque l'on pense avoir affaire à un inhibiteur irréversible. Une autre solution permettant de s'approcher au maximum de la réalité du mode de fixation d'un ligand covalent est de docker l'intermédiaire tétraédrique réactionnel. Ainsi, on peut imposer des contraintes de liaison hydrogène au logiciel.

- la seconde peut-être expliquée par la forme du site actif de l'enzyme. En effet, la FAAH possède deux cavités (la poche à oxanion et l'ABP) s'étendant de part et d'autre de la triade catalytique. En imposant au logiciel de ne sélectionner que les molécules établissant une liaison hydrogène avec la sérine 241, nous avons permis aux composés de se placer soit dans un sens, soit dans l'autre, ce qui ne reflète pas la réalité.

- la dernière hypothèse est liée au modèle. En effet, à l'époque où le criblage avait été réalisé, peu de ligands avaient été co-cristallisés avec l'enzyme. Les données manquantes ont donc pu être à l'origine des résultats peu probants obtenus par les molécules sélectionnées.

Toutefois, il est à noter que 20 molécules ont présenté un pourcentage d'inhibition supérieur à 60 % et 11 ont inhibé l'enzyme avec un pourcentage supérieur à 80 % à la concentration de 10^{-3} M. Les CI_{50} de ces composés seront prochainement calculées mais il est déjà possible de dégager certaines RSA. En effet, en comparant les composés **16**, **28**, **29**, **38**, **46**, **48**, **50** et **51** possédant un squelette commun de type 6-(hydroxy-phényl-méthyl)-3H-benzoxazol-2-one on constate que :

- d'une manière générale, la méthylation de l'azote du groupement benzoxazol-2-one est néfaste pour l'activité. Il est donc probable que l'azote interagisse en tant que donneur de liaison hydrogène avec la protéine.

- la substitution du noyau phényle semble défavorable à l'activité puisque le meilleur pourcentage d'inhibition a été obtenu pour le composé **46** dont le noyau phényle n'est pas substitué.

Néanmoins, il est nécessaire d'attendre le calcul des CI_{50} afin d'approfondir les RSA.

I. 2) Mesure de l'affinité des composés de la série B' vis-à-vis du récepteur CB2

2. 1) Description du protocole

Les tests de liaison aux récepteurs aux cannabinoïdes ont été réalisés au laboratoire du Pr. Didier Lambert sous la direction du Pr. Giulio Muccioli et du Dr. Barbara Bosier. Ils ont été effectués sur des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) exprimant de manière stable soit le récepteur CB1 humain (*h*CB1), soit le récepteur CB2 humain (*h*CB2). Le [^{3}H]-SR141716A et le [^{3}H]-CP 55,940 ont été utilisés comme radioligands de référence pour les récepteurs CB1 et CB2 respectivement, et la liaison non spécifique a été déterminée en présence de 10 µM de HU-210. Les tests ont été réalisés au moins trois fois en duplicate. Les pourcentages d'inhibition de la liaison spécifique ont été évalués par scintillation après 1 h d'incubation à 30 °C. Tous les composés ont d'abord été évalués à une concentration de 10 µM sur les deux récepteurs et des valeurs de Ki ont été déterminées lorsque le pourcentage de liaison spécifique était supérieur à 60 %. Dans ce cas, chaque composé a été testé à des concentrations allant de 10^{-5} à 10^{-12} M, permettant ainsi de tracer une courbe et de déterminer par régression non-linéaire, une CI_{50}. Le Ki quant à lui, a été calculé à partir de la CI_{50}, en appliquant l'équation de Cheng-Prusoff : $Ki = CI_{50}/(1+L/Kd)$, dans laquelle, L représente la concentration en radioligand et Kd, la constante de dissociation à l'équilibre pour le radioligand.

Les tableaux ci-après résument les affinités pour les deux sous-types de récepteurs obtenues pour les ligands de référence et les quelques composés de la sous-série B' qui ont été testés. L'index de sélectivité (CB2 vs CB1) a été calculé lorsque cela a été possible.

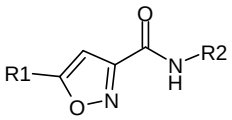
Référence	**Ki (nM)**		**Index de sélectivité CB2 vs CB1**
	***h*CB1**	***h*CB2**	
SR144528	/	51.7 ± 4.8	/
WIN55,212-2	/	9.1 ± 0.8	/
CP 55,940	/	15.4 ± 1.4	/
JWH133	/	20.3 ± 2.6	/
HU-210	/	7.3 ± 0.9	/

Tableau D. 6. Affinités des ligands de référence pour le récepteur CB2

De manière générale, on constate que dans notre test, les composés de référence possèdent des affinités pour le récepteur CB2 plus faibles que celles décrites dans la littérature. Par exemple le SR144528 possède dans notre test un Ki égal à 51.7 nM, pour une valeur de 0.31 nM dans la littérature.

2. 2) Résultats obtenus pour les composés de la sous-série B'

En ce qui concerne nos composés, seules les valeurs d'affinité des composés **110**, **117**, **119** et **120** sont disponibles. Les autres membres de cette série sont actuellement en cours d'évaluation.[295]



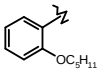
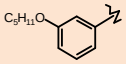
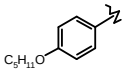
Nom	R1	R2	Ki (nM) *h*CB1	*h*CB2	Index de sélectivité CB2 *vs* CB1
110			>3000	>3000	/
117			>3000	197 ± 45	>15
119			>3000	>3000	/
120			>3000	>3000	/

Tableau D. 7. Affinités pour CB1 et CB2 des composés **110**, **117**, **119** et **120**

Le composé **117** est le seul à présenter une affinité pour le récepteur CB2. Il est important de souligner que ce composé ne se lie pas au récepteur CB1. Cette sélectivité pour le récepteur CB2 est primordiale puisqu'il est acquis que le récepteur CB1, du fait de sa localisation principalement centrale, est à l'origine de nombreux effets indésirables.

Par ailleurs, ces premiers résultats indiquent que la présence d'une chaîne *O*-pentyle en ortho du groupement phényle semble favorable à l'activité puisque seul le composé **117** est affin pour le récepteur CB2 (Ki = 197 nM). Grâce à ces résultats, nous avons remarqué l'importance de la substitution en ortho et nous avons entrepris d'évaluer l'importance de la longueur de chaîne en synthétisant les composés **113** à

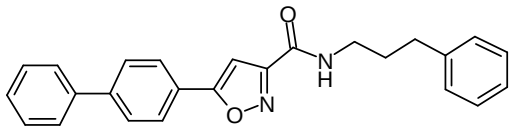
[295] Rinaldi-Carmona M., Barth F., Millan J., Derocq J. M., Casellas P., Congy C., Oustric D., Sarran M., Bouaboula M., Calandra B., Portier M., Shire D., Brelière J. C., Le Fur G. L. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **1998,** *284,* 644-650

116 possédant une chaîne *O*-alkyle en ortho allant de 1 à 4 carbones ainsi que le composé **118** possédant une chaîne *O*-hexyle, également en cette même position.

Nous avons ensuite souhaité remplacer le groupement 1-adamantyle par d'autres groupements aliphatiques comme le groupement cyclohexyle (composé **122**) et pipéridine (composé **123**) afin d'établir une comparaison entre les fonctions amide et hydrazide.

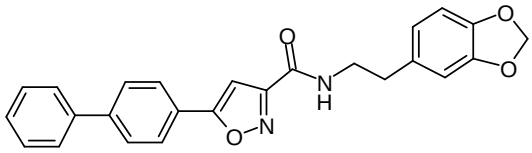
La combinaison de ces résultats avec ceux attendus concernant l'affinité pour la FAAH des composés de cette sous-série devrait lever le voile sur la possibilité d'envisager une série de molécules mixtes inhibitrices de la FAAH / agonistes des récepteurs CB2. Il faudra néanmoins pour cela, envisager d'évaluer la fonctionnalité de nos molécules vis-à-vis du récepteur CB2 par le biais d'un test de liaison du [^{35}S]-GTPγS afin de pouvoir conclure sur le caractère, agoniste, antagoniste ou agoniste inverse de nos molécules.

Les différentes évaluations pharmacologiques permettent de révéler plusieurs composés intéressants. Dans la sous-série B1, nous pouvons retenir le composé **86** qui inhibe la FAAH avec une CI_{50} de 501 nM. La sous-série B2 a quant à elle révélé le composé **95** qui est le composé le plus affin pour l'enzyme que nous ayons synthétisé (CI_{50} = 88 nM). Aucun des composés de la sous-série B3 n'a à ce jour été testé sur l'enzyme. Quant aux composés de la sous-série B', nous pouvons retenir le composé **110** qui inhibe la FAAH avec une CI_{50} de 500 nM ainsi que le composé **117** qui n'inhibe pas la FAAH, mais qui se lie au récepteur CB2 avec un Ki de 197 nM.



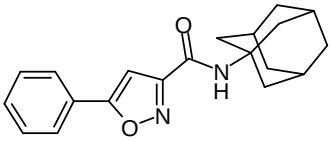
86

FAAH : CI_{50} = 501 nM



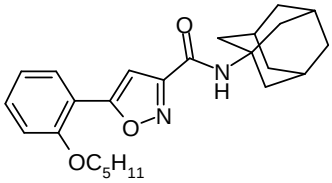
95

FAAH : CI_{50} = 88 nM



110

FAAH : CI_{50} = 500 nM



117

CB2 : Ki = 197 nM

Figure D. 5. Récapitulatif des composés les plus actifs

Enfin, il nous reste à déterminer les CI_{50} des 20 composés issus du criblage virtuel qui ont présenté des pourcentages d'inhibition à 10^{-3} M supérieurs à 60 %. Nous espérons ainsi voir l'émergence d'un chef de file qui nous servira de base pour la conception d'une nouvelle série chimique.

D. II) Evaluations pharmacologiques *in vivo*

Par le biais d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Pierre Desreumeaux (U795, Physiopathologie des maladies inflammatoires de l'intestin, Lille), nous avons pu évaluer les propriétés anti-inflammatoires du composé **95** possédant la meilleure activité inhibitrice vis-à-vis de la FAAH, dans un modèle murin de colite induite par le TNBS. Les tests ont été effectués par le Dr. Mathilde Body-Malapel et M. Madjid Djouina.

II. 1) Généralités sur le modèle murin de colite induite par le TNBS

Ce modèle repose sur l'utilisation d'une molécule chimique de faible poids moléculaire non immunogène par elle-même, l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS). Celle-ci est injectée en solution dans l'éthanol. L'alcool est nécessaire pour léser la barrière de la muqueuse intestinale, alors que le TNBS va se complexer avec certains acides aminés constituant les protéines de la paroi colique (par exemple les résidus lysines). Ces protéines du « soi » sont ainsi rendues immunogènes et sont à l'origine de l'induction d'une réponse immunitaire. Dans un premier temps, cette réponse localisée dans les ganglions mésentériques, est complètement asymptomatique (phase de sensibilisation) et se caractérise par l'activation, la migration et la différenciation des lymphocytes T (LT) spécifiques d'antigène en cellules effectrices. L'inflammation colique survient lors d'un second contact de la muqueuse avec l'haptène (phase de révélation) et résulte du recrutement des LT effecteurs dans l'intestin. Ces effecteurs spécifiques de l'antigène déclenchent une réaction inflammatoire incontrôlée à l'origine des lésions intestinales qui sont amplifiées et entretenues par le recrutement d'autres cellules inflammatoires non spécifiques (macrophages, polynucléaires, lymphocytes, mastocytes) et par réaction croisée entre les antigènes et la flore bactérienne.[296] Cette colite est caractérisée par une augmentation de la production d'interleukine 12 (IL-12), qui favorise le développement de lymphocytes auxiliaires Th1 (T-helper 1, appelés également $CD4^+$) lesquels produisent de l'interféron γ (INFγ).[297] Ce dernier est responsable de la production, par les macrophages, de certaines cytokines pro-

[296] Neurath M. F., Fuss I., Strober W. TNBS-colitis. *Int. Rev. Immunol.,* **2000,** *19,* 51-62

[297] Neurath M. F., Fuss I., Kelsall B. L., Stüber E., Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.,* **1995,** *182,* 1281-1290

inflammatoires (TNF-α, IL-1β et IL-6) et de l'inhibition de l'IL-4 (cytokine anti-inflammatoire).[298] Ce modèle permet d'étudier la réponse immunitaire dépendante des lymphocytes T $CD4^+$ (immunité acquise).

Sur le plan macroscopique, la colite se traduit par un épaississement de la paroi intestinale et par d'intenses ulcérations pouvant parfois aller jusqu'à la perforation. D'un point de vue clinique, cette inflammation colique s'accompagne d'une importante perte de poids et peut conduire à la mort de la souris.

II. 2) Description du protocole

Pour effectuer ce test, nous avons constitué quatre groupes de souris C57B16 : trois groupes comprennent dix individus et un groupe, le groupe contrôle, ne contient que six individus. Les animaux ont été anesthésiés par l'administration sous-cutanée d'une solution saline de xylasine-kétamine (50 mg/kg). Puis, la colite a été induite aux souris des trois premiers groupes par l'administration intrarectale de TNBS (150 mg/kg) dissous dans un mélange 1:1 d'une solution saline à 0,9 % et d'éthanol. Le groupe contrôle n'a quant à lui reçu que le véhicule composé du mélange 1:1 de NaCl à 0.9% et d'éthanol.

Trois jours avant l'induction de la colite, un groupe a reçu le composé **95** dissous dans le véhicule en présence de 2 % de DMSO et de 1 % de Tween 80, par voie IP, à la dose de 10 mg/kg. Un autre groupe, le groupe témoin, a quant à lui, eu accès à volonté à des granulés de 5-ASA (Pentasa®) à la dose de 150 mg/kg. Le dernier groupe n'a reçu aucun traitement.

Trois jours après l'administration du TNBS, l'état général des animaux a été évalué puis les souris ont été sacrifiées. Leurs côlons ont été prélevés et l'évaluation des lésions macroscopiques, microscopiques ainsi que le dosage des cytokines ont été effectués.

[298] Neurath M. F., Fuss I., Pasparakis M., Alexopoulou L., Haralambous S., Meyer zum Büschenfelde K. H., Strober W., Kollias G. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur. J. Immunol.,* **1997,** *27,* 1743-1750

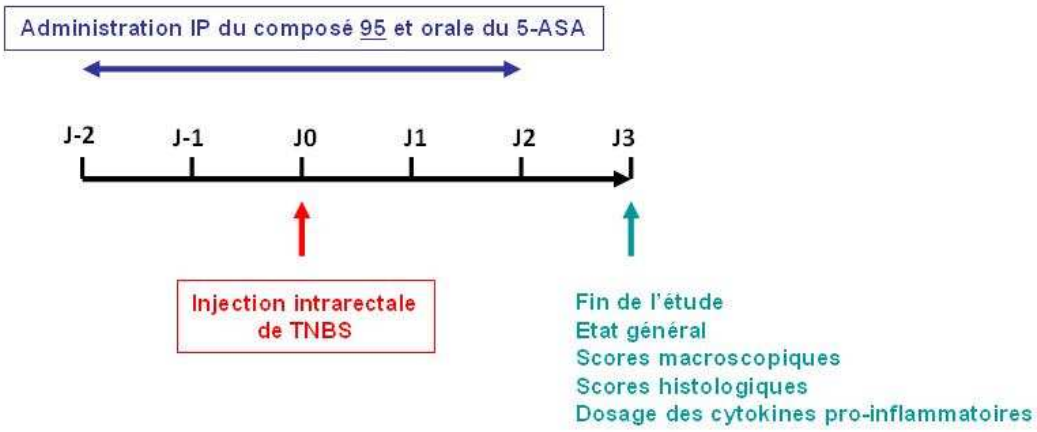


Figure D. 6. Design de l'étude

II. 3) Résultats obtenus

3. 1) Le composé **95** prévient la perte de poids

La perte de poids traduit l'état général des animaux. Aussi, trois jours après l'induction de la colite, le poids de chaque souris est mesuré. Il apparaît ainsi que le composé **95** prévient la perte de poids de manière significative. Par ailleurs, dans cette évaluation, notre composé obtient de bien meilleurs résultats que le 5-ASA, actuel traitement de référence des MICI.

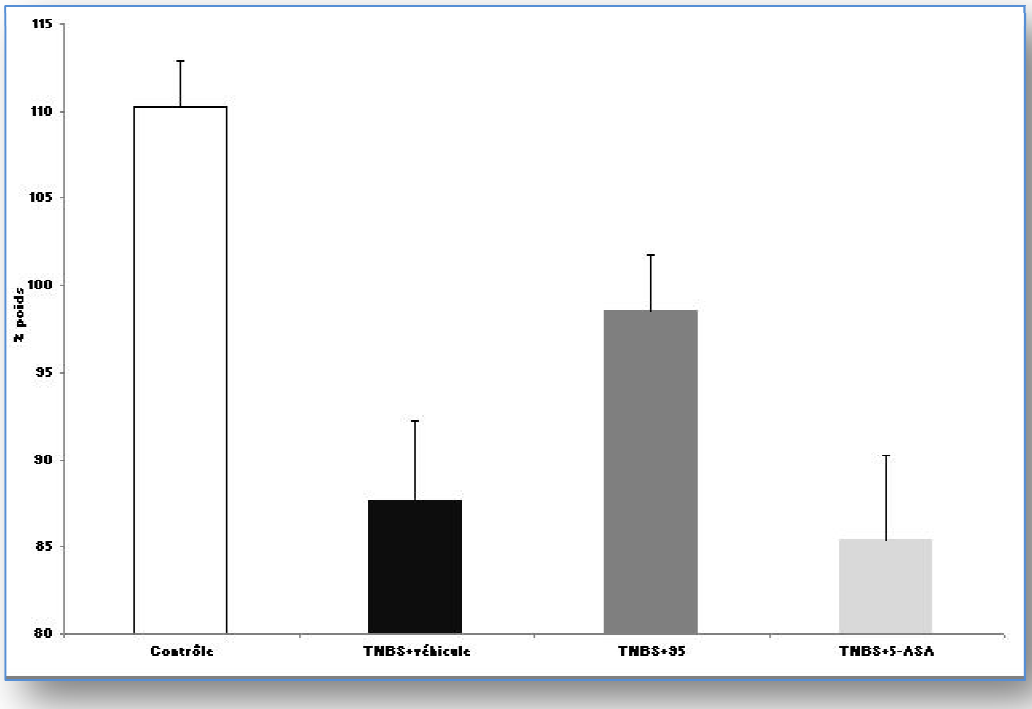


Figure D. 7. Le composé 95 prévient la perte de poids chez les souris atteintes de colite

3. 2) Evaluation des dégâts coliques et effet protecteur du composé **95**

Après le sacrifice, le côlon des rongeurs est prélevé et les lésions macroscopiques sont évaluées selon les critères de Wallace (score macroscopique).[299] Ce score rapporté sur une échelle de 0 à 10 se base sur des caractéristiques reflétant l'inflammation, telles que l'hyperémie, l'épaississement de l'intestin et l'étendue de l'ulcération.

[299] Wallace J. L., MacNauhton W. K., Morris G. P., Beck P. L. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology,* **1989,** *96,* 29-36

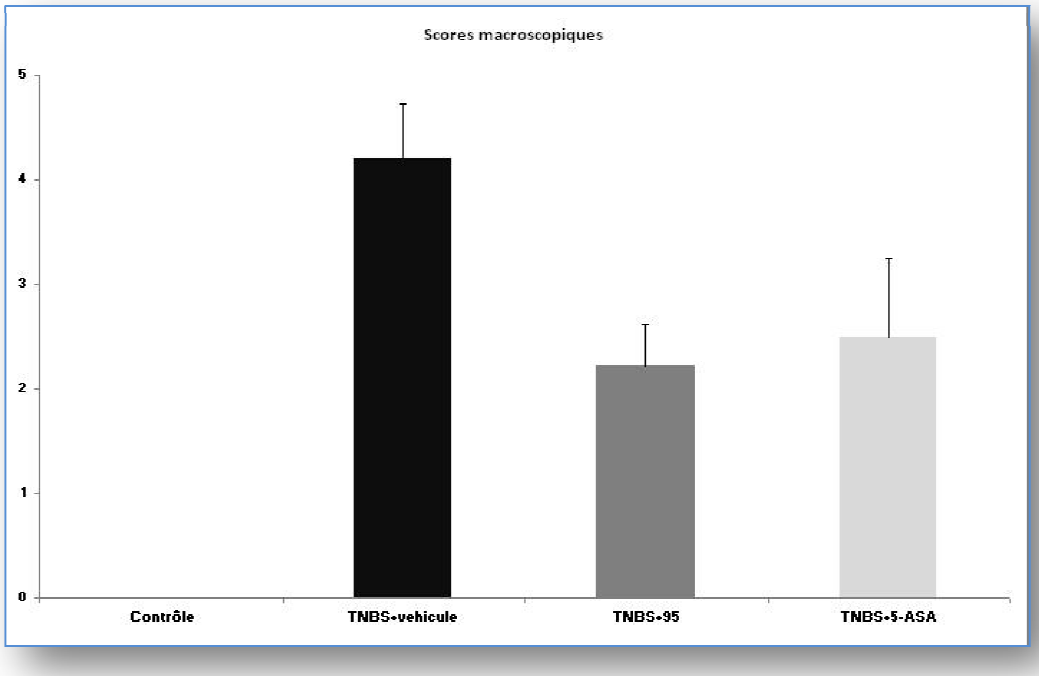


Figure D. 8. Scores macroscopiques

Les souris qui n'ont reçu que le TNBS présentent des lésions macroscopiques importantes qui se traduisent par l'épaississement et l'ulcération de l'intestin. L'administration du composé **95** par voie IP à la dose de 10 mg/kg permet d'améliorer significativement les scores macroscopiques (47 %). De même, le 5-ASA administré par voie orale a permis de réduire l'inflammation des tissus.

Un échantillon du côlon localisé précisément 2 cm au-dessus du canal anal est utilisé pour l'évaluation histologique selon les critères d'Ameho (score microscopique).[300] Ce score (de 0 à 6) prend en compte le degré d'inflammation, l'érosion et l'ulcération du côlon, le phénomène de nécrose, ainsi que la profondeur et la surface d'extension des lésions. Les autres parties du côlon sont congelées et utilisées pour quantifier les taux d'ARN messager de TNF-α et d'IL-1β.

[300] Ameho C. K., Adjei A. A., Harrison E. K., Takeshita K., Morioka T., Arakaki Y., Ito E., Suzuki I., Kulkarni A. D., Kawajiri A., Yamamoto S. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut,* **1997,** *41,* 487-493

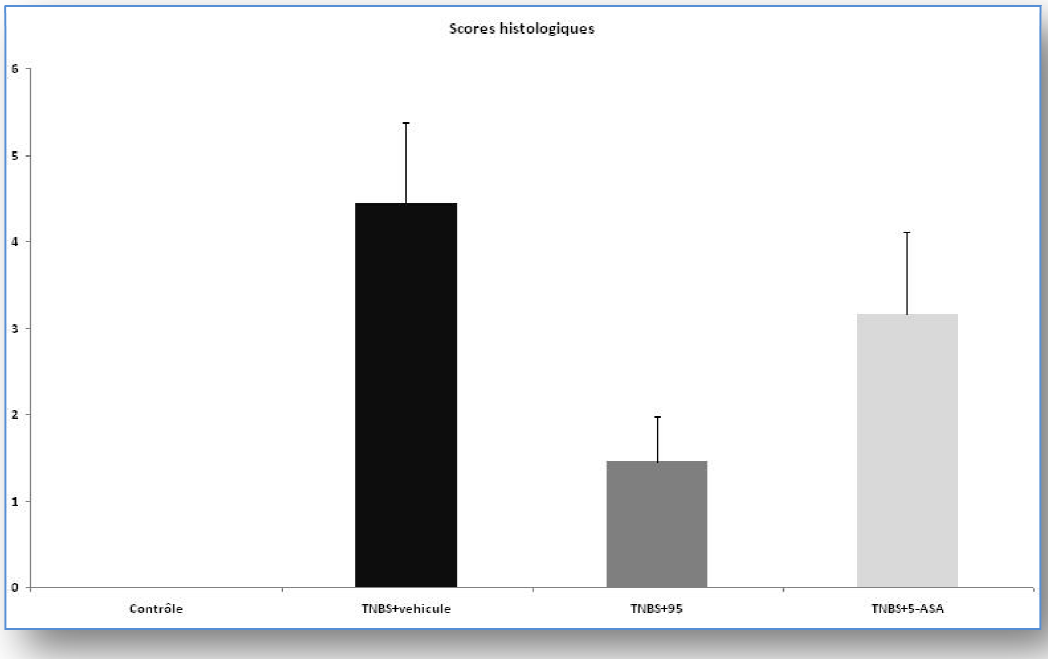
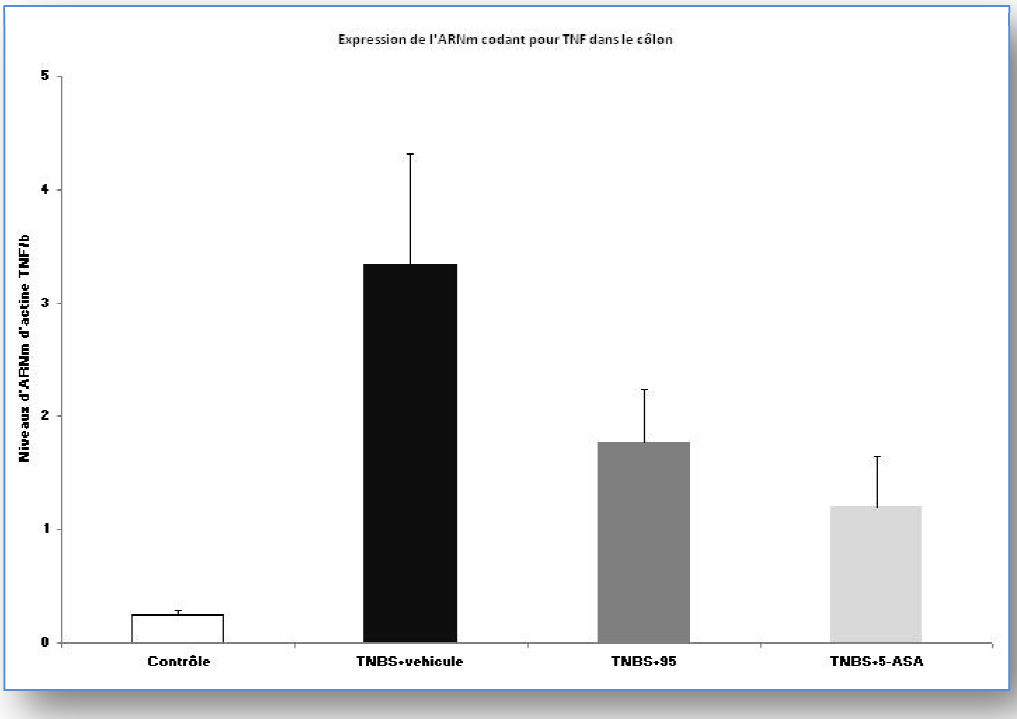


Figure D. 9. Scores microscopiques

De manière analogue à ce qui a été observé pour les scores macroscopiques, les souris n'ayant reçu que le TNBS présentent une ulcération colique importante. En revanche, celles qui ont été traitées avec le composé **95** présentent une diminution du score microscopique moyen de 68 %, ce qui montre que le composé **95** a un effet protecteur sur l'inflammation et l'ulcération du côlon.

3. 3) Quantification des cytokines pro-inflammatoires : TNF-α et IL1-β

L'effet anti-inflammatoire du composé **95** a été vérifié par la quantification de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α et l'IL1-β.



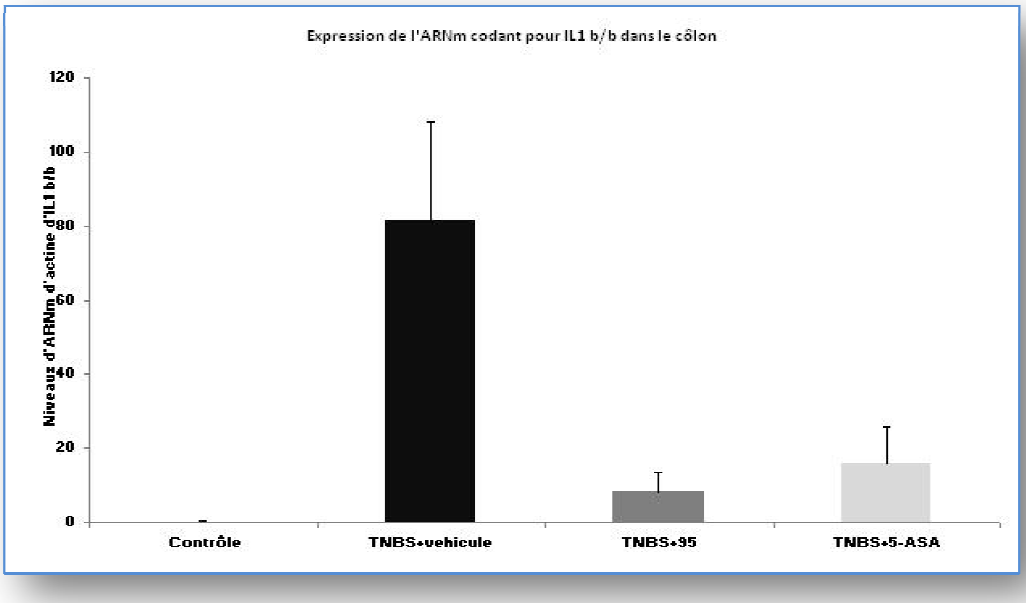


Figure D. 10. Quantification des ARNm codant pour TNF-α et IL1-β dans les côlons des souris

Chez les souris n'ayant reçu que le TNBS, ces deux cytokines pro-inflammatoires sont très exprimées. En revanche, chez les souris traitées par le composé **95** et par le 5-ASA, les niveaux d'expression de ces protéines ont fortement été diminués montrant ainsi que le composé **95** est efficace pour réduire l'inflammation du côlon.

Le composé **95** administré par voie IP est donc efficace pour traiter la colite. Nous envisageons maintenant une administration par voie orale. Pour cela, nous avons réalisé des études de stabilité du composé **95** sur des microsomes hépatiques.

D. III) Etude de la stabilité du composé 95 en présence de microsomes hépatiques

Lors d'une administration par voie orale, le passage au niveau du foie est parfois dommageable pour les médicaments puisqu'il est le lieu du métabolisme par les microsomes hépatiques. Nous avons donc demandé une étude de stabilité microsomale du composé **95**. Celle-ci a été réalisée par la plateforme du PRIM et plus précisément par Melle Catherine Piveteau.

III. 1) Description du protocole

Le composé **95** (1 µM d'une solution à 1 % d'inhibiteur dans le méthanol) a été incubé avec des microsomes de foie issus de souris mâles CD-1 (0.3 mg/mL), en présence de 5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de NADP, 5 mM de glucose-6-phosphate, 0.4 U/mL de glucose-6-phosphate déshydrogénase et 50 mM d'un tampon phosphate de potassium (pH = 7.4), pour un volume finale de 0.5 mL.

Des échantillons ont été prélevés à 10, 20, 30 et 40 minutes. A chaque fois, la réaction a été stoppée par l'ajout de glace et d'acétonitrile. Chaque échantillon a ensuite été centrifugé pendant 10 min à 10000*g, pour permettre la précipitation des protéines microsomales. Le surnageant a quant à lui été prélevé et injecté en LC-MS.

Pour cette expérience, le Propranolol dont la biodisponibilité connue au laboratoire a été choisi comme témoin positif.

III. 2) Résultats obtenus

L'analyse LCMS permet de quantifier la quantité de composé **95** restant après l'incubation de la molécule avec les microsomes hépatiques pendant 10, 20, 30 et 40 min.

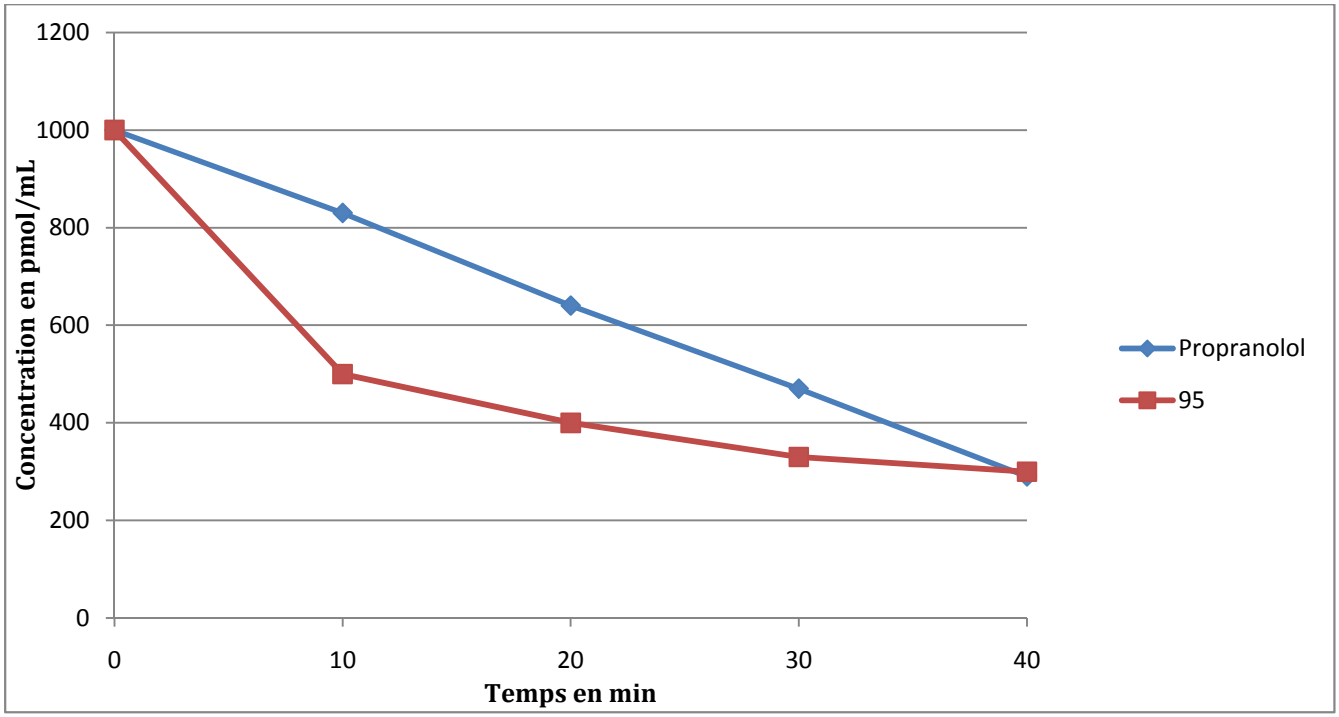


Figure D. 11. Etude de la stabilité du composé **95** en milieu hépatique.

Ce graphique montre que si le composé **95** est fortement métabolisé durant les dix premières minutes, la dégradation du composé tend ensuite à se stabiliser et, à t = 40 min, 30 % de la dose initiale sont encore disponibles. Ces résultats sont comparables à ceux observés pour le Propranolol.

Sur la base de ces investigations, la clairance intrinsèque du composé a été calculée. Aussi, il apparait que 114 µL de solution de **95** sont éliminés en une minute, par 1 mg de protéines microsomales. La clairance de notre composé se situe dans l'intervalle « normal » de clairance allant de 20 µL/min/mg à 120 µL/min/mg. La dégradation de notre composé est donc normale.

Le temps de demi-vie du composé **95** a été calculé et estimé à 25 min. Afin de valider l'expérience, l'instabilité non-due aux microsomes hépatiques a été calculé et vaut 7.6 %. Cette valeur permet de signifier que la dégradation de notre composé est uniquement due aux microsomes hépatiques, puisqu'en leur absence, environ 94 % de la dose initiale du composé sont encore disponibles à t = 40 min.

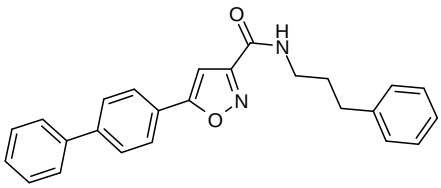
Les données de stabilité hépatique du composé **95** sont donc encourageantes. Nous pourrons par conséquent envisager prochainement de l'administrer par voie orale chez des souris dont la colite sera induite par l'administration intrarectale de TNBS.

L'objectif de ce travail était de synthétiser de nouveaux inhibiteurs de la FAAH, afin d'établir des études de relations structure-activité (RSA) et d'évaluer leur impact dans un modèle murin de colite. Pour cela, nous avons choisi de synthétiser deux séries de molécules : la série A agencée autour d'un connecteur 4-aminopipéridine et la série B comprenant des molécules de type 5-arylisoxazole-3-carboxamide.

Les composés de la série A, pourtant dérivés d'inhibiteurs décrits comme particulièrement puissants et sélectifs dans la littérature comme le PF-750, n'ont présenté que peu d'affinité pour l'enzyme. Plusieurs hypothèses ont été posées pour expliquer les différences d'activité existant entre nos composés et le PF-750 pourtant très proches structuralement : soit, du fait de l'introduction d'un azote supplémentaire dans leurs structures (connecteur 4-aminopipéridine *vs* connecteur pipéridine pour le PF-750) nos composés ne sont plus suffisamment hydrophiles pour se loger dans l'ABP, soit les groupements que nous avons choisis pour remplacer le noyau quinoléine du PF-750 ne se logent pas bien dans l'ABP. Aussi, nous envisageons pour la suite de nos recherches de synthétiser les analogues stricts du PF-750 dans chacune des sous-séries A1 et A2 et d'évaluer leurs propriétés inhibitrices. Nous pourrons ainsi conclure quant à la part de responsabilité du connecteur 4-aminopipéridine dans les faibles activités observées.

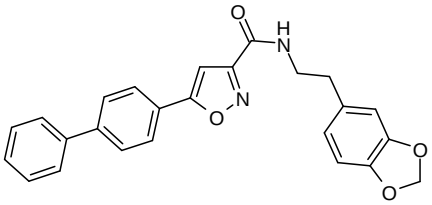
Les composés de la série B, à travers les sous-séries B1 et B2, ont, quant à eux permis de dégager des RSA. Ainsi, le noyau 4-biphényle présent en C5 de l'hétérocycle isoxazole est nécessaire à l'activité puisqu'aucun composé possédant un groupement différent en cette position n'a présenté d'affinité intéressante pour l'enzyme. De même la substitution en 4 de ce noyau biphényle est optimale pour l'activité puisque les isomères de position 2- et 3-biphényle n'ont pas présenté d'activité inhibitrice de la FAAH.

En comparant les sous-séries B1 et B2, l'importance du groupement porté par l'azote de la fonction carboxamide a été mis en évidence. En effet, les composés de la sous-série B2, possédant un groupement de type éthylbenzodioxol, ont obtenu de meilleures activités que les composés de la sous-série B1 portant un groupement propylphényle. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'une interaction supplémentaire existait entre la protéine et le groupement éthylbenzodioxol. Grâce à des études de modélisation moléculaire réalisées sur les composés **86** et **95** obtenant les meilleurs résultats dans leurs sous-séries respectives, nous avons mis en évidence l'existence potentielle d'une liaison hydrogène s'établissant entre l'un des atomes d'oxygène du groupement benzodioxol et la Gln273.



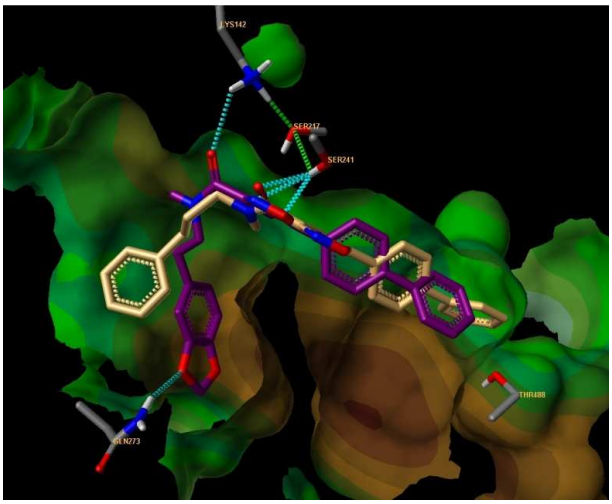
86

FAAH : CI_{50} = 501 nM



95

FAAH : CI_{50} = 88 nM



Par la suite, nous avons également étudié l'influence de la longueur de chaîne séparant l'azote de la fonction carboxamide du noyau terminal (phényle ou benzodioxol) en synthétisant les homologues inférieurs des composés **86** et **95**. Ces composés n'ayant pas présenté d'affinité, il sera intéressant par la suite de synthétiser les homologues supérieurs de ces composés et d'évaluer leurs propriétés inhibitrices.

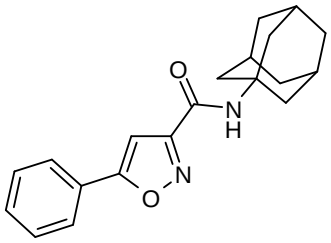
Le composé **95** a ensuite été testé sur un modèle murin de colite induite par le TNBS. En administrant l'inhibiteur 3 jours avant l'induction de la colite par voie IP, nous avons pu mettre en évidence les capacités du composé à traiter la colite. En effet, les dommages du côlon ont largement été diminués chez les souris ayant reçu le composé **95** et les cytokines pro-inflammatoires habituellement secrétées en cas de colite (TNF-α et IL1-β), ont retrouvé des taux endogènes quasi-normaux.

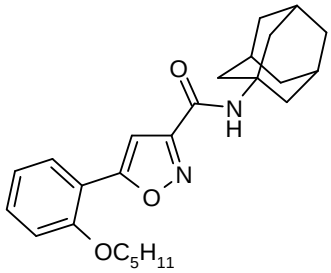
L'étude de la dégradation du produit **95** en milieu hépatique a également été réalisée et a montré que le composé avait une clairance correcte (114 µL/min/mg) et un temps de demi-vie de 25 minutes. Par ailleurs après 40 minutes de contact avec les microsomes, 30 % de la dose initiale de **95** restent disponibles. L'administration par voie orale de ce composé semble donc possible. Par conséquent, nous envisageons

d'administrer oralement notre inhibiteur à des souris dont la colite sera induite trois jours plus tard par l'administration intrarectale de TNBS.

Par ailleurs, nous envisageons également de tester le composé **95** dans un modèle de douleur viscérale.

Des études récentes mettant en évidence que le récepteur CB2 est une cible thérapeutique de choix dans le traitement des MICI, nous ont incités à concevoir une série de molécules mixtes inhibitrices de la FAAH / agonistes des récepteurs CB2. Pour cela, nous avons, dans un premier temps, synthétisé les composés **110** et **117**.





110	**117**
FAAH : CI_{50} = 500 nM	FAAH > 1000 µM
CB2 : Ki > 3000 nM	CB2 : Ki = 197 nM

Puis, nous avons étudié la position de la chaîne *O*-pentyle en synthétisant les analogues méta et para du composé **117**. Ces composés n'ayant pas présenté d'affinité pour le récepteur CB2, nous avons ensuite étudié la longueur de la chaîne *O*-alkyle ainsi définie en position ortho. Nous espérons ainsi tomber sur une longueur de chaîne satisfaisant à la fois le pharmacophore CB2 et le pharmacophore FAAH.

Ces molécules sont actuellement en cours d'évaluation sur les différentes cibles. S'il s'avère que l'un des nos composés possède un profil mixte inhibiteur de FAAH, agoniste des récepteurs CB2, nous pourrons envisager de le tester *in vivo*, dans un modèle murin de colite induite par le TNBS.

La poursuite des travaux nécessite donc dans un premier temps d'évaluer l'affinité de ces composés pour l'une ou l'autre des cibles (FAAH ou CB2), mais également de définir la fonctionnalité de nos molécules vis-à-vis du récepteur CB2.

Une dernière sous-série, la sous-série B3 avait également été envisagée. La majorité des molécules composant cette série possède un carbone asymétrique. Nous envisageons donc dans un premier temps de

tester le mélange racémique et, dans le cas où l'un des composés présenterait de bonnes affinités pour la FAAH, d'effectuer la séparation des énantiomères par CLHP, au laboratoire de chimie analytique. Nous pourrons ainsi conclure quant à une éventuelle énantiosélectivité de l'enzyme.

Enfin, il nous reste à déterminer les CI_{50} des 20 composés issus du criblage virtuel qui ont inhibé la FAAH à un pourcentage de plus de 60 % à 10^{-3} M. Nous espérons ainsi constater l'émergence d'un chef de file qui nous servira de base pour la conception d'une nouvelle série chimique de molécules inhibitrices de la FAAH.

INDICATIONS GENERALES

Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La pureté des produits de synthèse est contrôlée par chromatographie sur couche mince sur des plaques de gel de silice $60F_{254}$ d'épaisseur 0.2 mm (réf. 5735 Merck).

Révélation : UV (254 et 366 nm) pour des produits avec liaisons conjuguées, ninhydrine pour les amines, iode dans tous les cas, réactif de Dragendorff pour les composés comportant un atome d'azote hétérocyclique.

Chromatographie sur colonne

Les purifications par chromatographie sur colonne sont réalisées sur gel de silice 60, granulométrie 0.040-0.063 mm (réf. 9385.5000 Merck). L'éluant est choisi de façon à obtenir un Rf compris entre 0.20 et 0.25 sur plaques de CCM.

Les purifications par chromatographie sur couche épaisse sont réalisées sur gel de silice $60F_{254}$, (réf. 1.07730.1000 Merck) déposé sur une plaque de verre (20 × 20 cm). L'éluant est choisi de façon à obtenir un Rf compris entre 0.30 et 0.35 sur plaques de CCM.

Points de fusion

Les points de fusion sont déterminés à l'aide d'un appareil Büchi SMP 20. Ils sont exprimés en degrés Celsius (°C) et ne sont pas corrigés.

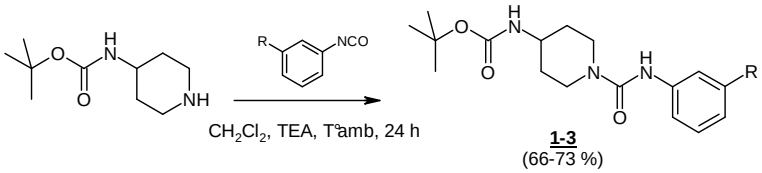
Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ^{1}H sont enregistrés à 300 MHz sur un appareil à transformée de Fourier Bruker AC 300P, avec le TMS comme référence interne, dans le laboratoire d'application de RMN du service commun de physico-chimie de l'Université de Lille 2. Les spectres sont enregistrés à température ambiante. Chaque signal est repéré par son déplacement chimique (δ en ppm), son intensité (nombre de H), sa multiplicité (s, singulet ; d, doublet ; dd, doublet dédoublé ; t, triplet ; td, triplet dédoublé ; q, quadruplet, m, massif ou multiplet) et éventuellement par sa constante de couplage (J en Hz). Dans le cas de massifs, celle-ci n'est pas mesurable.

Spectrométrie de Masse (SM)

Tous les composés sont caractérisés par LC-MS. Le chromatographe liquide haute performance (colonne ODS, phase mobile : eau / acétonitrile / acide formique en mode gradient) est couplé à un détecteur de masse de type $APCI^{+}$ (Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique). Les spectres sont enregistrés au Centre Universitaire des Mesures Analytiques de l'Université de Lille 2, sur un appareil Thermo Electron Surveyor MSQ.

Synthèse des composés 1 à 3

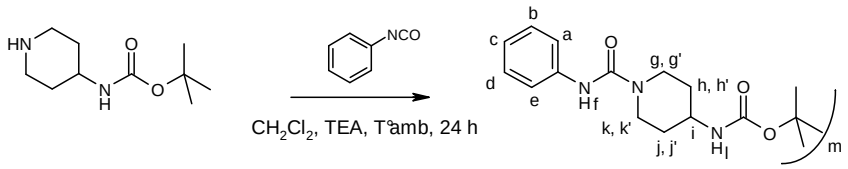


Produits	R	Page
1	H	166
2	CF_3	166
3	NO_2	167

Mode opératoire général

A une solution de 4-*N*-Boc aminopipéridine (500 mg, 2.50 mmol, 1 eq) dans 50 mL de dichlorométhane sont ajoutés l'isocyanate (3.00 mmol, 1.2 eq) et la triéthylamine (0.69 mL, 5.00 mmol, 2 eq) dilués dans 10 mL du même solvant.
Le milieu réactionnel est alors agité pendant 24 h à température ambiante.
Il est ensuite lavé par une solution aqueuse d'acide citrique à 5 % puis par de l'eau. La phase organique est séchée, évaporée sous vide puis le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (Cyclohexane / AcOEt, 5:5).
Enfin, le produit obtenu est recristallisé dans l'acétonitrile.

N-{1-[(3-anilino)carbonyl]-4-pipéridyl}carbamate de *tert*-butyle



1

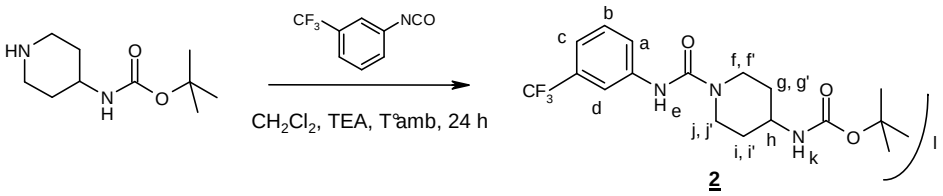
$C_{17}H_{25}N_3O_3$
M = 319.19 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 66 %. ***Rf*** : 0.47 (Cyclohexane/AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 197 - 198 °C. ***Recristallisation :*** Acétonitrile.

RMN ^{1}H CDCl$_3$: δ (ppm) : 8.90 : Hf (s, 1H); 7.67 : Hl (sl, 1H); 7.29 - 7.36 : Ha, Hb, He, Hd (m, 4H); 7.04 : Hc (t, J = 7.0, Hz, 1H); 4.64 : Hi (sl, 1H); 4.02 : Hg et Hk (d, J = 13.5 Hz, 2H); 3.06 Hh et Hj (t, J = 11.3 Hz, 2H); 2.08 : Hg' et Hk' (d, J = 10.2 Hz, 2H); 1.47 : Hm (s, 9H); 1.34 : Hh' et Hj' (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 320 $(M+H)^+$.

N-{1-[(3-trifluorométhylanilino)carbonyl]-4-pipéridyl}carbamate de *tert*-butyle



2

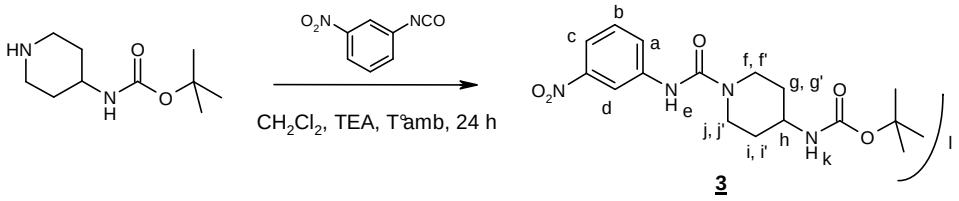
$C_{18}H_{24}F_3N_3O_3$
M = 387.40 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 73 %. ***Rf*** : 0.51 (Cyclohexane/AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 220 - 221 °C. ***Recristallisation :*** Acétonitrile.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.86 : He (s, 1H); 7.91 : Hd (s, 1H); 7.73 : Hc (d, J = 8.2 Hz, 1H); 7.44 : Hb (t, J = 8.2 Hz, 1H); 7.23 : Ha (d, J = 7.9 Hz, 1H); 6.87 : Hk (dl, J = 7.9 Hz, 1H); 4.64 : Hh (sl, 1H); 4.02 : Hf et Hj (dl, J = 13.4 Hz, 2H); 2.88 : Hg et Hi (t, J = 11.7 Hz, 2H); 1.73 : Hf' et Hj' (d, J = 11.1 Hz, 2H); 1.38 : Hl (s, 9H); 1.27 - 1.30 : Hg' et Hi' (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 388 $(M+H)^+$.

N-{1-[(3-nitroanilino)carbonyl]-4-pipéridyl}carbamate de *tert*-butyle



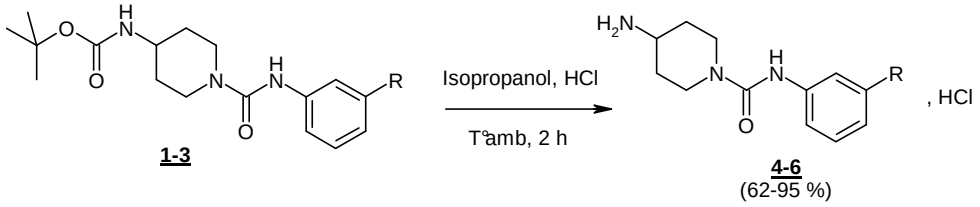
$C_{17}H_{24}N_4O_5$
M = 364,40 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 73 %. ***Rf*** : 0.36 (Cyclohexane/AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 201 - 202 °C. ***Recristallisation :*** Acétonitrile.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 9.03 : He (s, 1H); 8.47 : Hd (s, 1H); 7.88 : Hc (d, J = 7.9 Hz, 1H); 7.76 : Ha (d, J = 8.2 Hz, 1H); 7.52 : Hb (t, J = 8.0 Hz, 1H); 6.94 : Hk (dl, J = 8.4 Hz, 1H); 4.66 : Hh (sl, 1H); 4.04 : Hf et Hj (d, J = 13.4 Hz, 2H); 2.90 : Hg et Hi (t, J = 11.7 Hz, 2H); 1.74 : Hf'et Hj' (d, J = 10.8 Hz, 2H); 1.38 : Hl (s, 9H); 1.24 - 1.31 : Hg' et Hi' (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 297 $(M+H)^+$.

Synthèse des composés 4 à 6

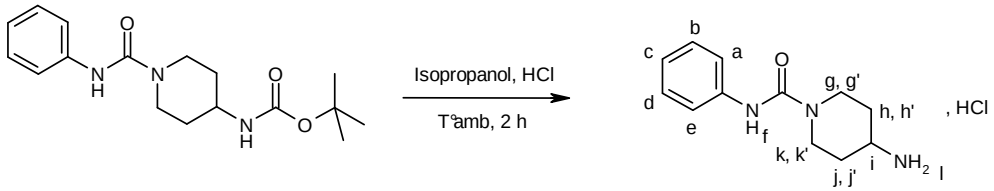


Produits	R	Page
4	H	169
5	CF_3	169
6	NO_2	170

Mode opératoire général

A une solution de composé **1**, **2** ou **3** (400 mg, 1 eq) dans un minimum de méthanol, sont ajoutés 30 mL d'une solution isopropylique saturée en HCl. Après 2 h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé et 30 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés au résidu dissous dans un minimum d'éthanol. Après quelques heures d'agitation, le précipité formé est filtré puis séché.

Chlorhydrate de *N*-phényl-4-amino-1-pipéridinecarboxamide



1 **4**

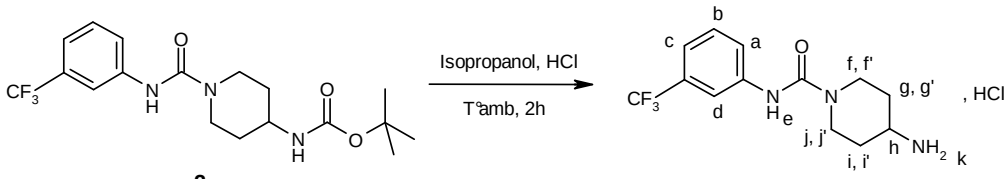
$C_{12}H_{17}N_3O$, HCl
M = 255.78 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 62 %. ***Rf*** : 0.14 (Cyclohexane/AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 242 - 243 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.59 : Hf (s, 1H); 8.06 Hl (s, 3H); 7.43 : Ha et He (d, J = 7.6 Hz, 2H); 7.22 : Hb et Hd (t, J = 7.9 Hz, 2H); 6.92 : Hc (t, J = 7.3 Hz, 1H); 4.67 : Hi (sl, 1H); 4.13 : Hg et Hk (d, J = 13.4 Hz, 2H); 2.84 : Hh et Hj (t, J = 12.0 Hz, 2H); 1.91 : Hg' et Hk' (d, J = 10.2 Hz, 2H); 1.42 : Hh' et Hj' (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 220 $(M+H)^+$.

Chlorhydrate de *N1*-[3(trifluorométhyl)phényl]-4-amino-1-pipéridinecarboxamide



2 **5**

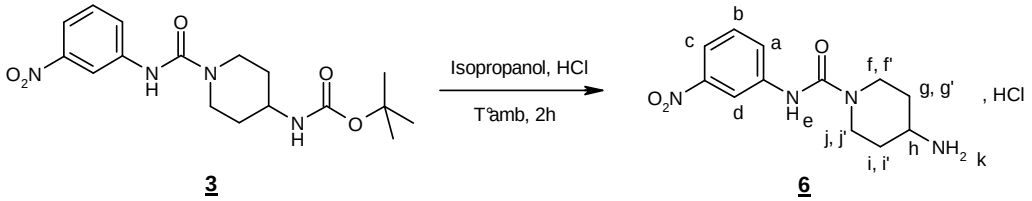
$C_{13}H_{16}F_3N_3O$, HCl
M = 323.78 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 86 %. ***Rf*** : 0.14 (CH_2Cl_2 / MeOH, 9:1). ***Point de fusion :*** 216 - 217 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.97 : He (s, 1H); 8.00 : Hk (sl, 3H); 7.91 : Hd (s, 1H); 7.73 : Hc (d, J = 8.2 Hz, 1H); 7.46 : Hb (t, J = 7.9 Hz, 1H); 7.26 : Ha (d, J = 7.6 Hz, 1H); 4.68 : Hh (sl, 1H); 4.14 : Hf et Hj (d, J = 13.4 Hz, 2H); 2.88 : Hg et Hi (t, J = 10.8, 2H); 1.91 : Hf' et Hj' (d, J = 9.6 Hz, 2H); 1.42 - 1.49 : Hg' et Hi' (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 288 $(M+H)^+$.

Chlorhydrate de *N1*-(3-nitrophényl)-4-amino-1-pipéridinecarboxamide



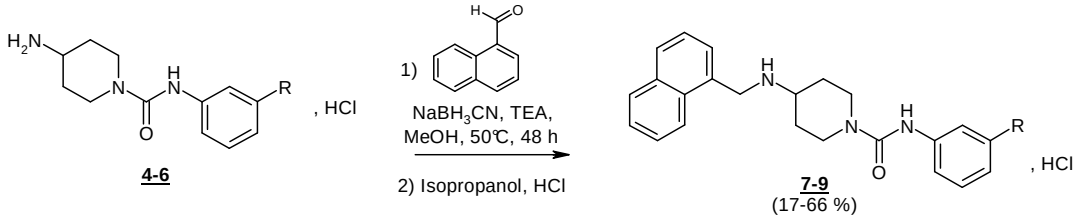
$C_{12}H_{16}N_4O_3$, HCl
M = 300.78 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 95 %. ***Rf*** : 0.05 (CH_2Cl_2 / MeOH, 9:1). ***Point de fusion :*** 237 - 238 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 9.22 : He (s, 1H); 8.49 : Hd (s, 1H); 8.16 : Hk (sl, 3H); 7.91 : Hc (d, J = 8.2 Hz, 1H); 7.77 : Ha (d, J = 8.2 Hz); 7.54 : Hb (t, J = 8.2 Hz); 4.64 : Hh (sl, 1H); 4.17 : Hf et Hj (d, J = 13.4 Hz, 2H); 2.89 : Hg et Hi (t, J = 12.2 Hz, 2H); 1.93 : Hf' et Hj' (d, J = 10.5 Hz, 2H); 1.45 - 1.52 : Hg' et Hi' (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 265 $(M+H)^+$.

Synthèse des composés 7 à 9

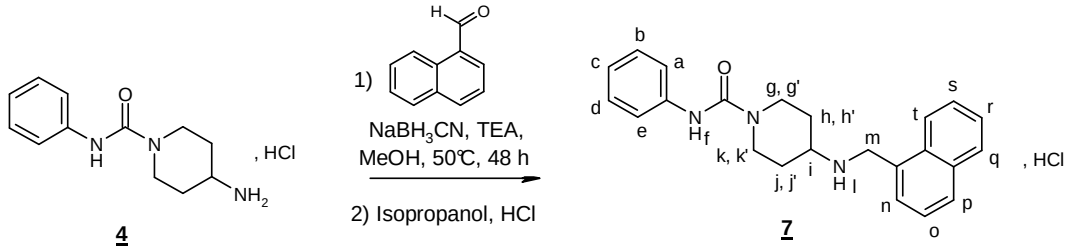


Produits	R	Page
7	H	172
8	CF_3	172
9	NO_2	173

Mode opératoire général

A une solution de 1-naphtaldéhyde (50 mg, 0.32 mmol, 1 eq) dans 50 mL de méthanol anhydre sont ajoutés successivement la triéthylamine (0.068 mL, 0.48 mmol, 1.5 eq) et le composé **4**, **5** ou **6** (0.48 mmol, 1.5 eq). Après l'introduction dans le milieu de tamis moléculaire 3 Å, le mélange est porté à 50 °C et agité 4 h sous atmosphère inerte.
Le cyanoborohudrure de sodium est ensuite ajouté goutte à goutte et l'agitation est poursuivie dans les mêmes conditions pendant 48 h.
A la fin de la réaction, le milieu est filtré et le filtrat est concentré sous vide. Le résidu obtenu est ensuite repris par 30 mL d'acétate d'éthyle et lavé par une solution de bicarbonate de sodium à 5 %, par de l'eau puis par une solution de saumure. La phase organique est alors séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous vide.
Le résidu obtenu est purifié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH, 9:1) puis il est chlorhydraté au moyen d'une solution isopropylique saturée en HCl avant d'être recristallisé dans l'éthanol.

Chlorhydrate de *N1*-phényl-4-[(1-naphtylméthyl)amino]-1-pipéridinecarboxamide



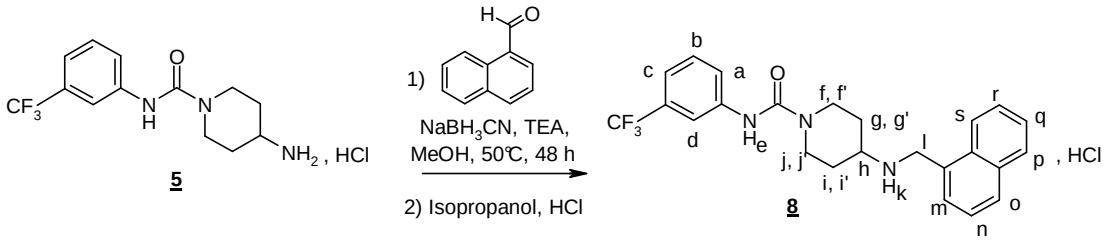
$C_{23}H_{25}N_3O$, HCl
M = 395.98 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 17 %. ***Rf*** : 0.44 (CH_2Cl_2 / MeOH, 9:1). ***Point de fusion :*** 235 - 236 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 9.29 : Hl (sl, 1H); 8.67 : Hf (s, 1H); 8.22 : Ht (d, J = 8.5 Hz, 1H); 8.02 : Hq (d, J = 7.9 Hz, 1H); 7.80 : Hp (d, J = 6.7 Hz, 1H); 7.56 - 7.67 : Ha et He (m, 2H); 7.46 Hn (d, J = 7.9 Hz, 1H); 7.39 : Hs (t, J = 7.2 Hz, 1H); 7.22 : Hb et Hd (t, J = 7.7 Hz, 2H); 6.98 - 7.05 : Ho, Hr et Hm (m, 3H); 6.93 : t, J = 7.2 Hz, 1H); 4.68 : Hi (sl, 1H); 4.26 : Hg et Hk (d, J = 13.2 Hz, 2H); 2.85 : Hh et Hj (t, J = 12.6 Hz, 2H); 2.29 : Hk' et Hg' (d, J = 10.3 Hz, 2H); 2.08 : Hm (s, 2H); 1.63 - 1.74 : Hh' et Hj' (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 260 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

Chlorhydrate de *N1*-[3(trifluorométhyl)phényl]-4-[(1-naphtylméthyl)amino]-1-pipéridinecarboxamide



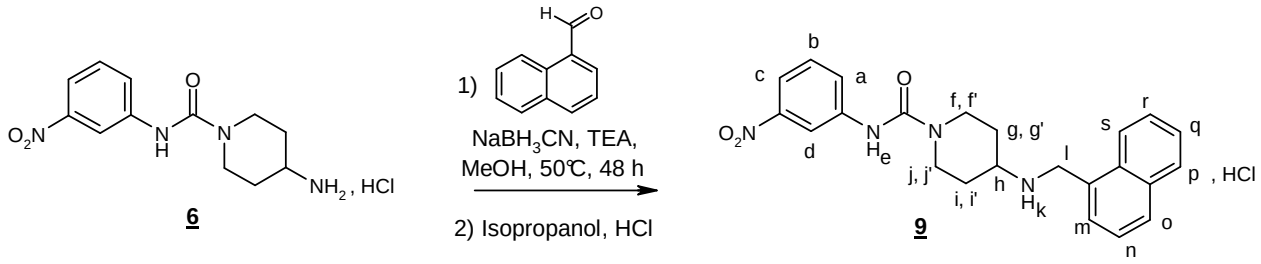
$C_{23}H_{24}N_4O_3$, HCl
M = 463.97 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 66 %. ***Rf*** : 0.58 (CH_2Cl_2 / MeOH, 9:1). ***Point de fusion :*** 232 - 233 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 9.18 : Hk (sl, 1H); 8.57 : He (s, 1H); 8.14 : Hs (d J = 8.4 Hz, 1H); 7.99 : Hd (s, 1H); 7.81 : Hp (d, J = 7.9 Hz, 1H); 7.56 : Ha, Hb et Ho (m, 3H); 7.41 : Hc (d, J = 8.2 Hz, 1H); 7.38 : Hq (t, J = 7.9 Hz, 1H); 7.26 : Hr (t, J = 8.2 Hz, 1H); 7.19 : Hn (t, J = 7.8 Hz, 1H); 6.98 : Hm (d, J = 7.9 Hz, 1H); 4.67 : Hh (sl, 1H); 4.28 : Hf et Hj (d, J = 13.1 Hz, 2H); 2.80 : Hg et Hi (t, J = 12.5 Hz, 2H); 2.33 : Hf' et Hj' (d, J = 10.4 Hz, 2H); 1.74 : Hl (s, 2H); 1.34 - 1.45 : Hg' et Hi' (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 428 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

Chlorhydrate de *N1*-(3-nitrophényl)-4-[(1-napthylméthyl)amino]-1-pipéridinecarboxamide



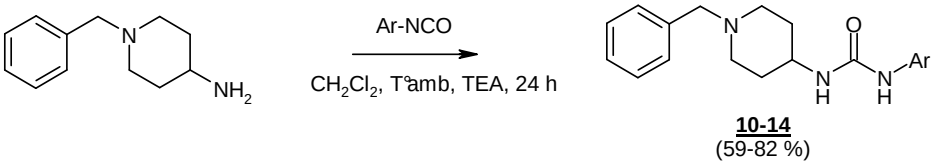
$C_{23}H_{24}N_4O_3$, HCl
M = 440.97 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 59 %. ***Rf*** : 0.55 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 234 - 235 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 9.22 : Hk et He (m, 2H); 8.50 : Hd (s, 1H); 8.21 : Hs (d, J = 8.2 Hz, 1H); 8.03 : Hp et Ha (d, J = 8.5 Hz, 2H); 7.93 : Hc (d, J = 7.9 Hz, 1H); 7.77 - 7.81 : Ho et Hb (m, 2H); 7.50 - 7.69 : Hm, Hn, Hr et Hq (m, 4H); 4.69 : Hh (sl, 1H); 4.28 : Hf et Hj (d, J = 13.1 Hz, 2H); 2.91 : Hg et Hi (t, J = 12.5 Hz, 2H); 2.25 : Hf' et Hj' (d, J = 10.8 Hz, 2H); 2.19 : Hl (s, 2H); 1.67 : Hg' et Hi' (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 405 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

Synthèse des composés 10 à 14

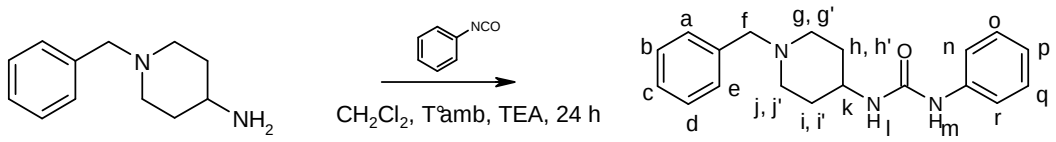


Produits	Ar	Page
10		175
11		175
12		176
13		176
14		177

Mode opératoire général

A une solution de 4-amino-1-benzylpipéridine (0.54 mL, 2.63 mmol, 1eq) dans 20 mL de dichlorométhane, sont ajoutés l'isocyanate (3.16 mmol, 1.2 eq) et la triéthylamine (0.69 mL, 5.26 mmol, 2 eq) dilués dans 5 mL de ce même solvant.
Le milieu réactionnel est ensuite agité pendant 24 h à température ambiante.
Il est ensuite lavé par une solution aqueuse d'acide citrique à 5 % puis par de l'eau. La phase organique est alors séchée, évaporée sous vide puis le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (Cyclohexane / AcOEt, 9:1)

N-(1-Benzyl-3-pipéridyl)-*N'*-phénylurée



10

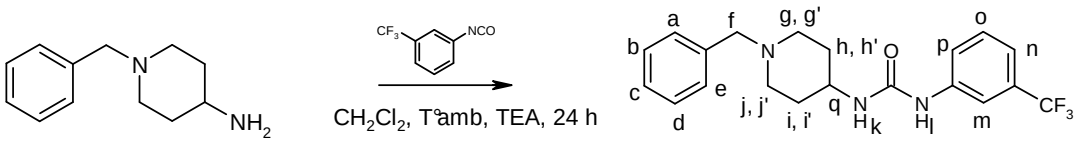
$C_{19}H_{23}N_3O$
M = 309.41 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 59 %. ***Rf*** : 0.14 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 160 - 161 °C.

RMN ^{1}H $CDCl_3$: δ (ppm) : 7.29 - 7.33 : Ha, Hb, Hc, Hd, He, Hn, Ho, Hp, Hq et Hr (m, 10 H); 6.44 : Hm (s, 1H); 4.75 : Hl (d, J = 7.9 Hz, 1H); 3.73 : Hk (m, 1H); 3.52 : Hf (s, 2H); 1.46 - 2.19 : Hg, Hg', Hh, Hh', Hi, Hi', Hj et Hj' (m, 8H)

LC-MS (APCI$^+$) : 310 $(M+H)^+$. Pureté = 96 %.

N-(1-Benzyl-3-pipéridyl)-*N'*-[3-(trifluorométhyl)phényl]urée



11

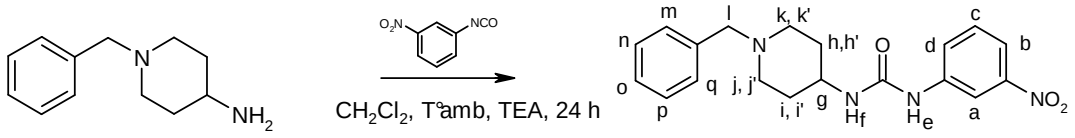
$C_{20}H_{22}F_3N_3O$
M = 377.41 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 72 %. ***Rf*** : 0.48 (CH_2Cl_2 / MeOH, 98:2). ***Point de fusion :*** 121 - 122 °C.

RMN ^{1}H $CDCl_3$: δ (ppm) : 7.93 : Hl (s, 1H) ; 7.74 : Hm (s, 1H) ; 7.55 - 7.71 : Ho et Hp (m, 2H) ; 7.48 : Hb, Hc et Hd (m, 3H) ; 7.41 : Hn (d, J = 8.2 Hz, 1H) ; 7.36 : Ha et He (d, J = 8.4 Hz, 2H) ; 5.86 : Hk (sl, 1H) ; 4.29 - 4.34 : Hq et Hf (m, 3H) ; 3.77 : Hg, Hj, Hh et Hi (m, 4H) ; 3.08 : Hg', Hj', Hh' et Hi' (m, 4H)

LC-MS (APCI$^+$) : 378 $(M+H)^+$. Pureté = 96 %.

N-(1-Benzyl-3-pipéridyl)-*N'*-[3-(nitro)phényl]urée



12

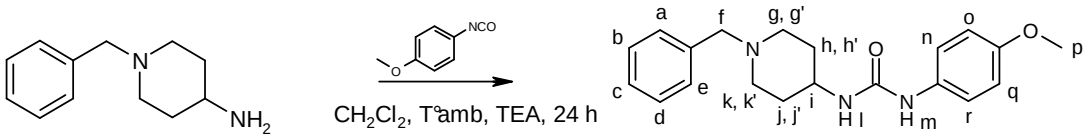
$C_{19}H_{22}N_4O_3$
M = 354.41 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 78 %. ***Rf*** : 0.20 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 146 - 147 °C.

RMN ^{1}H CDCl$_3$: δ (ppm) : 8.89 : He (s, 1H); 8.50 : Ha (s, 1H); 7.72 : Hb (d, J = 8.2 Hz, 1H); 7.59 : Hd (d, J = 8.5 Hz, 1H); 7.48 : Hc (t, J = 8.0 Hz, 1H); 7.23 - 7.34 : Hm, Hn, Ho, Hp et Hq (m, 5H); 6.30 : Hf (d, J = 7.6 Hz, 1H); 3.44 : Hl (s, 2H); 3.29 : Hg (m, 1H); 2.69 : Hj et Hk (d, J = 11.1 Hz, 2H); 2.06 : Hh et Hi (t, J = 10.4 Hz, 2H); 1.79 : Hj' et Hk' (d, J = 10.2 Hz, 2H); 1.43 : Hh' et Hi' (dd, J = 20.1 Hz, j = 10.2 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 355 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

N-(1-Benzyl-3-pipéridyl)-*N'*-[4-(méthoxy)phényl]urée



13

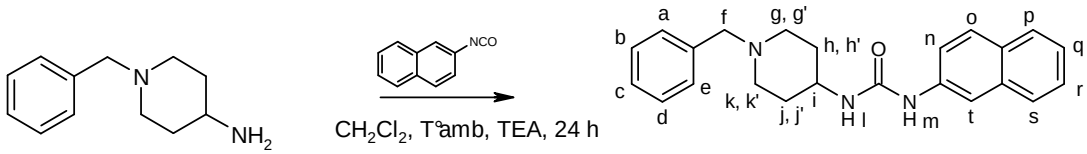
$C_{20}H_{25}N_3O_2$
M = 339.44 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 82 %. ***Rf*** : 0.15 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 138-139 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.15 : Hm (s, 1H); 7.23 - 7.27 : Hb, Hc, Hd, Hn, Ho, Hr et Hq (m, 7H); 6.78 : Ha et He (d, J = 9.1 Hz, 2H); 6.00 : Hl (d, J = 7.6 Hz, 1H); 3.67 : Hp (s, 3H); 3.43 : Hf (s, 2H); 3.29 : Hi (m, 1H); 2.68 : Hg et Hk (d, J = 11.4 Hz, 2H); 2.05 : Hh et Hj (t, J = 9.6 Hz, 2H); 1.77 : Hg' et Hk' (d, J = 10.2 Hz, 2H); 1.35 : Hh' et Hj' (dd, J = 19.8 Hz, j = 10.2 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 340 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

N-(1-Benzyl-3-pipéridyl)-*N'*-(2-naphtyl)urée



14

$C_{23}H_{25}N_3O$
M = 359.48 g/mol
Aspect : solide blanc

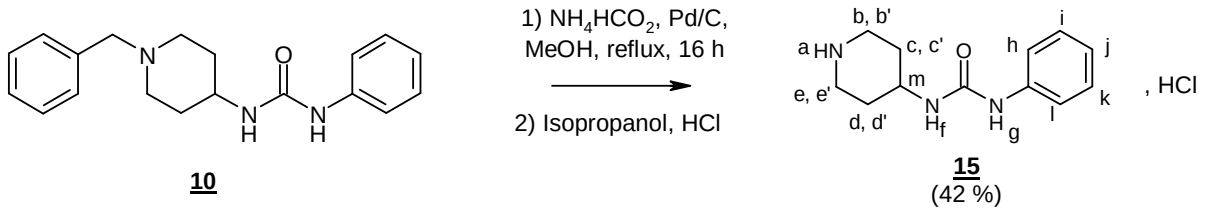
Rendement : 68 %. ***Rf*** : 0.07 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 165 - 166 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.54 : Hm (s, 1H)**;** 7.99 : Ht (s, 1H) ; 7.75 : Ho et Hp (d, J = 8.8 Hz, 2H) ; 7.70 : Hs (d, J = 8.2 Hz, 1H) ; 7.38 - 7.42 : Hr et Hq (m, 2H) ; 7.23 - 7.38 : Hn, Ha, Hb, Hc, Hd et He (m, 6H) ; 6.19 : Hl (d, J = 7.3 Hz, 1H) ; 3.45 : Hf (s, 2H) ; 3.29 : Hi (s, 1H) ; 2.70 : Hg et Hk (d, J = 10.2 Hz, 2H) ; 2.08 : Hh et Hj (t, J = 11.7 Hz, 2H) ; 1.82 : Hg' et Hk' (d, J = 10.2 Hz, 2H) ; 1.40 : Hh' et Hj' (dd, J = 19.9 Hz, j = 9.9 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 360 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

Synthèse du composé 15

1-Phényl-3-pipéridine-4-ylurée



10 **15** (42 %)

$C_{12}H_{17}N_3O$, HCl
M = 255.79 g/mol
Aspect : solide blanc

Mode opératoire

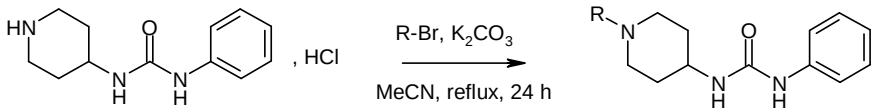
Le formiate d'ammonium (815 mg, 12.9 mmol, 10 eq) et le charbon palladié (200 mg) sont ajoutés à la solution de composé **10** (400 mg, 1.29 mmol, 1eq) dans 50 mL méthanol.
Le milieu réactionnel est ensuite porté à reflux et agité pendant 16 h.
A la fin de la réaction, le milieu est filtré sur célite et lavé plusieurs fois par du méthanol. Ce dernier est ensuite évaporé sous vide et le résidu obtenu est repris par du dichlorométhane.
Le résidu est ensuite lavé par une solution de bicarbonate de sodium à 5 %, puis par une solution de saumure.
La phase organique issue de ces lavages est alors séchée sur sulate de magnésium puis concentrée sous vide. Le résidu ainsi obtenu est ensuite chlorhydraté à l'aide d'une solution isopropylique saturée en HCl.

Rendement : 42 %. ***Rf*** : 0.51 (CH_2Cl_2 / MeOH, 9:1). ***Point de fusion :*** 231 - 232 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.51 : Hg (s, 1H); 7.58 : Hl (d, J = 8.5 Hz, 1H); 7.45 : Hh (d, J = 8.7 Hz, 1H); 6.87 - 7.36 : Hi, Hj et Hk (m, 3H); 6.55 : Hf (dl, J = 7.3 Hz, 1H); 4.26 : Hm (s, 1H); 3.69 : Hb, Hc, He et Hd (m, 4H); 3.09 : He', Hc', Hb' et Hd' (m, 4H); 2.54 : Ha (sl, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 220 $(M+H)^+$.

Synthèse des composés 16 et 17



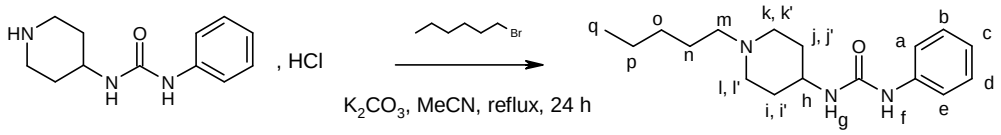
15 **16-17** (16-37 %)

Produits	R	Page
16		**180**
17		**180**

Mode opératoire général

A une solution de composé **10** (70 mg, 0.32 mmol, 1 eq) dans 20 mL d'acétonitrile sont ajoutés successivement le carbonate de potassium (145 mg, 1.05 mmol, 3 eq) et le dérivé bromé (0.35 mmol, 1.1 eq) dilué dans 5 mL du même solvant.
Le milieu réactionnel est ensuite porté à reflux et agité pendant 24 h.
A la fin de la réaction, le milieu est filtré et le filtrat est concentré sous vide. Le résidu obtenu est alors repris par du dichlorométhane et lavé successivement par une solution de bicarbonate de sodium à 5 %, par de l'eau puis par une solution de saumure. La phase organique est enfin séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous vide.
Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur couche épaisse dans un éluant (CH_2Cl_2 / MeOH, 98:2).

N-(1-pentyl-4-pipéridyl)-*N'*-phénylurée



16

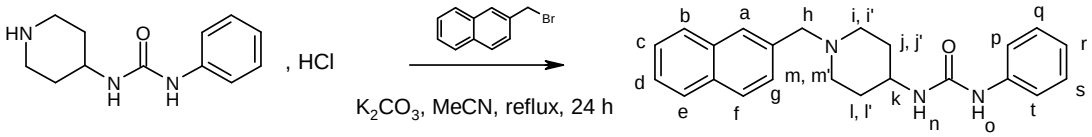
$C_{17}H_{27}N_3O$
M = 289.42 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 37 %. ***Rf*** : 0.49 (CH_2Cl_2 / MeOH, 9:1). ***Point de fusion :*** 161 - 162 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.36 : Hf (s, 1H); 7.35 : Ha et He (d, J = 7.6 Hz, 2H); 7.20 : Hb et Hd (t, J = 7.9 Hz, 2H); 6.87 : Hc (t, J = 7.3 Hz, 1H); 6.25 : Hg (sl, 1H); 3.56 : Hh (sl, 1H); 3.15 : Hm (m, 2H); 2.29 : Hk et Hl (d, J = 10.2 Hz, 2H); 2.19 : Hj et Hi (t, J = 10.1 Hz, 2H); 1.85 : Hk' et Hl' (d, J = 10.2 Hz, 2H); 1.60 : Hj' et Hi' (dd, J = 20.2 Hz, j = 10.1 Hz, 2H); 1.29 - 1.39 : Hn, Ho et Hp (m, 6H); 0.87 : Hq (t, J = 6.9 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 290 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

N-[1-(2-naphtylméthyl)-4-pipéridyl]-*N'*-phénylurée



17

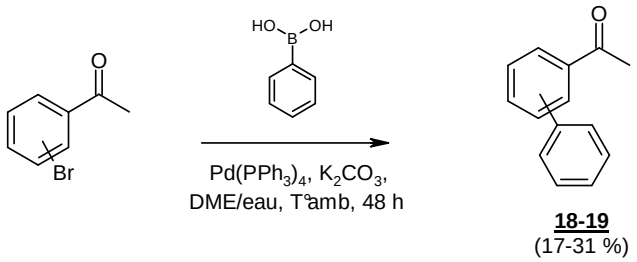
$C_{23}H_{25}N_3O$
M = 359.48 g/mol
Aspect : solide blanc

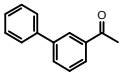
Rendement : 16 %. ***Rf*** : 0.55 (CH_2Cl_2 / MeOH, 9:1). ***Point de fusion :*** 165 - 166 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.75 : Ho (s, 1H); 7.86 : Ha (s, 1H); 7.81 : He et Hf (d, J = 8.7 Hz, 2H); 7.78 : Hb (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.48 - 7.64 : Hc, Hd, Hg, Hp, Hq, Hr, Hs et Ht (m, 8H); 6.20 : Hn (d, J = 7.3 Hz, 1H); 3.54 : Hh (s, 2H); 3.30 : Hk (s, 1H); 2.72 : Hi et Hm (d, J = 10.2 Hz, 2H); 2.08 : Hj et Hl (t, J = 10.3 Hz, 2H); 1.85 : Hi' et Hm' (d, J = 10.4 Hz, 2H); 1.45 : Hj' et Hl' (dd, J = 20.1, j = 10.2 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 360 $(M+H)^+$. Pureté = 96 %.

Synthèse des composés 18 et 19

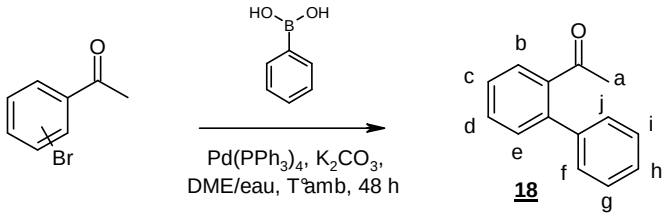


Produits	Structure	Page
18		182
19		182

Mode opératoire général

Au palladium tétrakis (0.06 g, 0.05 mmol, 0.005 eq), sont ajoutés successivement sous agitation, la bromoacétophénone (2.00 g, 10.05 mmol, 1 eq), solubilisée dans 10 mL de DME et l'acide phénylboronique (1.47 g, 12.04 mmol, 1.2 eq) ainsi que le carbonate de potassium (2.08 g, 15.08 mmol, 1.5 eq) solubilisés dans 10 mL d'eau. Le milieu est alors porté à reflux et agité pendant 48 h.
A la fin de la réaction, le milieu est filtré et le filtrat est extrait au dichlorométhane. La phase organique est alors récupérée, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée.
Le résidu obtenu est ensuite purifié sur colonne de gel de silice (Cyclohexane / AcOEt, 5:5).

1-(Biphenyl-2-yl)éthanone



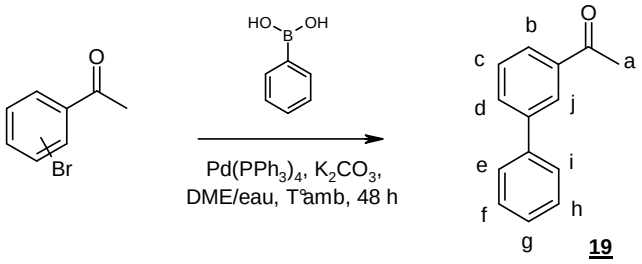
$C_{14}H_{12}O$
M = 196.09 g/mol
Aspect : huile brune

Rendement : 31 %. ***Rf*** : 0.81 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5).

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.60 - 7.28 : Hb, Hc, Hd, He, Hf, Hg, Hh, Hi, Hj (m, 9H); 2.09 : Ha (s, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 197 $(M+H)^+$.

1-(Biphenyl-3-yl)éthanone



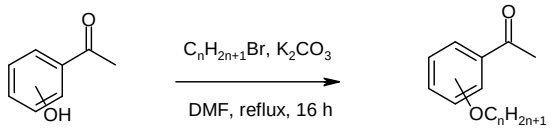
$C_{14}H_{12}O$
M = 196.09 g/mol
Aspect : huile jaune

Rendement : 17 %. ***Rf*** : 0.80 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5).

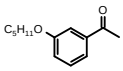
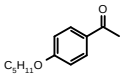
RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.15 : Hj (s, 1H); 7.92 - 7.36 : Hb, Hc, Hd, He, Hf, Hg, Hh, Hi (m, 8H); 2.61 : Ha (s, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 197 $(M+H)^+$.

Synthèse des composés 20 à 26



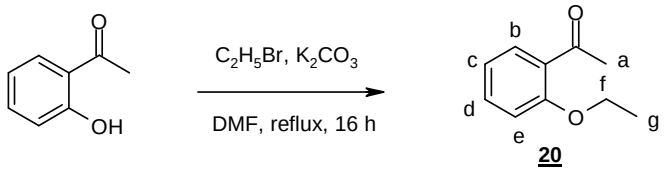
20-26
(59-92 %)

Produits	Structure	Page
20		**184**
21		**184**
22		**185**
23		**185**
24		**186**
25		**186**
26		**187**

Mode opératoire général

L'hydroxyacétophénone (3.00 g, 22.03 mmol, 1 eq), le carbonate de potassium (4.57 g, 33.1 mmol, 1.5 eq) et le dérivé bromé (24.23 mmol, 1.1 eq), sont mis en solution dans 20 mL de DMF. Le mélange est ensuite porté à reflux et agité pendant 16 h. A la fin de la réaction, le milieu est refroidi à température ambiante, puis dilué dans 30 mL d'une soludion de soude 2 N.
La solution est ensuite lavée deux fois par 80 mL d'acétate d'éthyle puis deux fois par 80 mL d'eau. La phase organique est alors séchée sur sulfate de magnésium, puis évaporée. Le produit obtenu est pur et ne nécessite pas de recristallisation.

1-(2-Ethoxyphényl)éthanone



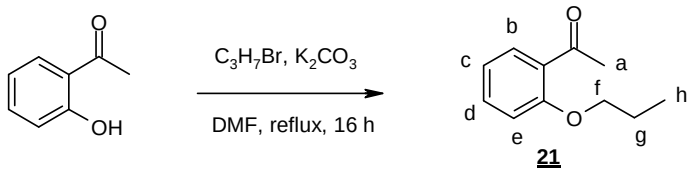
$C_{10}H_{12}O_2$
M = 164.20 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 82 %. ***Rf*** : 0.56 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 27 - 28 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.57 - 7.47 : He et Hc (m, 2H); 7.15 : Hb (d, J = 8.2 Hz, 1H); 6.99 : Hd (t, J = 7.6 Hz, 1H); 4.14 : Hf (q, J = 7.0 Hz, 2H); 2.58 : Ha (s, 3H); 1.39 : Hg (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 165 $(M+H)^+$.

1-(2-Propoxyphényl)éthanone



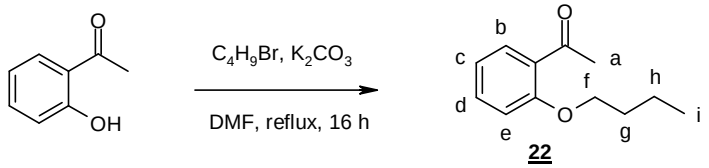
$C_{11}H_{14}O_2$
M = 178.23 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 84 %. ***Rf*** : 0.72 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 27 - 28 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.58 - 7.47 : Hc et He (m, 2H); 7.13 : Hb (d, J = 8.4 Hz, 1H); 6.99 : Hd (t, J = 7.6 Hz, 1H); 4.04 : Hf (t, J = 6.3 Hz, 2H); 2.57 : Ha (s, 3H); 1.78 : Hg (m, 2H); 1.01 : Hh (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 179 $(M+H)^+$.

1-(2-Butoxyphényl)éthanone



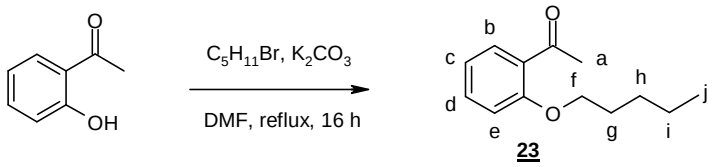
$C_{12}H_{16}O_2$
M = 192.25 g/mol
Aspect : huile brune

Rendement : 79 %. ***Rf*** : 0.47 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3).

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.57 : He (d, J = 6.4 Hz, 1H); 7.49 : Hc (t, J = 7.3 Hz, 1H); 7.11 : Hb (d, J = 8.5 Hz, 1H); 6.97 : Hd (t, J = 7.6 Hz, 1H); 4.06 : Hf (t, J = 6.4 Hz, 2H); 2.82 : Ha (s, 3H); 1.74 : Hg (m, 2H); 1.45 : Hh (m, 2H); 0.92 : Hi (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 193 $(M+H)^+$.

1-(2-Pentyloxyphényl)éthanone



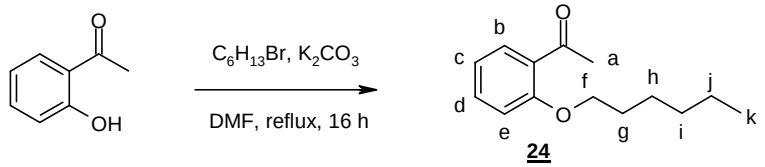
$C_{13}H_{18}O_2$
M = 206.28 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 95 %. ***Rf*** : 0.55 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 29 - 30 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.57 : Hb (d, J = 7.3 Hz, 1H); 7.48 : Hd (t, J = 7.9 Hz, 1H); 7.10 : He (d, J = 8.2 Hz, 1H); 6.97 : Hc (t, J = 7.3 Hz, 1H); 4.04 : Hf (t, J = 6.1 Hz, 2H); 2.55 : Ha (s, 3H); 1.75 : Hg (m, 2H); 1.44 - 1.23 : Hh et Hi (m, 4H); 0.87 : Hj (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 207 $(M+H)^+$.

1-(2-Hexyloxyphényl)éthanone



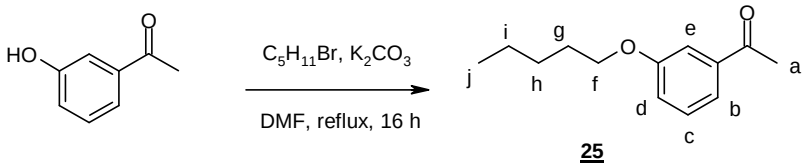
$C_{14}H_{20}O_2$
M = 220.31 g/mol
Aspect : huile jaune

Rendement : 59 %. ***Rf*** : 0.66 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3).

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.52 : He (d, J = 7.6 Hz, 1H); 7.48 : Hc (t, J = 8.5 Hz, 1H); 7.09 : Hb (d, J = 8.2 Hz, 1H); 6.96 : Hd (t, J = 7.6 Hz, 1H); 4.03 : Hf (t, J = 6.4 Hz, 2H); 2.55 : Ha (s, 3H); 1.74 : Hg (m, 2H); 1.43 - 1.22 : Hh, Hi et Hj (m, 6H); 0.84 : Hk (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 221 $(M+H)^+$.

1-(3-Pentyloxyphényl)éthanone



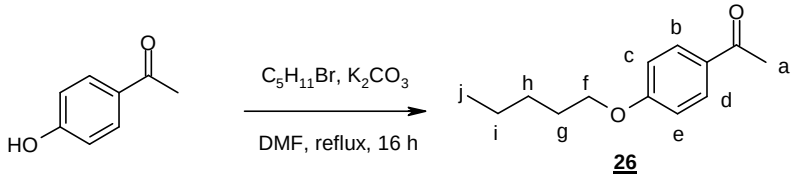
$C_{13}H_{18}O_2$
M = 206.28 g/mol
Aspect : huile brune

Rendement : 90 %. ***Rf*** : 0.76 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3).

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.57 : Hd (d, J = 7.6 Hz, 2H); 7.43 - 7.40 : Hc et He (m, 2H); 7.17 : Hb (d, J = 8.1 Hz, 1H); 3.99 : Hf (t, J = 6.4 Hz, 2H); 3.98 : Ha (s, 3H); 1.12 : Hg (m, 2H); 1.42 - 1.23 : Hh et Hi (m, 4H); 0.88 : Hj (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 207 $(M+H)^+$.

1-(4-Pentyloxyphényl)éthanone



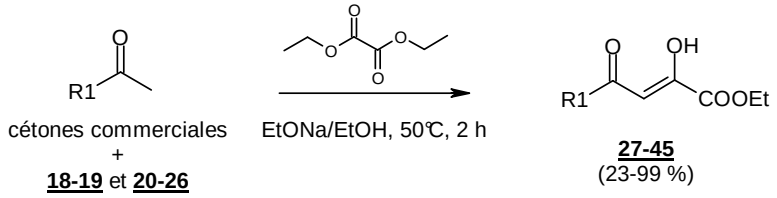
$C_{13}H_{18}O_2$
M = 206.28 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 92 %. ***Rf*** : 0.76 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 31 - 32 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.93 : Hc et He (d, J = 8.7 Hz, 2H); 6.92 : Hb et Hd (d, J = 8.7 Hz, 2H); 4.02 : Hf (t, J = 7.1 Hz, 2H); 2.52 : Ha (s, 3H); 1.81 : Hg (m, 2H); 1.50 - 1.38 : Hh et Hi (m, 4H); 0.94 : Hj (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 207 $(M+H)^+$.

Synthèse des composés 27 à 45

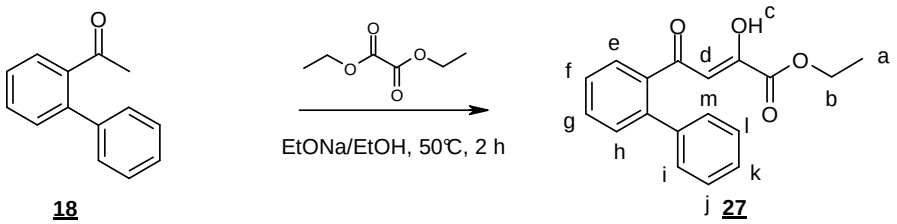


Produits	R1	Page	Produits	R1	Page	Produits	R1	Page
27		184	34	OC_6H_{13}	187	41		191
28		184	35	$C_5H_{11}O$	188	42		191
29	OMe	185	36	$C_5H_{11}O$	188	43		192
30	OC_2H_5	185	37		189	44	F_3C	192
31	OC_3H_7	186	38		189	45		193
32	OC_4H_9	186	39	Br	190			
33	OC_5H_{11}	187	40		190			

Mode opératoire général

A une solution d'éthanolate de sodium fraîchement préparée (obtenue à partir de sodium (1.52 g, 66.04 mmol, 2 eq) dans 50 mL d'éthanol) est ajoutée goutte à goutte à 50 °C une solution de cétone aromatique (33.02 mmol, 1 eq) et d'oxalate de diéthyle (9.56 g, 66.04 mmol, 2 eq) dans 30 mL d'éthanol absolu. Le milieu est ensuite porté à reflux et agité pendant 2 h.
A la fin de la réaction, le solvant est concentré sous vide et le résidu est repris par 100 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1 N pendant 1 h. Puis il est extrait à l'acétate d'éthyle et lavé à l'eau.
La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée sous vide.

(Z)-4-(Biphenyl-2-yl)-2-hydroxy-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



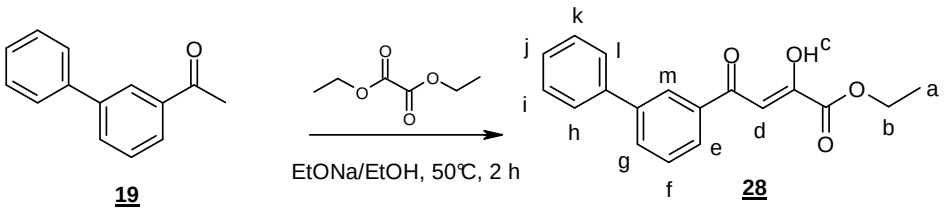
$C_{18}H_{16}O_4$
M = 296.32 g/mol
Aspect : solide brun

Rendement : 37 %. ***Rf*** : 0.74 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 63 - 64 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 7.74 - 7.31 : He, Hf, Hg, Hh, Hi, Hj, Hk, Hl, Hm et Hd (m, 10H); 4.35 : Hb (q, J = 7.2 Hz, 2H); 1.14 : Ha (t, J = 7.1 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 297 $(M+H)^+$.

(Z)-4-(Biphenyl-3-yl)-2-hydroxy-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



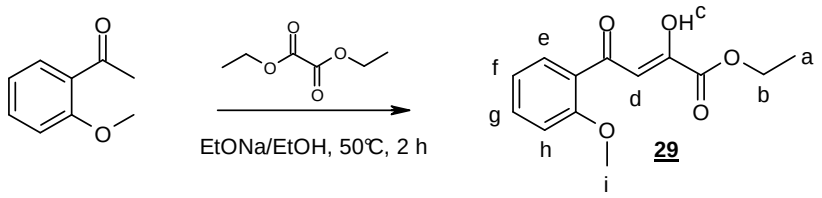
$C_{18}H_{16}O_4$
M = 296.32 g/mol
Aspect : solide brun

Rendement : 83 %. ***Rf*** : 0.47 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 75 - 76 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 8.08 - 6.73 : He, Hf, Hg, Hh, Hi, Hj, Hk, Hl, Hm et Hd (m, 10H); 4.35 : Hb (q, J = 7.0 Hz, 2H); 1.27 : Ha (t, J = 7.1 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 297 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-(2-méthoxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



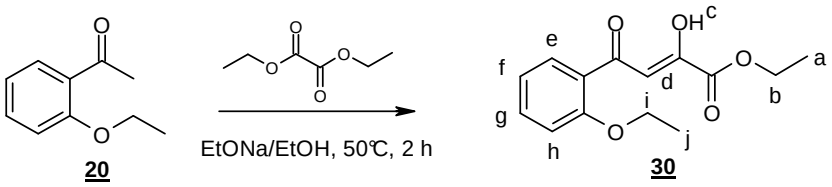
$C_{13}H_{14}O_5$
M = 250.08 g/mol
Aspect : solide orange

Rendement : 74 %. ***Rf*** : 0.55 (Heptane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 28 - 29 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 7.98 : Hh (d, J = 6.4 Hz, 1H); 7.63 : Hf (t, J = 7.3 Hz, 1H); 7.24 - 7.08 : He, Hg et Hd (m, 3H); 4.28 : Hb (q, J = 7.3 Hz, 2H); 3.92 : Hi (s, 3H); 1.29 : Ha (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 251 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-(2-éthoxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



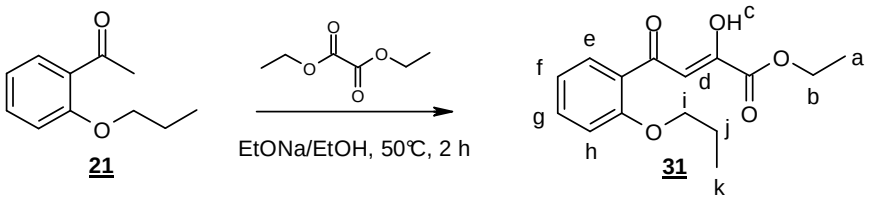
$C_{14}H_{16}O_5$
M = 264.10 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 90 %. ***Rf*** : 0.43 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 75 - 76 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 7.84 : Hh (d, J = 6.7 Hz, 1H); 7.61 : Hf (t, J = 7.3 Hz, 1H); 7.40 : Hd (s, 1H); 7.19 : He (d, J = 8;5 Hz, 1H); 7.09 : Hg (t, J = 7.3 Hz, 1H); 4.32 - 4.16 : Hi et Hb (m, 4H); 1.42 : Hj (t, J = 7.0 Hz, 3H); 1.29 : Ha (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 265 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-(2-propoxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



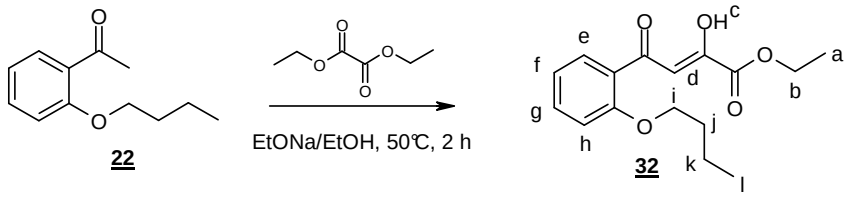
$C_{15}H_{18}O_5$
M = 278.31 g/mol
Aspect : solide orange

Rendement : 59 %. ***Rf*** : 0.52 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 66 - 67 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 7.84 : Hh (d, J = 6.7 Hz, 1H); 7.61 : Hf (t, J = 7.0 Hz, 1H); 7.38 : Hd (s, 1H); 7.20 : He (d, J = 8.5 Hz, 1H); 7.09 : Hg (t, J = 7.6 Hz, 1H); 4.27 : Hb (q, J = 7.0 Hz, 2H); 4.10 : Hi (t, J = 6.1 Hz, 2H); 1.82 : Hj (m, 2H); 1.28 : Ha (t, J = 7.3 Hz, 3H); 1.05 : Hk (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 279 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-(2-butoxyphényl)- 4-oxo-2-butènoate d'éthyle



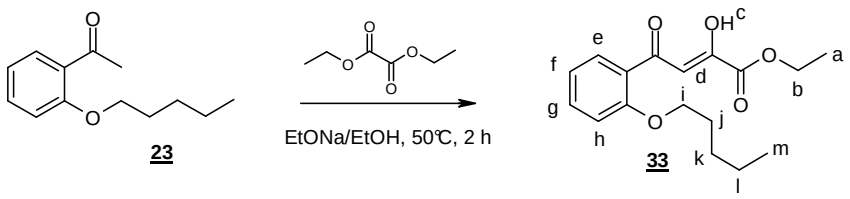
$C_{16}H_{20}O_5$
M = 292.33 g/mol
Aspect : solide marron

Rendement : 33 %. ***Rf*** : 0.53 (Cyclohexane / AcOEt, 8:2). ***Point de fusion :*** 85 - 86 °C.

RMN ^{1}H CDCl$_3$: δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 7.91 : Hh (d, J = 6.1 Hz, 1H); 7.52 - 7.46 : Hf et Hd (m, 2H); 7.03 - 6.96 : He et Hg (m, 2H); 4.36 : Hb (q, J = 7.3 Hz, 2H); 4.09 : Hi (t, J = 6.1 Hz, 2H); 1.88 : Hj (m, 2H); 1.57 : Hk (m, 2H); 1.37 : Ha (t, J = 8.2 Hz, 3H); 1.03 : Hl (t, J = 6.2 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 293 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-(2-pentyloxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



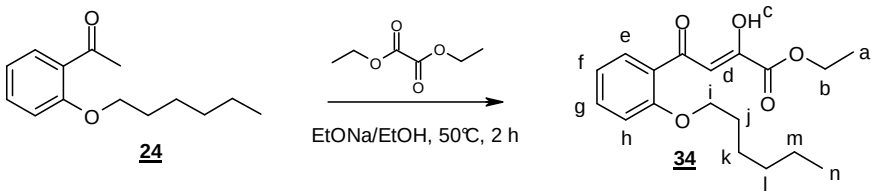
$C_{17}H_{22}O_5$
M = 306.36 g/mol
Aspect : solide marron

Rendement : 62 %. ***Rf*** : 0.59 (Cyclohexane / AcOEt, 8:2). ***Point de fusion :*** 105 - 106 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 7.84 : Hh (d, J = 7.6 Hz, 1H); 7.81 : Hf (t, J = 7.0 Hz, 1H); 7.61 : Hd (s, 1H); 7.58 : He (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.23 : Hg (t, J = 7.6 Hz, 1H); 4.28 : Hb (q, J = 7.4 Hz, 2H); 4.13 : Hi (t, J = 6.4 Hz, 2H); 1.79 : Hj (m, 2H); 1.35 : Hk, Hl et Ha (m, 7H); 0.88 : Hm (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 307 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-(2-hexyloxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



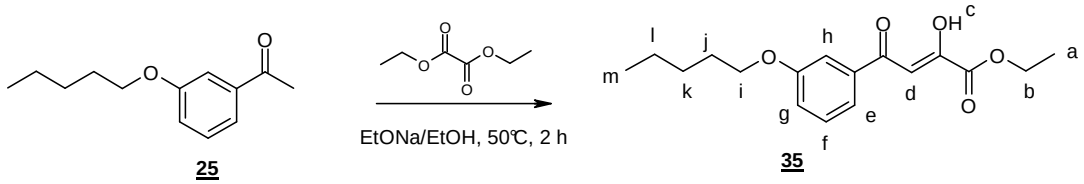
$C_{18}H_{24}O_5$
M = 320.39 g/mol
Aspect : solide marron

Rendement : 31 %. ***Rf*** : 0.69 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 58 - 59 °C.

RMN ^{1}H $CDCl_3$: δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 7.92 : Hh (d, J = 6.1 Hz, 1H); 7.52 - 7.47 : Hf et Hd (m, 2H); 7.06 - 6.96 : He et Hg (m, 2H); 4.37 : Hb (q, J = 7.4 Hz, 2H); 4.09 : Hi (t, J = 6.4 Hz, 2H); 1.90 : Hj (m, 2H); 1.44 - 1.34 : Ha, Hk, Hl et Hm (m, 9H); 0.90 : Hn (t, J = 6.7 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 321 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-(3-pentyloxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



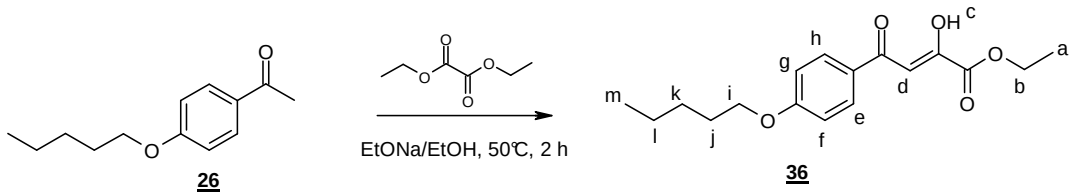
$C_{17}H_{22}O_5$
M = 306.36 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 31 %. ***Rf*** : 0.80 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 45 - 46 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 7.63 : Hh (s, 1H); 7.46 : Hg et Hf (m, 2H); 7.25 : He (d, J = 7.9 Hz, 1H); 7.11 : Hd (s, 1H); 4.19 : Hb (q, J = 7.4 Hz, 2H); 4.04 : Hi (t, J = 6.1 Hz, 2H); 1.38 : Hj et Hk (m, 4H); 1.05 : Ha et Hl (m, 5H); 0.89 : Hm (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 307 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-(4-pentyloxyphényl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



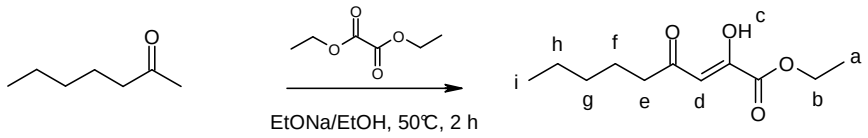
$C_{17}H_{22}O_5$
M = 306.36 g/mol
Aspect : solide marron

Rendement : 23 %. ***Rf*** : 0.54 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 37 - 38 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 7.84 : Hf et Hg (d, J = 7.1 Hz, 2H); 7.81 : He et Hh (d, J = 7.0 Hz, 2H); 7.61 : Hd (s, 1H); 4.28 : Hb (q, J = 7.3 Hz, 2H); 4.13 : Hi (t, J = 6.4 Hz, 2H); 1.45 - 1.35 : Hj, Hk et Ha (m, 7H); 1.12 : Hl (m, 2H); 0.88 : Hm (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 307 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-oxo-2-nonénoate d'éthyle



37

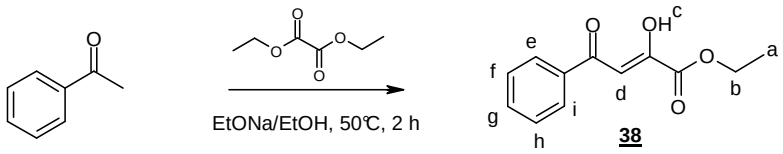
$C_{11}H_{18}O_4$
M = 214.26 g/mol
Aspect : huile jaune

Rendement : 53 %. ***Rf*** : 0.23 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5).

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.65 : Hc (s, 1H); 7.63 : Hd (s, 1H); 4.32 : He (t, J = 6.7 Hz, 2H); 4.28 : Hb (q, J = 7.3 Hz, 2H); 2.64 : Hf (m, 2H); 1.45 - 1.35 : Hg et Hh (m, 4H); 1.22 : Ha (t, J = 7.0 Hz, 3H); 0.89 : Hi (t, J = 6.4 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 215 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-oxo-4-phényl-2-butènoate d'éthyle



38

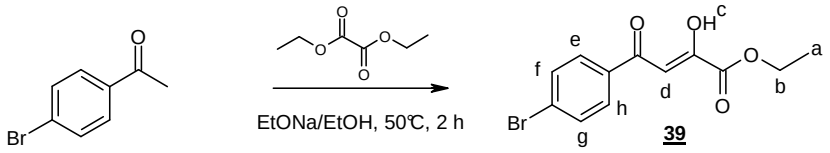
$C_{12}H_{12}O_4$
M = 220.23 g/mol
Aspect : solide orange

Rendement : 75 %. ***Rf*** : 0.56 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 44 - 45°C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 8.02 : He et Hi (d, J= 7.7 Hz, 2H); 7.67 : Hg (t, J= 7.9 Hz, 1H); 7.54 : Hf et Hg (t, J= 7.8 Hz, 2H); 7.08 : Hd (s, 1H); 3.98 : Hb (q, J= 6.4 Hz, 2H); 1.12 : Ha (t, J= 6.4 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 221 $(M+H)^+$.

(Z)-4-(4-Bromophényl)-2-hydroxy-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



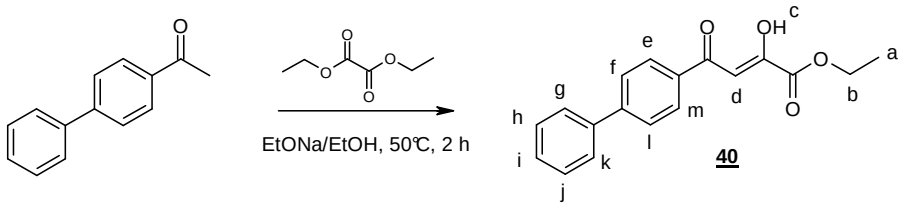
$C_{12}H_{11}BrO_4$
M = 299.12 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 74 %. ***Rf*** : 0.55 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 65 - 66°C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 8.07 - 7.88 : He, Hh, Hf et Hg (m, 4H); 6.99 : Hd (s, 1H); 4.42 : Hb (q, J= 7.2 Hz, 2H); 1.47 (t, J= 7.2 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 299 (M+H) et 301 $(M+H)^{2+}$.

(Z)-4-(Biphényl-4-yl)-2-hydroxy-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



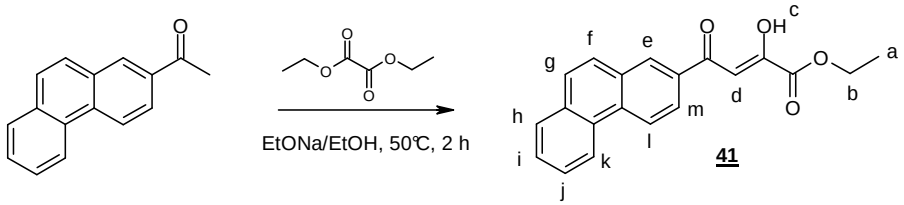
$C_{18}H_{16}O_4$
M = 296.33 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 78 %. ***Rf*** : 0.35 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 111 - 112°C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.65 (s, 1H); 8.10 : He et Hm (d, J= 8.8 Hz, 2H); 7.76 : Hf et Hl (d, J= 8.8 Hz, 2H); 7.70 - 7.64 : Hg et Hk (m, 2H); 7.55 - 7.49 : Hh, Hj et Hi (m, 3H); 7.15 : Hd (s, 1H); 4.46 : Hb (q, J= 7.2 Hz, 2H); 1.47 (t, J= 7.2 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 297 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-oxo-4-(phénantren-2-yl)-2-butènoate d'éthyle



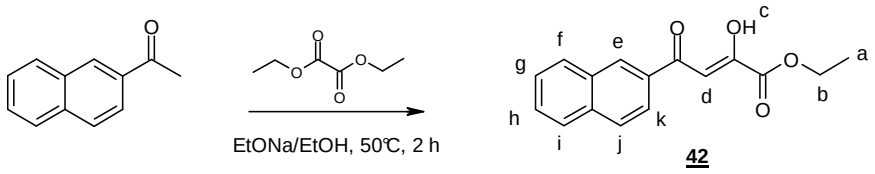
$C_{20}H_{16}O_4$
M = 320.35 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 85 %. ***Rf*** : 0.22 (Cyclohexane / AcOEt, 8:2). ***Point de fusion :*** 116 - 117°C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 8.77 : Hm (d, J= 8.8 Hz, 1H); 8.74 - 8.70 : Hl (m, 1H); 8.55 : He (s, 1H); 8.22 : Hf (dd, J = 8.8 Hz, j = 1.8 Hz, 1H); 7.97 - 7.93 : Hg (m, 1H); 7.84 : Hh et Hk (m, 2H); 7.77 - 7.67 : Hi et Hj (m, 2H); 7.27 : Hd (s, 1H); 4.46 : Hb (q, J = 7.2 Hz, 2H); 1.47 : Ha (t, J = 7.2 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 321 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-(naphtalen-2-yl)-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



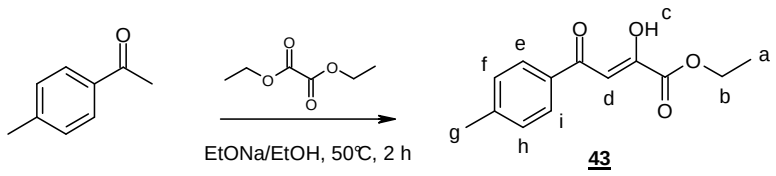
$C_{16}H_{14}O_4$
M = 270.29 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 74 %. ***Rf*** : 0.52 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 79 - 80°C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 8.57 : He (s, 1H); 8.07 - 7.88 : Hk, Hj, Hf et Hi (m, 4H); 7.68 - 7.55 : Hg et Hh (m, 2H); 7.25 : Hd (s, 1H); 4.42 : Hb (q, J = 7.2 Hz, 2H); 1.47 : Ha (t, J = 7.2 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 271 $(M+H)^+$.

(Z)-2-Hydroxy-4-oxo-4-*p*-tolyl-2-butènoate d'éthyle



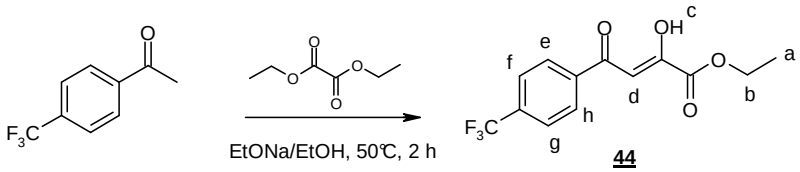
$C_{13}H_{14}O_4$
M = 234.25 g/mol
Aspect : solide orange

Rendement : 57 %. ***Rf*** : 0.56 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 47 - 48°C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.65 : Hc (s, 1H); 7.97 : He et Hi (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.38 : Hh et Hf (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.09 : Hd (s, 1H); 4.30 : Hb (q, J = 7.1 Hz, 2H); 2.37 : Hg (s, 1H); 1.31 : Ha (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 235 $(M+H)^+$.

(Z)-2-hydroxy-4-oxo-4-(4-(trifluorométhyl)phényl)-2-butènoate d'éthyle



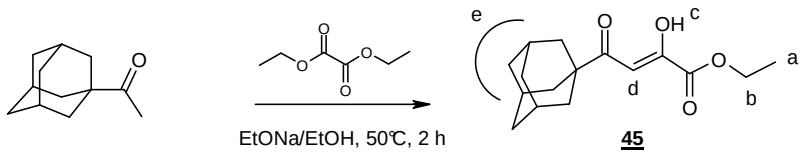
$C_{13}H_{11}F_3O_4$
M = 288.23 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 99 %. ***Rf*** : 0.59 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 50 - 51°C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.68 : Hc (s, 1H); 8.02 : He et Hh (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.64 : Hf et Hg (d, J = 8.2 Hz, 2H); 6.98 : Hd (s, 1H); 4.30 : Hb (q, J = 7.3 Hz, 2H); 1.30 : Ha (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 289 $(M+H)^+$.

(Z)-4-Adamantan-1-yl-2-hydroxy-4-oxo-2-butènoate d'éthyle



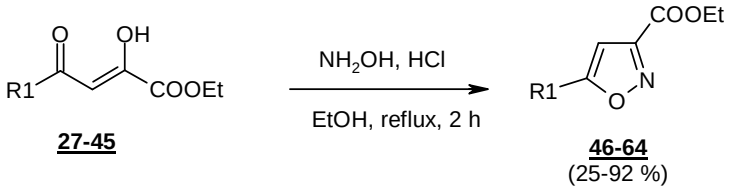
$C_{16}H_{22}O_4$
M = 278.35 g/mol
Aspect : solide orange

Rendement : 45 %. ***Rf*** : 0.13 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 37 - 38°C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.65 : Hc (s, 1H); 6.51 : Hd (s, 1H) ; 4.26 : Hb (q, J = 7.0 Hz, 2H) ; 2.00 - 1.98 : He (m, 1H) ; 1.79 - 1.68 : He (m, 14H) ; 1.27 : Ha (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 279 $(M+H)^+$.

Synthèse des composés 46 à 64

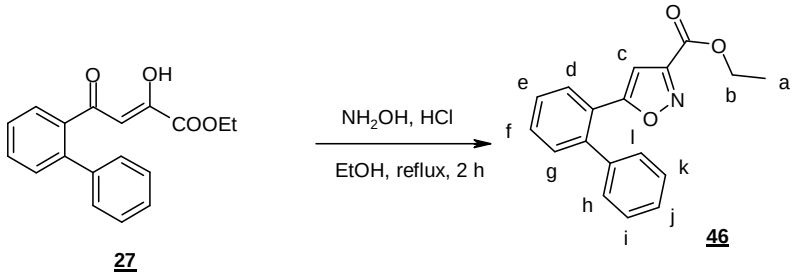


Produits	R1	Page	Produits	R1	Page	Produits	R1	Page
46		195	53	OC_6H_{13}	198	60		202
47		195	54	$C_5H_{11}O$	199	61		202
48	OMe	196	55	$C_5H_{11}O$	199	62		203
49	OC_2H_5	196	56		200	63	F_3C	203
50	OC_3H_7	197	57		200	64		204
51	OC_4H_9	197	58	Br	201			
52	OC_5H_{11}	198	59		201			

Mode opératoire général

A une solution de cétoénol **27** à **45** (7.41 mmol, 1 eq) dans 50 mL d'éthanol absolu est ajouté le chlorhydrate d'hydroxylamine (515 mg, 7.41 mmol, 1 eq). Le milieu est ensuite porté à reflux et agité pendant 2 h.
A la fin de la réaction, le solvant est concentré sous vide et le résidu obtenu est recristallisé dans l'éthanol.

5-(Biphényl-2-yl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



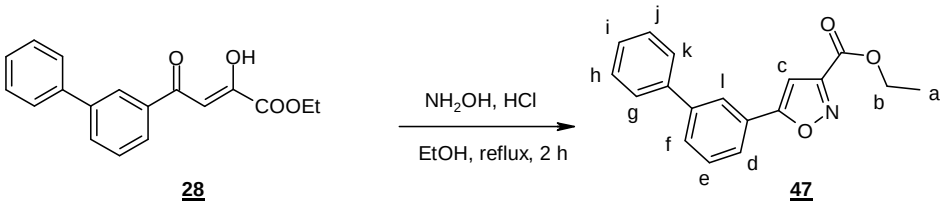
$C_{18}H_{15}NO_3$
M = 293.33 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 74 %. ***Rf*** : 0.66 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 72 - 73°C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H CDCl$_3$: δ (ppm) : 7.89 : Hd (d, J = 7.0 Hz, 1H); 7.55 - 7.51 : He et Hf (m, 2H); 7.49 - 7.40 : Hg, Hh, Hl et Hi (m, 4H); 7.30 - 7.25 : Hj et Hk (m, 2H); 5.90 : Hc (s, 1H); 4.38 : Hb (q, J = 7.3 Hz, 2H); 1.39 : Ha (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 294 $(M+H)^+$.

5-(Biphényl-3-yl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



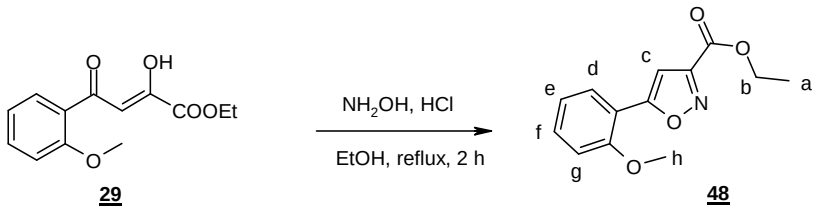
$C_{18}H_{15}NO_3$
M = 293.33 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 60 %. ***Rf*** : 0.69 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 75 - 76°C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.26 : Hl (s, 1H); 7.96 - 7.42 : Hd, He, Hf, Hg, Hh, Hi, Hj et Hk (m, 8H); 7.78 : Hc (s, 1H); 4.42 : Hb (q, J = 7.3 Hz, 2H); 1.36 : Ha (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 294 $(M+H)^+$.

5-(2-Méthoxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



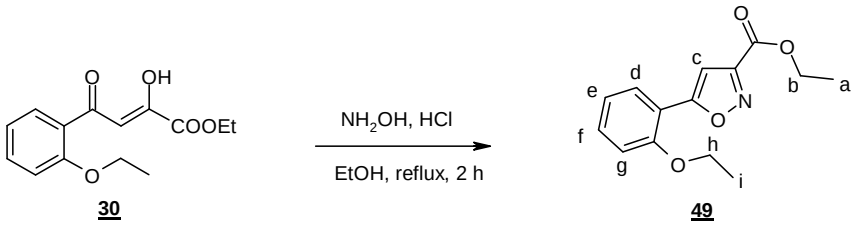
$C_{13}H_{13}NO_4$
M = 247.08 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 74 %. ***Rf*** : 0.71 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 62 - 63°C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.90 : Hg (dd, J = 7.9 Hz, j = 1.4 Hz, 1H); 7.55 : He (td, J = 8.7 Hz, j = 1.4 Hz, 1H); 7.25 : Hd (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.16 - 7.11 : Hf et Hc (m, 2H); 4.38 : Hb (q, J = 7.0 Hz, 2H); 3.97 : Hh (s, 3H); 1.34 : Ha (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 248 $(M+H)^+$.

5-(2-Ethoxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



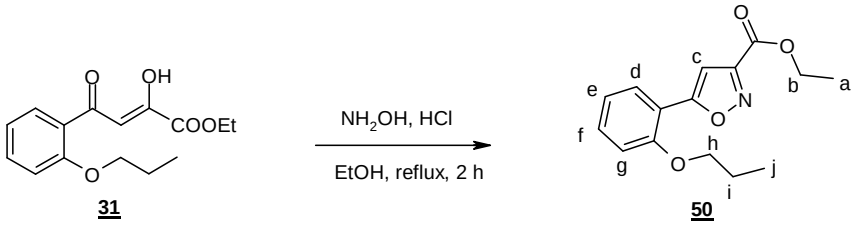
$C_{14}H_{15}NO_4$
M = 261.10 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 29 %. ***Rf*** : 0.70 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 64 - 65°C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.92 : Hg (d, J = 8.0 Hz, 1H); 7.58 : He (t, J = 8.5 Hz, 1H); 7.28 : Hd (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.16 - 7.11 : Hf et Hc (m, 2H); 4.43 : Hb (q, J = 7.2 Hz, 2H); 4.36 : Hh (q, J = 6.7 Hz, 2H); 1.44 : Hi (t, J = 6.4 Hz, 3H); 1.34 : Ha (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 262 $(M+H)^+$.

-(2-Propoxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



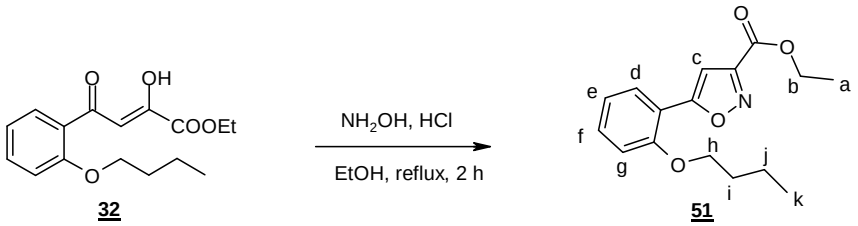
$C_{15}H_{17}NO_4$
M = 275.12 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 65 %. ***Rf*** : 0.55 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 65 - 66°C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.92 : Hg (dd, J = 7.6 Hz, j = 1.2 Hz, 1H); 7.52 : He (td, J = 8.4 Hz, j = 1.4 Hz, 1H); 7.23 : Hd (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.14 - 7.09 : Hf et Hc (m, 2H); 4.38 : Hb (q, J = 7.0 Hz, 2H); 4.14 : Hh (t, J = 6.4 Hz, 2H); 1.83 : Hi (m, 2H); 1.33 : Ha (t, J = 7.3 Hz, 3H); 1.04 : Hj (t, J = 7.6 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 276 $(M+H)^+$.

5-(2-Butoxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



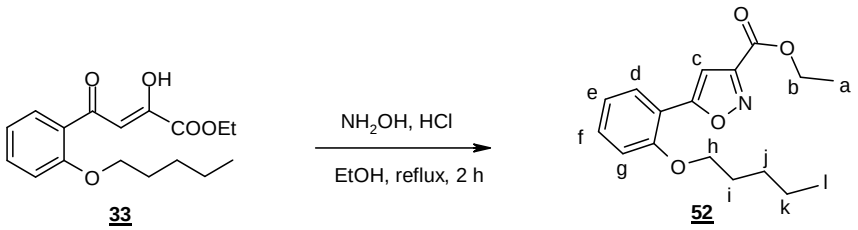
$C_{16}H_{19}NO_4$
M = 289.33 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 54 %. ***Rf*** : 0.60 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 68 - 69 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.91 : Hg (d, J = 6.7 Hz, 1H); 7.52 : He (t, J = 7.3 Hz, 1H); 7.25 : Hd (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.13 - 7.11 : Hf et Hc (m, 2H); 4.38 : Hb (q, J = 7.0 Hz, 2H); 4.17 : Hh (t, J = 6.1 Hz, 2H); 1.81 : Hi (m, 2H); 1.49 : Hj (m, 2H); 1.33 : Ha (t, J = 7.3 Hz, 3H); 0.96 : Hk (t, J = 7.6 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 290 $(M+H)^+$.

5-(2-Pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



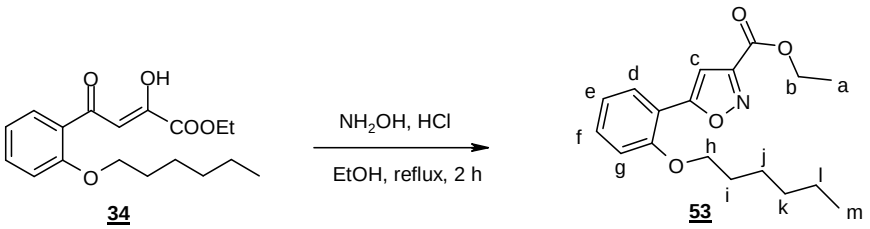
$C_{17}H_{21}NO_4$
M = 303.35 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 38 %. ***Rf*** : 0.61 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 58 - 59 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.91 : Hg (d, J = 6.7 Hz, 1H); 7.52 : He (t, J = 7.3 Hz, 1H); 7.24 : Hd (d, J = 8.5 Hz, 1H); 7.13 - 7.11 : Hf et Hc (m, 2H); 4.38 : Hb (q, J = 7.3 Hz, 2H); 4.16 : Hh (t, J = 6.4 Hz, 2H); 1.83 : Hi (m, 2H); 1.49 - 1.31 : Hj, Hk et Ha (m, 7H); 0.92 : Hl (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 304 $(M+H)^+$.

5-(2-Hexyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



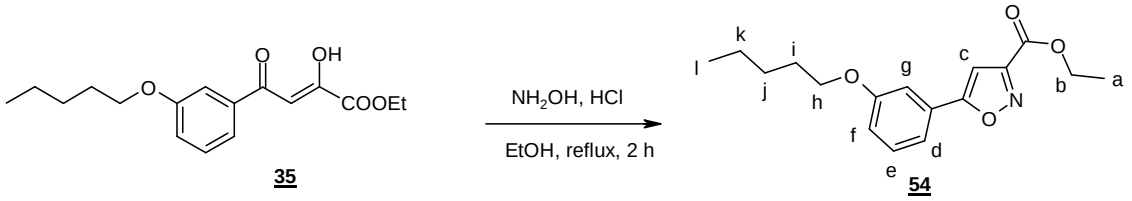
$C_{18}H_{23}NO_4$
M = 317.38 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 53 %. ***Rf*** : 0.54 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 41 - 42 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.91 : Hg (d, J = 6.4 Hz, 1H); 7.52 : He (t, J = 7.3 Hz, 1H); 7.25 : Hd (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.13 - 7.11 : Hf et Hc (m, 2H); 4.38 : Hb (q, J = 7.0 Hz, 2H); 4.17 : Hh (t, J = 6.1 Hz, 2H); 1.82 : Hi (m, 2H); 1.52 - 1.46 : Hj, Hk, Hl et Ha (m, 9H); 0.85 : Hm (t, J = 6.7 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 318 $(M+H)^+$.

5-(3-Pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



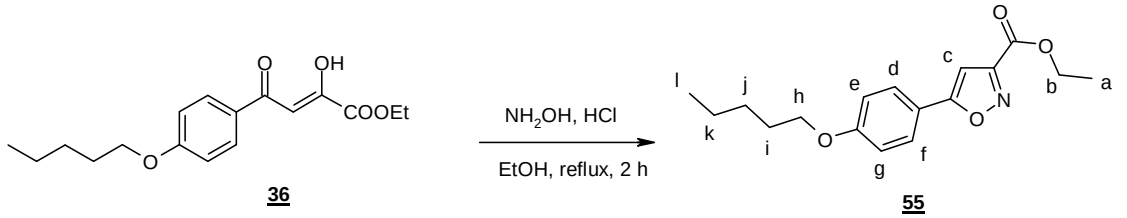
$C_{17}H_{21}NO_4$
M = 303.35 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 27 %. ***Rf*** : 0.61 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 60 - 61 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.58 : Hf (d, J = 6.6 Hz, 1H); 7.54 - 7.48 : Hc, He et Hg (m, 3H); 7.08 : Hd (d, J = 8.5 Hz, 1H); 4.39 : Hb (q, J = 7.2 Hz, 2H); 4.05 : Hh (t, J = 6.4 Hz, 2H); 1.72 : Hi (m, 2H); 1.47 - 1.35 : Ha, Hj et Hk (m, 7H); 0.89 : Hl (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 304 $(M+H)^+$.

5-(4-Pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



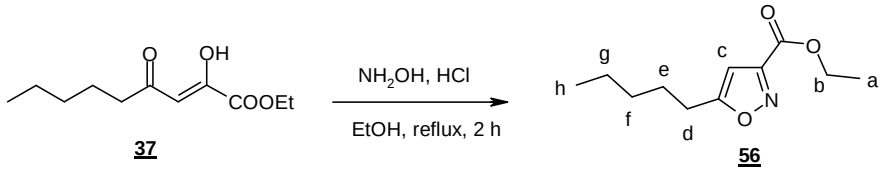
$C_{17}H_{21}NO_4$
M = 303.35 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 60 %. ***Rf*** : 0.66 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 42 - 43 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.73 : He et Hg (d, J = 8.9 Hz, 2H); 6.97 : Hd et Hf (d, J = 8.7 Hz, 2H); 6.79 : Hc (s, 1H); 4.47 : Hb (q, J = 7.3 Hz, 2H); 4.02 : Hh (t, J = 6.4 Hz, 2H); 1.82 : Hi (m, 2H); 1.52 - 1.45 : Ha, Hk et Hj (m, 7H); 0.95 : Hl (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 304 $(M+H)^+$.

5-Pentylisoxazole-3-carboxylate d'éthyle



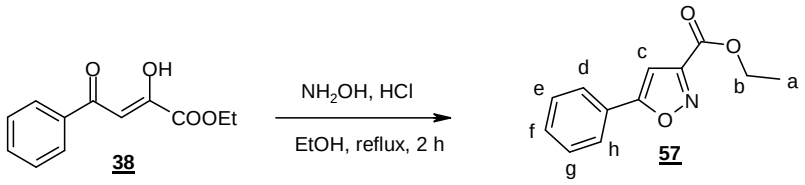
$C_{11}H_{17}NO_3$
M = 211.26 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 25 %. ***Rf*** : 0.72 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 53 - 54 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 6.80 : Hc (s, 1H); 4.28 : Hb (q, J = 7.0 Hz, 2H); 2.67 : Hd (t, J = 6.4 Hz, 2H); 1.76 : He (m, 2H); 1.37 - 1.30 : Hg, Hf et Ha (m, 7H); 0.89 : Hh (t, J = 6.5 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 212 $(M+H)^+$.

5-Phénylisoxazole-3-carboxylate d'éthyle



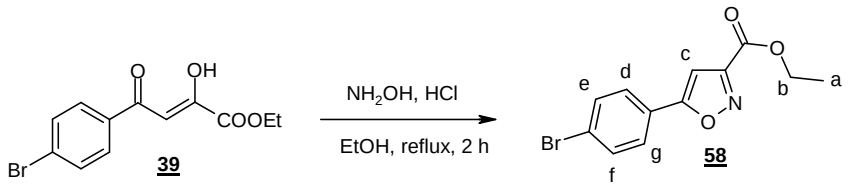
$C_{12}H_{11}NO_3$
M = 217.22 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 82 %. ***Rf*** : 0.67 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 59 - 60 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.52 - 7.48 : Hd, He, Hf, Hg et Hh (m, 5H); 7.13 : Hc (s, 1H); 4.29 : Hb (q, J = 7.3 Hz, 2H); 1.30 : Ha (t, J = 7.2 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 218 $(M+H)^+$.

5-(4-Bromophényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



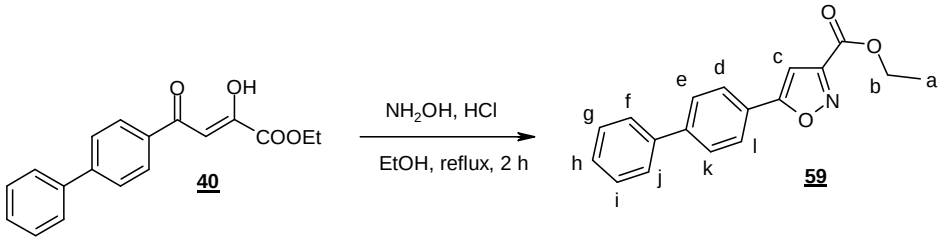
$C_{12}H_{10}BrNO_3$
M = 296.12 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 85 %. ***Rf*** : 0.69 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 133 - 134 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.93 : He et Hf (d, J = 8.5 Hz, 2H); 7.78 : Hd et Hg (d, J = 8.5 Hz, 2H); 7.58 : Hc (s, 1H); 4.39 : Hb (q, J = 7.1 Hz, 2H); 1.34 : Ha (t, J = 7.1 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 296 (M+H) et 298 $(M+H)^{2+}$.

5-(Biphenyl-4-yl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



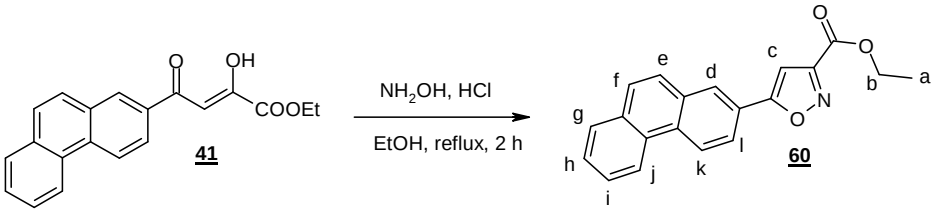
$C_{18}H_{15}NO_3$
M = 293.11 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 87 %. ***Rf*** : 0.55 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 117 - 118 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.30 : Hd et Hl (d, J = 8.5 Hz, 2H); 7.75 : He et Hk (d, J = 8.5 Hz, 2H); 7.48 - 7.46 : Hg, Hh et Hi (m, 3H); 7.25 : Hf et Hj (d, J = 8.5 Hz, 2H); 7.15 : Hc (s, 1H); 4.35 : Hb (q, J = 7.2 Hz, 2H); 1.32 : Ha (t, J = 7.2 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 294 $(M+H)^+$.

5-(Phenantren-2-yl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



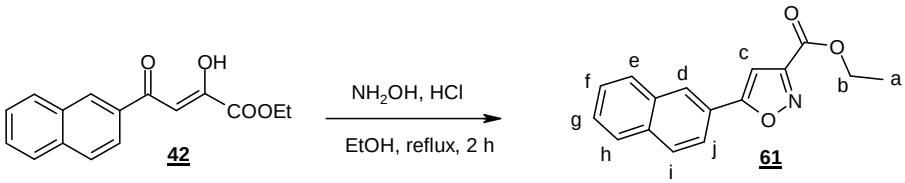
$C_{20}H_{15}NO_3$
M = 317.34 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 90 %. ***Rf*** : 0.62 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 196 - 197 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.75 : Hl et Hk (d, J = 6.4 Hz, 2H); 8.65 : Hd (s, 1H); 8.24 : He (d, J = 9.0 Hz, 1H); 8.13 : Hf et Hg (m, 2H); 8.00 : Hj (d, J = 8.7 Hz, 1H); 7.65 : Hc (s, 1H); 7.59 - 7.56 : Hh et Hi (m, 2H); 4.42 : Hb (q, J = 7.3 Hz, 2H); 1.37 : Ha (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 318 $(M+H)^+$.

5-(Naphtalen-2-yl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



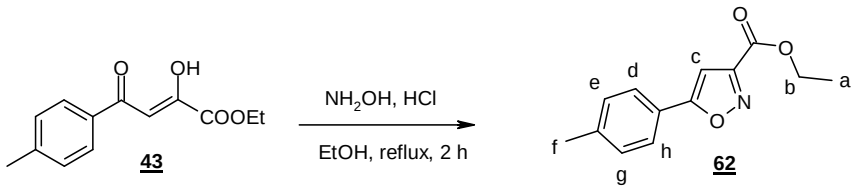
$C_{16}H_{13}NO_3$
M = 267.28 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 92 %. ***Rf*** : 0.66 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 107 - 108 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.60 : Hd (s, 1H); 8.11 - 8.06 : Hj, Hi et Hh (m, 3H); 8.03 - 7.98 : He (m, 1H); 7.64 - 7.62 : Hf et Hg (m, 2H); 7.61 : Hc (s, 1H); 4.41 : Hb (q, J = 7.0 Hz, 2H); 1.37 : Ha (t, J = 7.1 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 268 $(M+H)^+$.

5-*p*-Tolylisoxazole-3-carboxylate d'éthyle



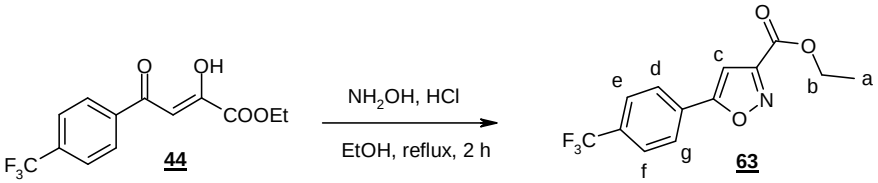
$C_{13}H_{13}NO_3$
M = 231.25 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 86 %. ***Rf*** : 0.67 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 59 - 60 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.84 : Hd et Hh (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.42 : Hc (s, 1H); 7.37 : He et Hg (d, J = 8.0 Hz, 2H); 4.38 : Hb (q, J = 7.1 Hz, 2H); 2.37 : Hf (s, 3H); 1.34 : Ha (t, J = 7.1 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 232 $(M+H)^+$.

5-(4-(Trifluorométhyl)phényl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle



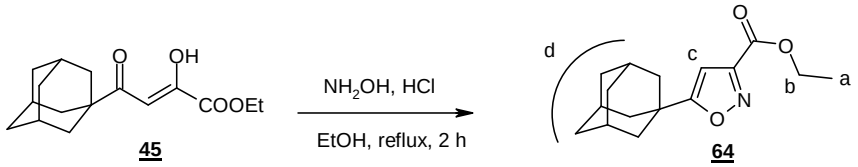
$C_{13}H_{10}F_3NO_3$
M = 285.22 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 73 %. ***Rf*** : 0.67 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 136 - 137 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.42 : Hd et Hg (d, J = 8.2 Hz, 2H); 8.36 : He et Hf (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.85 : Hc (s, 1H); 4.39 : Hb (q, J = 7.2 Hz, 2H); 1.38 : Ha (t, J = 7.2 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 286 $(M+H)^+$.

5-Adamantan-1-ylisoxazole-3-carboxylate d'éthyle



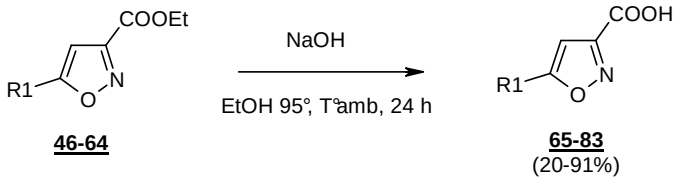
$C_{16}H_{21}NO_3$
M = 275.35 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 85 %. ***Rf*** : 0.79 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 78 - 79 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H $CDCl_3$: δ (ppm) : 6.59 : Hc (s, 1H); 4.33 : Hb (q, J = 6.8 Hz, 2H); 2.02 - 1.72 : Hd (m, 15H); 1.30 : Ha (t, J = 6.7 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 276 $(M+H)^+$.

Synthèse des composés 65 à 83

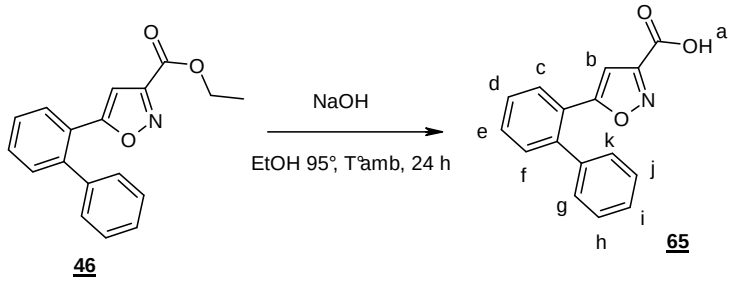


Produits	R1	Page	Produits	R1	Page	Produits	R1	Page
65		206	72	OC_6H_{13}	209	79		213
66		206	73	$C_8H_{11}O$	210	80		213
67	OMe	207	74	$C_8H_{11}O$	210	81		214
68	OC_2H_5	207	75		211	82	F_3C	214
69	OC_3H_7	208	76		211	83		215
70	OC_4H_9	208	77	Br	212			
71	OC_5H_{11}	209	78		212			

Mode opératoire général

A une solution d'ester **46** à **64** (1.35 mmol, 1 eq) dans 50 mL d'éthanol à 95 °, est ajoutée la soude en pastille (540 mg, 13.51 mmol, 10 eq). Le milieu réactionnel est alors agité à température ambiante pendant 24 h.
A la fin de la réaction, le solvant est concentré sous vide et le résidu est repris pendant 1 h dans une solution d'acide chlorhydrique 1 N. Puis il est extrait à l'acétate d'éthyle et lavé à l'eau. La phase organique est alors séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée sous vide pour donner les acides **65** à **83**.

Acide 5-(biphényl-2-yl)isoxazole-3-carboxylique



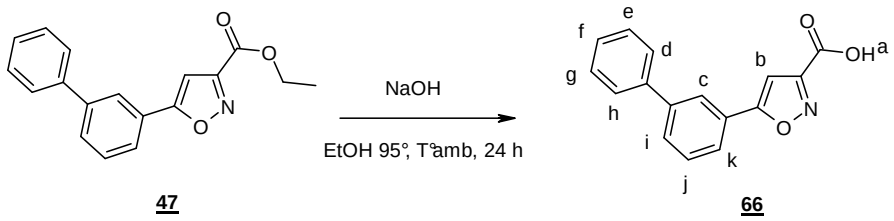
$C_{16}H_{11}NO_3$
M = 265.26 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 88 %. ***Rf*** : 0.87 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 110 - 111 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.79 : Ha (s, 1H); 7.82 : Hk et Hg (d, J = 6.1 Hz, 2H); 7.60 - 7.40 : Hc, Hd, He, Hf et Hh (m, 5H); 7.24 : Hi et Hj (m, 2H); 6.27 : Hb (s, 1H)

LC-MS (APCI$^+$) : 266 $(M+H)^+$.

Acide 5-(biphényl-3-yl)isoxazole-3-carboxylique



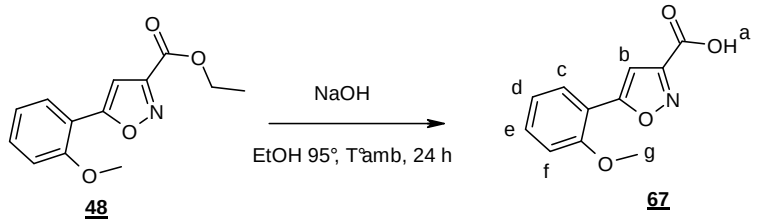
$C_{16}H_{11}NO_3$
M = 265.26 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 75 %. ***Rf*** : 0.61 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 180 - 181 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.79 : Ha (s, 1H); 8.23 : Hc (s, 1H); 7.93 : Hk (d, J = 7.9 Hz, 1H); 7.84 - 7.41 : Hj, Hi, Hh, Hg, Hf, He et Hd (m, 7H); 7.61 : Hb (s, 1H)

LC-MS (APCI$^+$) : 266 $(M+H)^+$.

Acide 5-(2-méthoxyphényl)isoxazole-3-carboxylique



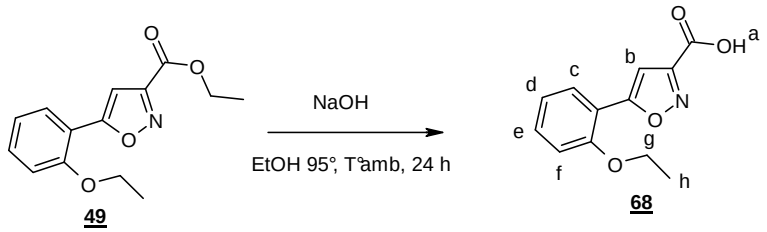
$C_{11}H_9NO_4$
M = 219.19 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 68 %. ***Rf*** : 0.13 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 196 - 197 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.79 : Ha (s, 1H); 7.91 : Hf (dd, J = 7.9 Hz, j = 1.5 Hz, 1H); 7.55 : Hd (td, J = 8.5 Hz, j = 1.5 Hz, 1H); 7.23 : Hc (d, J = 8.2 Hz, 1H); 7.13 : He (t, J = 7.6 Hz, 1H); 7.06 : Hb (s, 1H); 3.96 : Hg (s, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 220 $(M+H)^+$.

Acide 5-(2-éthoxyphényl)isoxazole-3-carboxylique



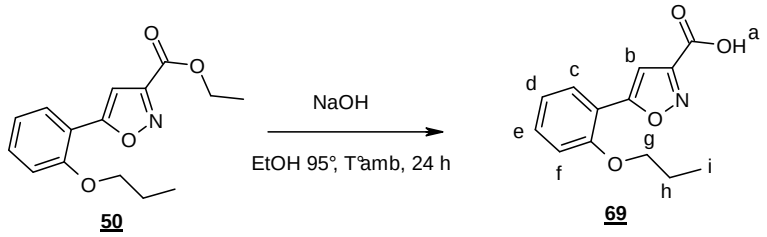
$C_{12}H_{11}NO_4$
M = 233.22 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 45 %. ***Rf*** : 0.14 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 191 - 192 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.79 : Ha (s, 1H); 7.93 : Hf (dd, J = 7.9 Hz, j = 1.5 Hz, 1H); 7.54 : Hd (td, J = 8.4 Hz, j = 1.5 Hz, 1H); 7.25 : Hc (d, J = 8.5 Hz, 1H); 7.15 - 7.07 : He et Hb (m, 2H); 4.26 : Hg (q, J = 6.7 Hz, 2H); 1.46 : Hh (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 234 $(M+H)^+$.

Acide 5-(2-propoxyphényl)isoxazole-3-carboxylique



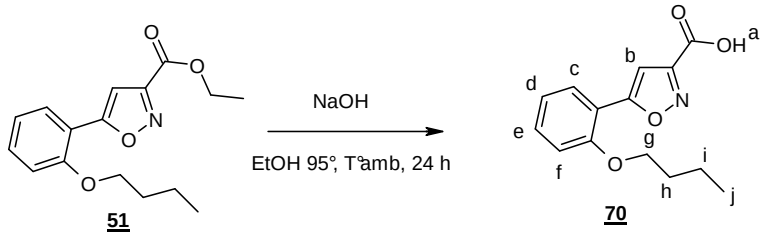
$C_{13}H_{13}NO_4$
M = 247.25 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 69 %. ***Rf*** : 0.18 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 171-172 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.78 : Ha (s, 1H); 7.91 : Hf (dd, J = 7.6 Hz, j = 1.1 Hz, 1H); 7.51 : Hd (td, J = 8.5 Hz, j = 1.5 Hz, 1H); 7.22 : Hc (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.14 - 7.07 : He et Hb (m, 2H); 4.13 : Hg (t, J = 6.4 Hz, 2H); 1.80 : Hh (m, 2H); 1.04 : Hi (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 248 $(M+H)^+$.

Acide 5-(2-butoxyphényl)isoxazole-3-carboxylique



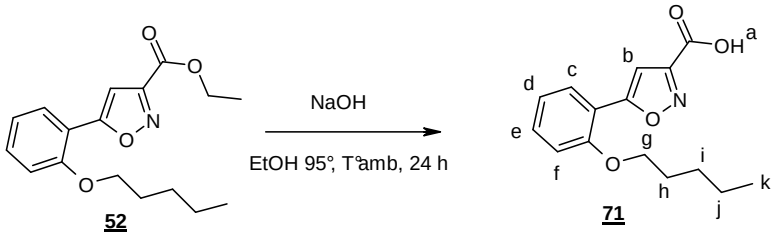
$C_{14}H_{15}NO_4$
M = 261.27 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 71 %. ***Rf*** : 0.09 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 148-149 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.79 : Ha (s, 1H); 7.91 : Hf (d, J = 7.7 Hz, 1H); 7.53 : Hd (t, J = 7.0 Hz, 1H); 7.25 : Hc (d, J = 8.1 Hz, 1H); 7.12 : He (t, J = 7.7 Hz, 1H); 7.08 : Hb (s, 1H); 4.17 : Hg (t, J = 6.3 Hz, 2H); 1.82 : Hh (m, 2H); 1.48 : Hi (m, 2H); 0.96 : Hj (t, J = 7.1 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 262 $(M+H)^+$.

Acide 5-(2-pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylique



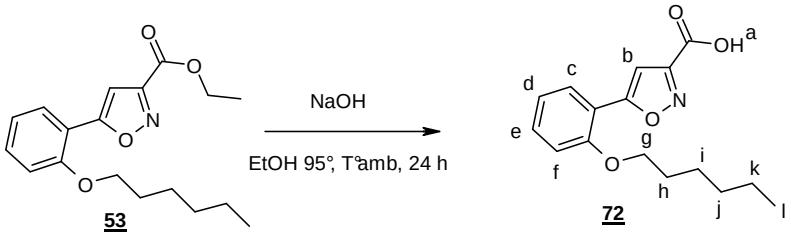
$C_{15}H_{17}NO_4$
M = 275.30 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 55 %. ***Rf*** : 0.69 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 128 - 129 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.78 : Ha (s, 1H); 7.89 : Hf (d, J = 7.9 Hz, 1H); 7.48 : Hd (t, J =7.3 Hz, 1H); 7.23 : Hc (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.10 : He (t, J = 7.3 Hz, 1H); 7.02 : Hb (s, 1H); 4.16 : Hg (t, J = 6.5 Hz, 2H); 1.81 : Hh (m, 2H); 1.48 - 1.33 : Hi et Hj (m, 4H); 0.90 : Hk (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 276 $(M+H)^+$.

Acide 5-(2-hexyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylique



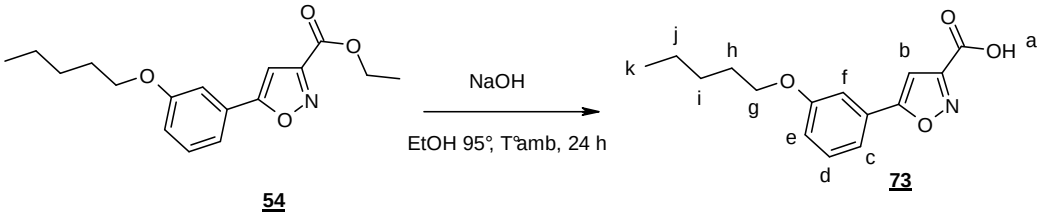
$C_{16}H_{19}NO_4$
M = 289.33 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 20 %. ***Rf*** : 0.12 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 128 - 129 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.78 : Ha (s, 1H); 7.88 : Hf (d, J = 7.6 Hz, 1H); 7.50 : Hd (t, J = 8.2 Hz, 1H); 7.21 : Hc (d, J = 8.5 Hz, 1H); 7.11 : He (t, J = 7.6 Hz, 1H); 7.05 : Hb (s, 1H); 4.15 : Hg (t, J = 6.4 Hz, 2H); 1.82 : Hh (m, 2H); 1.46 : Hi (m, 2H); 1.31 - 1.21 : Hj et Hk (m, 4H); 0.86 : Hl (t, J = 6.7 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 290 $(M+H)^+$.

Acide 5-(3-pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylique



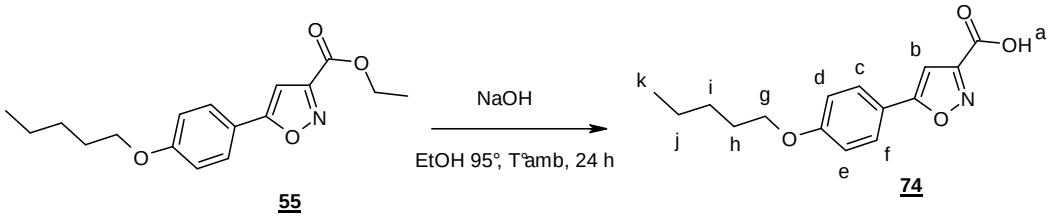
$C_{15}H_{17}NO_4$
M = 275.30 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 60 %. ***Rf*** : 0.19 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 106 - 107 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.78 : Ha (s, 1H); 7.45 : He, Hd, Hf et Hb (m, 4H); 7.07 : Hc (d, J = 8.2 Hz, 1H); 4.04 : Hg (t, J = 6.4 Hz, 2H); 1.72 : Hh (m, 2H); 1.39 - 1.34 : Hi et Hj (m, 4H); 0.90 : Hk (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 276 $(M+H)^+$.

Acide 5-(4-pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxylique



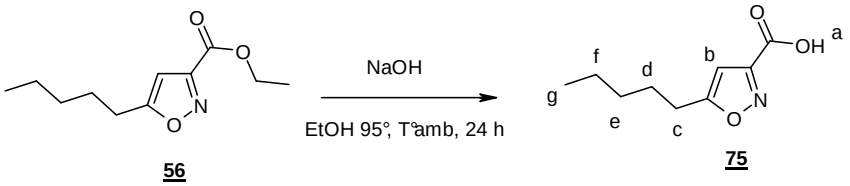
$C_{15}H_{17}NO_4$
M = 275.30 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 74 %. ***Rf*** : 0.56 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 178 - 179 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.79 : Ha (s, 1H); 7.85 : Hd et He (d, J = 8.7 Hz, 2H); 7.24 : Hb (s, 1H); 7.07 : Hc et Hf (d, J = 8.7 Hz, 2H); 4.03 : Hg (t, J = 6.4 Hz, 2H); 1.72 : Hh (m, 2H); 1.43 - 1.28 : Hi et Hj (m, 4H); 0.89 : Hk (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 276 $(M+H)^+$.

Acide 5-pentylisoxazole-3-carboxylique



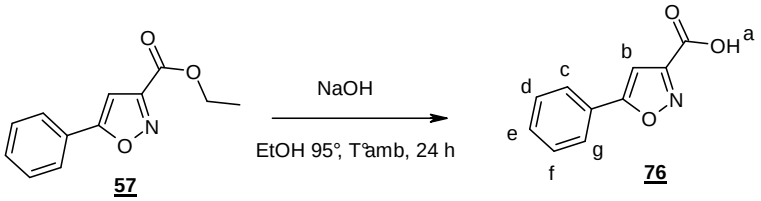
$C_9H_{13}NO_3$
M = 183.20 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 65 %. ***Rf*** : 0.46 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 80 - 81 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.79 : Ha (s, 1H); 6.58 : Hb (s, 1H); 2.79 : Hc (t, J = 7.6 Hz, 2H); 1.64 : Hd (m, 2H); 1.30 - 1.28 : He et Hf (m, 4H); 0.86 : Hg (t, J = 6.7 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 184 $(M+H)^+$.

Acide 5-phénylisoxazole-3-carboxylique



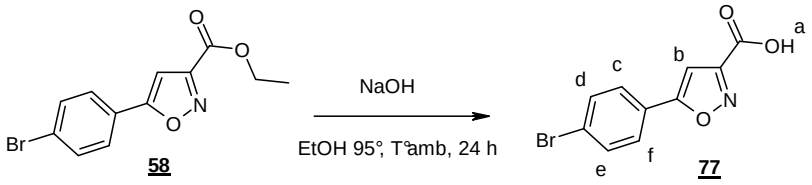
$C_{10}H_7NO_3$
M = 189.17 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 79 %. ***Rf*** : 0.23 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 163 - 164 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.79 : Ha (s, 1H); 7.96 - 7.93 : Hc et Hg (m, 2H); 7.59 - 7.53 : Hd, He et Hf (m, 3H); 7.41 : Hb (s, 1H)

LC-MS (APCI$^+$) : 190 $(M+H)^+$.

Acide 5-(4-bromophényl)isoxazole-3-carboxylique



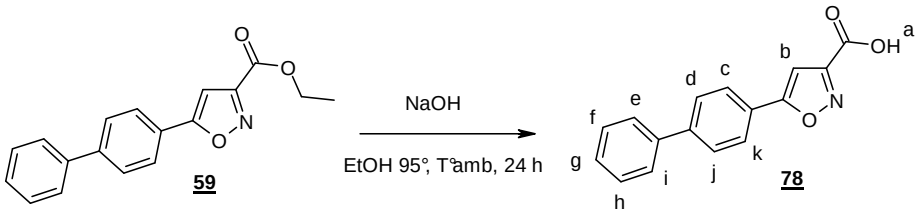
$C_{10}H_6BrNO_3$
M = 268.06 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 83 %. ***Rf*** : 0.13 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 226 - 227 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.81 : Ha (s, 1H); 7.89 : Hc et Hf (d, J = 8.1 Hz, 2H); 7.76 : Hd et He (d, J = 8.0 Hz, 2H); 7.48 : Hb (s, 1H)

LC-MS (APCI$^+$) : 268 (M+H) et 270 $(M+H)^{2+}$.

Acide 5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxylique



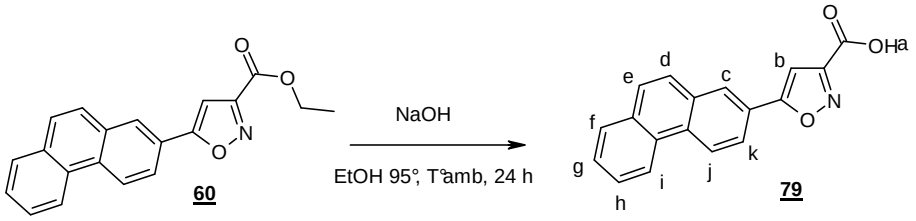
$C_{16}H_{11}NO_3$
M = 265.26 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 61 %. ***Rf*** : 0.06 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 212 - 213 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.80 : Ha (s, 1H); 8.30 : Hc et Hk (d, J = 8.1 Hz, 2H); 7.75 : Hd et Hj (d, J = 8.5 Hz, 2H); 7.46 - 7.48 : Hf, Hg et Hh (m, 3H); 7.38 : Hb (s, 1H); 7.25 : He et Hi (d, J = 8.2 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 266 $(M+H)^+$.

Acide 5-(phénantren-2-yl)isoxazole-3-carboxylique



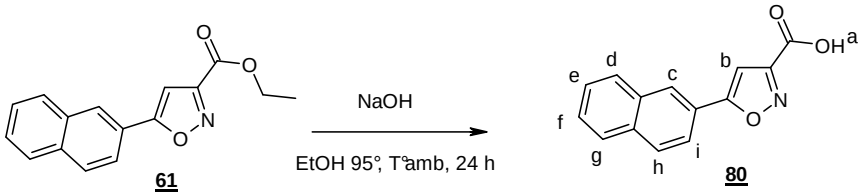
$C_{18}H_{11}NO_3$
M = 289.28 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 84 %. ***Rf*** : 0.07 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 220 - 221 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.81 : Ha (s, 1H); 8.75 : Hk (d, J = 8.2 Hz, 1H); 8.66 : Hc (s, 1H); 8.23 : Hf et Hi (d, J = 8.3 Hz, 2H); 8.12 : He et Hd (m, 2H); 8.02 : Hj (m, 1H); 7.60 - 7.57 : Hg et Hh (m, 2H); 7.54 : Hb (s, 1H)

LC-MS (APCI$^+$) : 290 $(M+H)^+$.

Acide 5-(naphtalen-2-yl)isoxazole-3-carboxylique



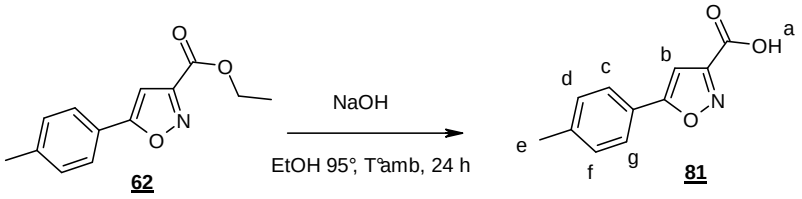
$C_{14}H_9NO_3$
M = 239.23 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 84 %. ***Rf*** : 0.54 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 208 - 209 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.79 : Ha (s, 1H); 8.57 : Hc (s, 1H); 8.09 - 7.97 : Hi, Hh, Hd et Hg (m, 4H); 7.63 - 7.58 : He et Hf (m, 2H); 7.53 : Hb (s, 1H)

LC-MS (APCI$^+$) : 240 $(M+H)^+$.

Acide 5-*p*-tolylisoxazole-3-carboxylique



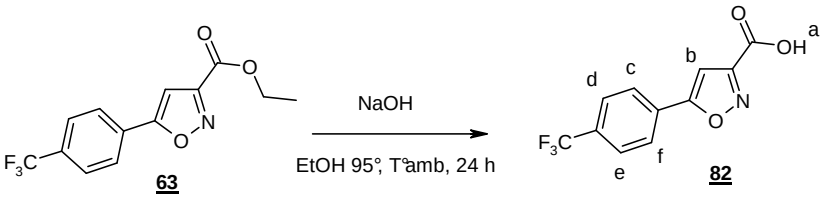
$C_{11}H_9NO_3$
M = 203.19 g/mol
Aspect : solide beige

Rendement : 91 %. ***Rf*** : 0.30 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 165 - 166 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.81 : Ha (s, 1H); 7.82 : Hc et Hg (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.35 : Hd et Hf (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.31 : Hb (s, 1H); 2.36 : He (s, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 204 $(M+H)^+$.

Acide 5-(4-(trifluorométhyl)phényl)isoxazole-3-carboxylique



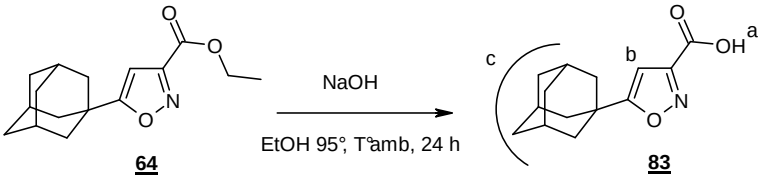
$C_{11}H_6F_3NO_3$
M = 257.17 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 87 %. ***Rf*** : 0.44 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 201 - 202 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.80 : Ha (s, 1H); 8.17 : Hc et Hf (d, J = 7.9 Hz, 2H); 7.93 : Hd et He (d, J = 7.9 Hz, 2H); 7.62 : Hb (s, 1H)

LC-MS (APCI$^+$) : 258 $(M+H)^+$.

Acide 5-(adamantan-1-yl)isoxazole-3-carboxylique



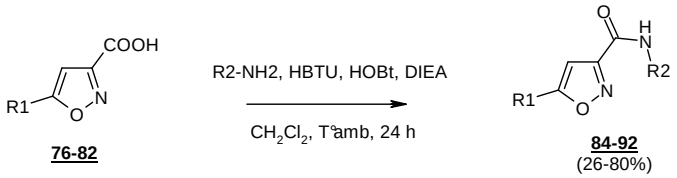
$C_{14}H_{17}NO_3$
M = 247.30 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 41 %. ***Rf*** : 0.07 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 85 - 86 °C.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 12.80 : Ha (s, 1H); 7.60 : Hb (s, 1H); 2.04-1.74 : Hc (m, 15H)

LC-MS (APCI$^+$) : 248 $(M+H)^+$.

Synthèse des composés 84 à 92

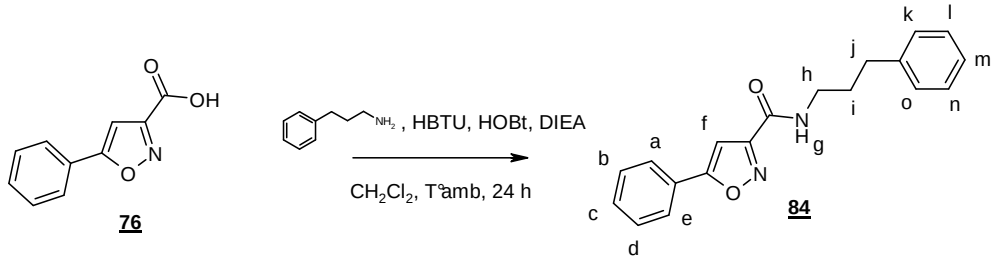


Produits	R1	R2	Page	Produits	R1	R2	Page
84			**217**	**89**			**219**
85	Br		**217**	**90**	F_3C		**220**
86			**218**	**91**			**220**
87			**218**	**92**			**221**
88			**219**				

Mode opératoire général

A une solution d'acide **76** à **82** (0.39 mmol, 1 eq) dans 20 mL de dichlorométhane séché sur tamis moléculaire, sont ajoutés successivement, l'HBTU (222 mg, 0.59 mmol, 1.5 eq), l'HOBt (30 mg, 0.20 mmol, 0.5 eq) et la DIEA (0.129 mL, 0.78 mmol, 2 eq). Le milieu est ensuite protégé de l'air ambiant par une garde à chlorure de calcium et agité à température ambiante pendant 45 min.
Enfin, l'amine (0.43 mmol, 1.1 eq) est ajoutée au mélange et l'agitation est poursuivie pendant 24 h, dans les mêmes conditions.
A la fin de la réaction, le milieu est filtré. Puis le fitrat est lavé par une solution de soude à 0.5 N, par une solution d'acide chlorhydrique 1 N et par de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée.
Le résidu obtenu est ensuite purifié par chromatographie sur couche épaisse (Cyclohexane / AcOEt, 7:3) avant d'être recristallisé dans l'éthanol pour donner les amides **84** à **92**.

5-Phényl-*N*-(3-phénylpropyl)isoxazole-3-carboxamide



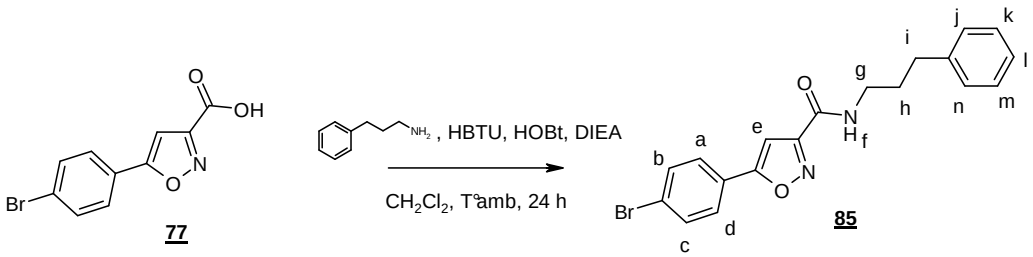
$C_{19}H_{18}N_2O_2$
M = 306.36 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 67 %. ***Rf*** : 0.76 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 127 - 128 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.85 : Hg (t, J = 5.5 Hz, 1H); 7.93 : Ha et He (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.91 - 7.53 : Hb, Hc et Hd (m, 3H); 7.31 : Hf (s, 1H); 7.28 - 7.14 : Hk, Hl, Hm, Hn et Ho (m, 5H); 3.29 : Hh (q, J = 5.8 Hz, 2H), 2.62 : Hj (t, J = 7.6 Hz, 2H); 1.83 : Hi (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 307 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

5-(4-Bromophényl)-*N*-(3-phénylpropyl)isoxazole-3-carboxamide



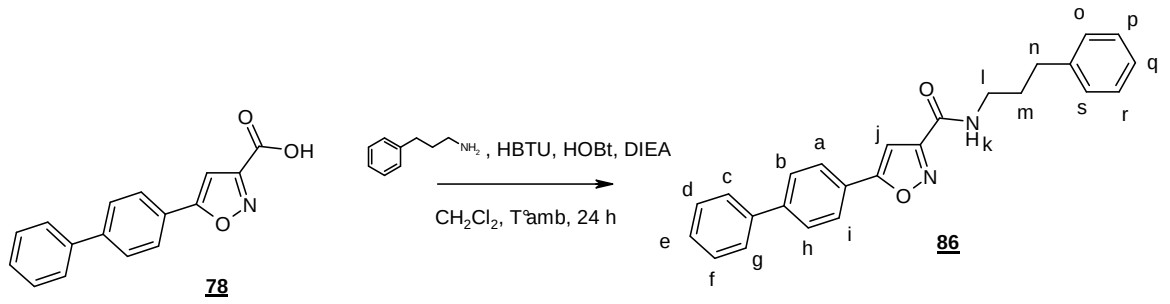
$C_{19}H_{17}BrN_2O_2$
M = 385.25 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 63 %. ***Rf*** : 0.83 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 171 - 172 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.93 : Hf (t, J = 5.7 Hz, 1H); 9.94 : Ha et Hd (d, J = 8.7 Hz, 2H); 9.82 : Hb et Hc (d, J = 8.7 Hz, 2H); 9.47 : He (s, 1H); 9.36 - 9.20 : Hj, Hk, Hl, Hm et Hn (m, 5H); 5.34 : Hg (q, J = 5.7 Hz, 2H); 4.58 : Hi (t, J = 7.6 Hz, 2H); 3.89 : Hh (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 385 (M+H) et 387 $(M+H)^{2+}$. Pureté = 99 %.

5-(Biphényl-4-yl)-*N*-(3-phénylpropyl)isoxazole-3-carboxamide



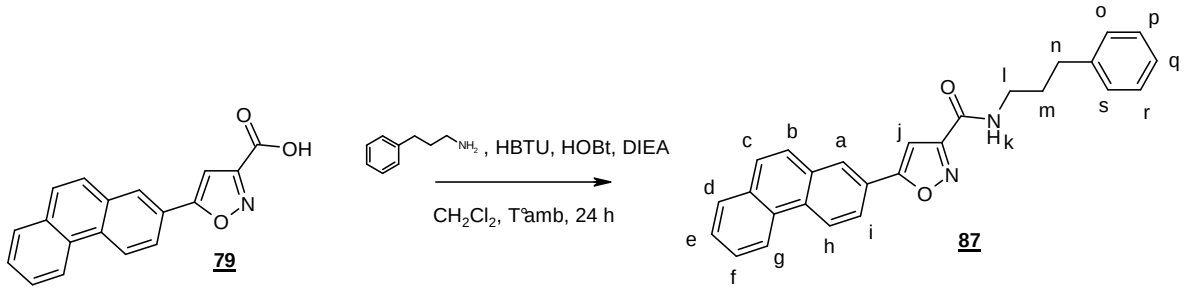
$C_{25}H_{22}N_2O_2$
M = 382.17 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 52 %. ***Rf*** : 0.63 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 142 - 143 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.56 : Hk (sl, 1H); 8.30 : Ha et Hi (d, J = 8.7 Hz, 2H); 7.75 : Hb et Hh (d, J = 8.5 Hz, 2H); 7.48 - 7.46 : Hd, He et Hf (m, 3H); 7.36 : Hj (s, 1H); 7.25 : Hc et Hg (d, J = 8.7 Hz, 2H); 7.20 - 7.17 : Ho, Hp, Hq, Hr et Hs (m, 5H); 3.18 : Hl (q, J = 5.5 Hz, 2H); 2.94 : Hn (t, J = 7.2 Hz, 2H); 2.10 : Hm (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 383 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

5-(Phénantren-2-yl)-*N*-(3-phénylpropyl)isoxazole-3-carboxamide



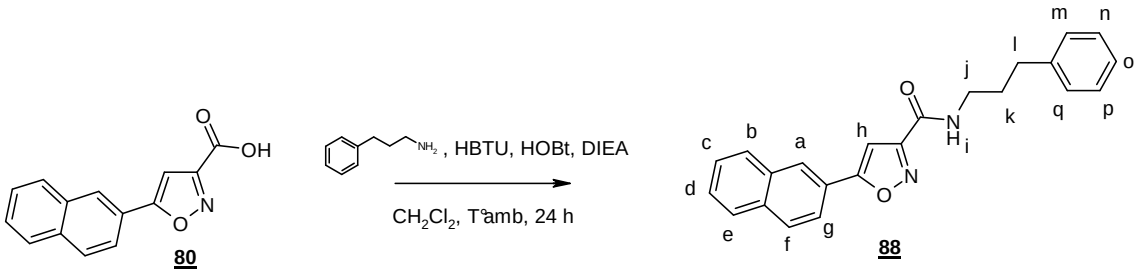
$C_{27}H_{22}N_2O_2$
M = 406.48 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 72 %. ***Rf*** : 0.78 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 186 - 187 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.91 : Hk (t, J = 5.7 Hz, 1H); 8.74 : Hd et Hg (d, J = 7.9 Hz, 2H); 8.65 : Ha (s, 1H); 8.24 : Hi (d, J = 9.0 Hz, 1H); 8.14 - 8.11 : Hb et Hc (m, 2H); 7.99 : Hh (d, J = 8.7 Hz, 1H); 7.59 - 7.56 : He et Hf (m, 2H); 7.51 : Hj (s, 1H); 7.31 - 7.15 : Ho, Hp, Hq, Hr et Hs (m, 5H); 3.31 : Hl (q, J = 5.5 Hz, 2H); 2.64 : Hn (t, J = 7.7 Hz, 2H); 1.86 : Hm (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 407 $(M+H)^+$. Pureté = 97 %.

5-(Naphtalen-2-yl)-*N*-(3-phénylpropyl)isoxazole-3-carboxamide



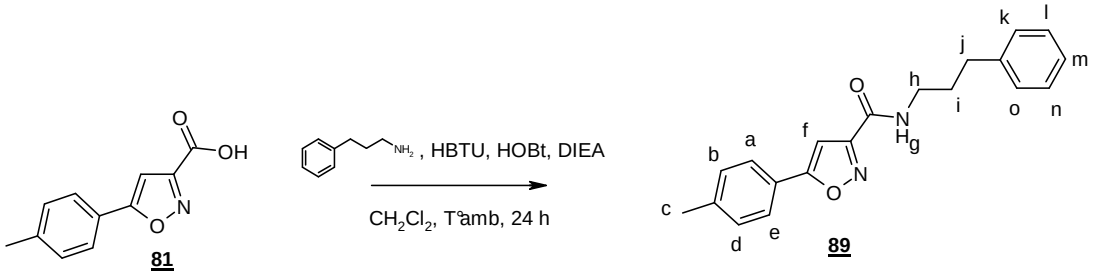
$C_{23}H_{20}N_2O_2$
M = 356.42 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 47 %. ***Rf*** : 0.80 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 160 - 161 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.89 : Hi (t, J = 5.5 Hz, 1H); 8.56 : Ha (s, 1H); 8.08 : Hb et He (d, J = 7.9 Hz, 2H); 8.02 - 7.98 : Hf et Hg (m, 2H); 7.63 - 7.61 : Hc et Hd (m, 2H); 7.46 : Hh (s, 1H); 7.29 - 7.18 : Hm, Hn, Ho, Hp et Hq (m, 5H); 3.31 : Hj (q, J = 5.5 Hz, 2H); 2.63 : Hl (t, J = 7.6 Hz, 2H); 1.85 : Hk (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 357 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

N-(3-phénylpropyl)-5-*p*-tolylisoxazole-3-carboxamide



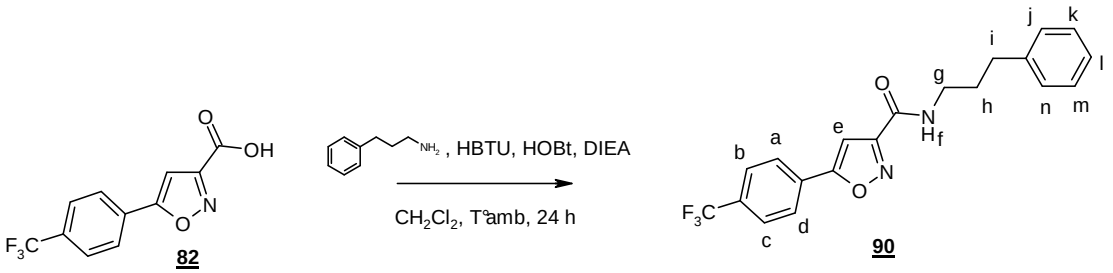
$C_{20}H_{20}N_2O_2$
M = 320.38 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 80 %. ***Rf*** : 0.80 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 150 - 151 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.83 : Hg (t, J = 5.7 Hz, 1H); 7.81 : Ha et He (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.35 : Hb et Hd (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.31 - 7.17 : Hf, Hk, Hl, Hm, Hn et Ho (m, 6H); 3.27 : Hh (q, J = 6.9 Hz, 2H); 2.62 : Hj (t, J = 7.7 Hz, 2H); 2.37 : Hc (s, 3H); 1.83 : Hi (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 321 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

N-(3-phénylpropyl)-5-(4-(trifluorométhyl)phényl)isoxazole-3-carboxamide



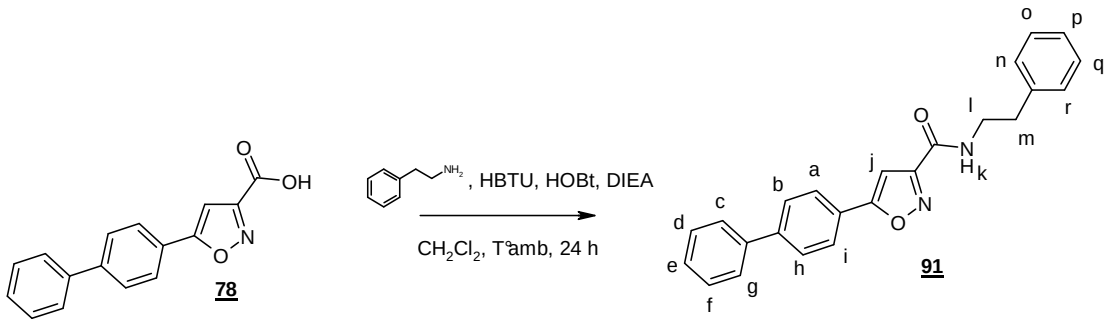
$C_{20}H_{17}F_3N_2O_2$
M = 374.36 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 55 %. ***Rf*** : 0.80 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 156 - 157 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.93 : Hf (t, J = 5.7 Hz, 1H); 8.15 : Ha et Hd (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.93 : Hb et Hc (d, J = 8.3 Hz, 2H); 7.56 : He (s, 1H); 7.31 - 7.15 : Hj, Hk, Hl, Hm et Hn (m, 5H); 3.28 : Hg (q, J = 6.9 Hz, 2H); 2.62 : Hi (t, J = 7.6 Hz, 2H); 1.83 : Hh (m, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 375 $(M+H)^+$. Pureté = 100 %.

5-(Biphényl-4-yl)-*N*-phénéthylisoxazole-3-carboxamide



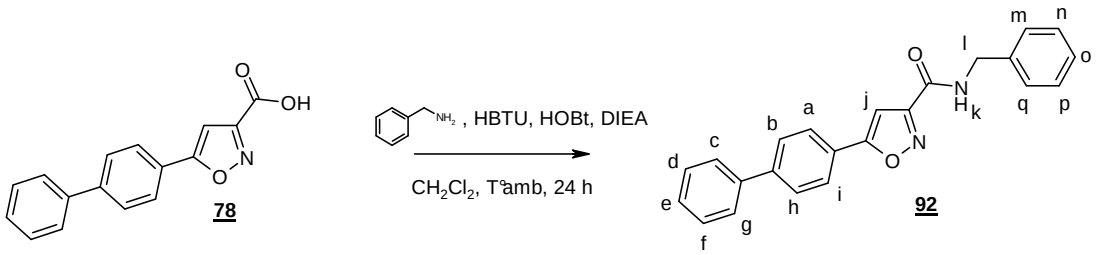
$C_{24}H_{20}N_2O_2$
M = 368.43 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 26 %. ***Rf*** : 0.66 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 210 - 211 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.89 : Hk (t, J = 5.8 Hz, 1H); 8.00 : Ha et Hi (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.85 : Hb et Hh (d, J = 8.5 Hz, 2H); 7.75 : Hc et Hg (d, J = 7.3 Hz, 2H); 7.53 - 7.20 : Hd, He, Hf, Hj, Hn, Ho, Hp, Hq et Hr (m, 9H); 3.50 : Hl (q, J = 6.7 Hz, 2H), 2.86 : Hm (t, J = 7.6 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 369 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

N-Benzyl-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide



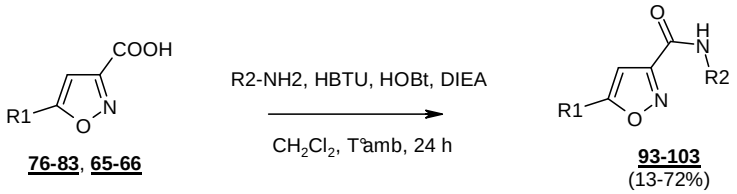
$C_{23}H_{18}N_2O_2$
M = 354.40 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 31 %. ***Rf*** : 0.66 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 195 - 196 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 9.40 : Hl (t, J = 6.1 Hz, 1H); 8.02 : Ha et Hi (d, J = 8.4 Hz, 2H); 7.85 : Hb et Hh (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.75 : Hc et Hg (d, J = 7.3 Hz, 2H); 7.52 - 7.23 : Hd, He, Hf, Hj, Hm, Hn, Ho, Hp et Hq (m, 9H); 4.47 : Hl (d, J = 6.4 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 355 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

Synthèse des composés 93 à 103

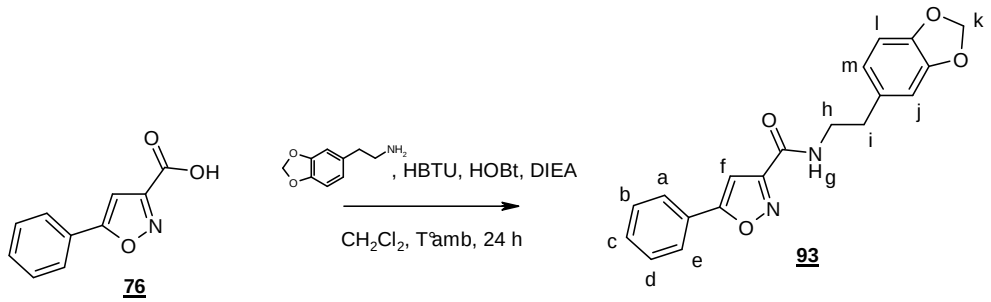


Produits	R1	R2	Page	Produits	R1	R2	Page
93			223	99			226
94	Br		223	100			226
95			224	101			227
96			224	102			227
97			225	103			228
98	F_3C		225				

Mode opératoire général

Le mode opératoire et les traitements sont identiques à ceux décrits pour l'obtention des composés **84** à **92**.

N-(2-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-phénylisoxazole-3-carboxamide



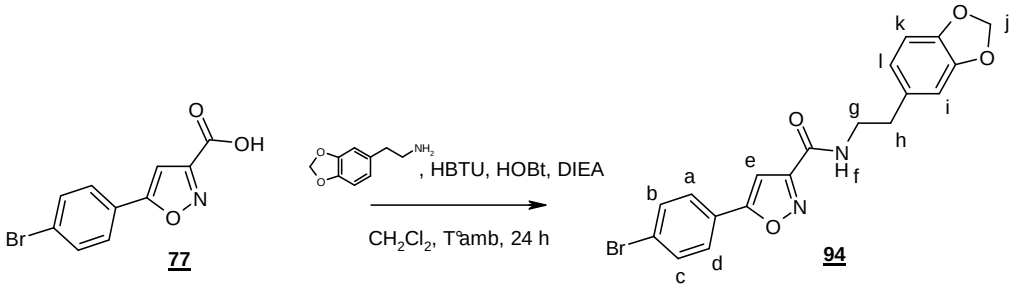
$C_{19}H_{16}N_2O_4$
M = 336.34 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 65 %. ***Rf*** : 0.71 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 191 - 192 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.56 : Hg (t, J = 5.5 Hz, 1H); 7.91 : Ha et He (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.85 - 7.74 : Hb, Hc et Hd (m, 3H); 7.56 : Hf (s, 1H); 6.93 : Hm (d, J = 8.5 Hz, 1H); 6.77 : Hj (s, 1H); 6.67 : Hl (d, J = 8.5 Hz, 1H); 6.06 : Hk (s, 2H); 3.45 : Hh (q, J = 6.9 Hz, 2H); 2.81 : Hi (t, J = 7.1 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 337 $(M+H)^+$. Pureté = 97 %.

N-(2-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(4-bromophényl)isoxazole-3-carboxamide



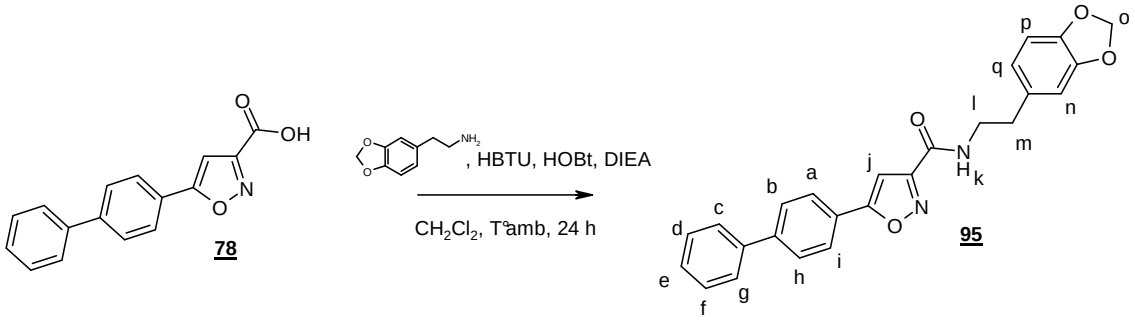
$C_{19}H_{15}BrN_2O_4$
M = 415.24 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 68 %. ***Rf*** : 0.71 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 205 - 206 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.83 : Hf (t, J = 5.5 Hz, 1H); 7.87 : Ha et Hd (d, J = 8.7 Hz, 2H); 7.75 : Hb et Hc (d, J = 8.5 Hz, 2H); 7.39 : He (s, 1H); 6.82 - 6.81 : Hi et Hl (m, 2H); 6.68 : Hk (d, J = 7.9 Hz, 1H); 5.96 : Hj (s, 2H); 3.45 : Hg (q, J = 6.8 Hz, 2H); 2.81 : Hh (t, J = 7.3 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 415 (M+H) et 417 $(M+H)^{2+}$. Pureté = 99 %.

N-(2-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide



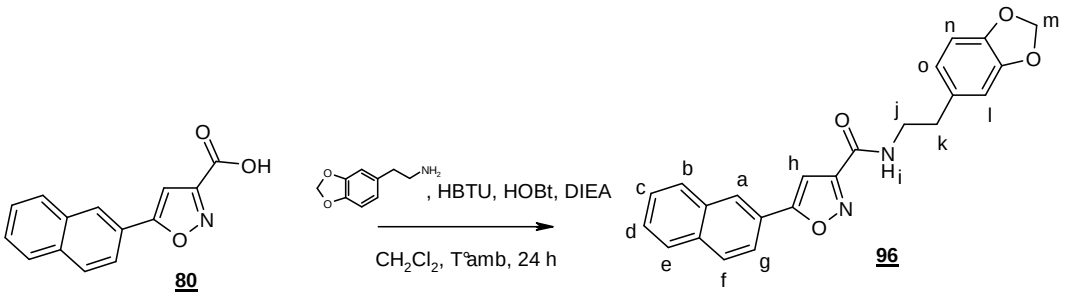
$C_{25}H_{20}N_2O_4$
M = 412.44 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 72 %. ***Rf*** : 0.73 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 200-201 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.84 : Hk (t, J = 5.5 Hz, 1H); 8.02 : Ha et Hi (d, J = 8.5 Hz, 2H); 7.85 : Hb et Hh (d, J = 8.5 Hz, 2H); 7.75 : Hc et Hg (d, J = 7.3 Hz, 2H); 7.51 : Hd et Hf (t, J = 7.4 Hz, 2H); 7.41 : He (t, J = 7.7 Hz, 1H); 7.38 : Hj (s, 1H); 6.83 - 6.81 : Hn et Hq (m, 2H); 6.69 : Hp (d, J = 7.9 Hz, 1H); 5.96 : Ho (s, 2H); 3.46 : Hl (q, J = 6.4 Hz, 2H); 2.77 : Hm (t, J = 7.3 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 413 $(M+H)^+$. Pureté = 100 %.

N-(2-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(naphtalen-2-yl)isoxazole-3-carboxamide



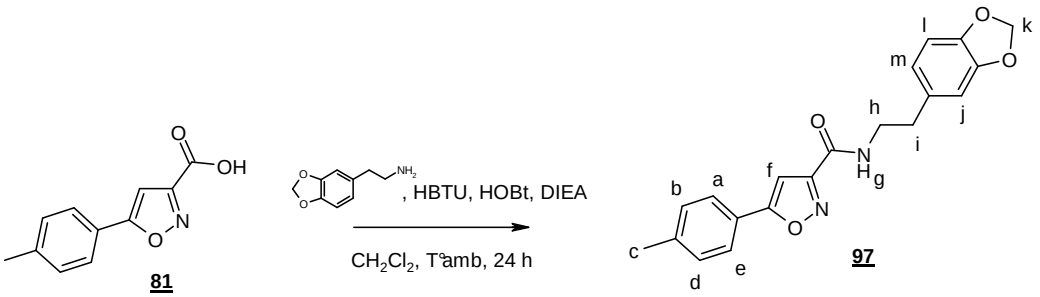
$C_{23}H_{18}N_2O_4$
M = 386.40 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 31 %. ***Rf*** : 0.78 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 204 - 205 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.88 : Hi (t, J = 5.7 Hz, 1H); 8.56 : Ha (s, 1H); 8.08 : Hb et He (d, J = 7.6 Hz, 2H); 8.02 - 7.98 : Hg et Hf (m, 2H); 7.63 - 7.60 : Hc et Hd (m, 2H); 7.45 : Hh (s, 1H); 6.85 - 6.83 : Ho et Hl (m, 2H); 6.69 : Hn (d, J = 7.7 Hz, 1H); 5.96 : Hm (s, 2H); 3.47 : Hj (q, J = 6.7 Hz, 2H); 2.79 : Hk (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 387 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

N-(2-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-*p*-tolylisoxazole-3-carboxamide



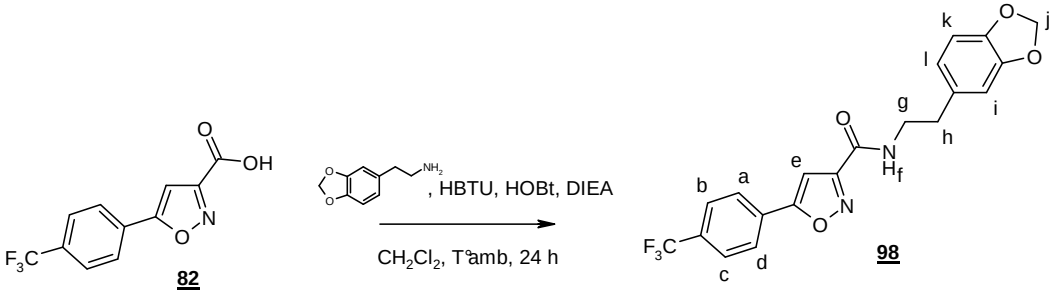
$C_{20}H_{18}N_2O_4$
M = 350.37 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 45 %. ***Rf*** : 0.69 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 187 - 188 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.79 : Hg (t, J = 5.4 Hz, 1H); 7.80 : Ha et He (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.35 : Hb et Hd (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.25 : Hf (s, 1H); 6.83 - 6.81 : Hj et Hm (m, 2H); 6.67 : Hl (d, J = 7.9 Hz, 1H); 5.96 : Hk (s, 2H); 3.44 : Hh (q, J = 6.5 Hz, 2H); 2.76 : Hi (t, J = 7.3 Hz, 2H); 2.37 : Hc (s, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 351 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

N-(2-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(4-(trifluorométhyl)phényl)isoxazole-3-carboxamide



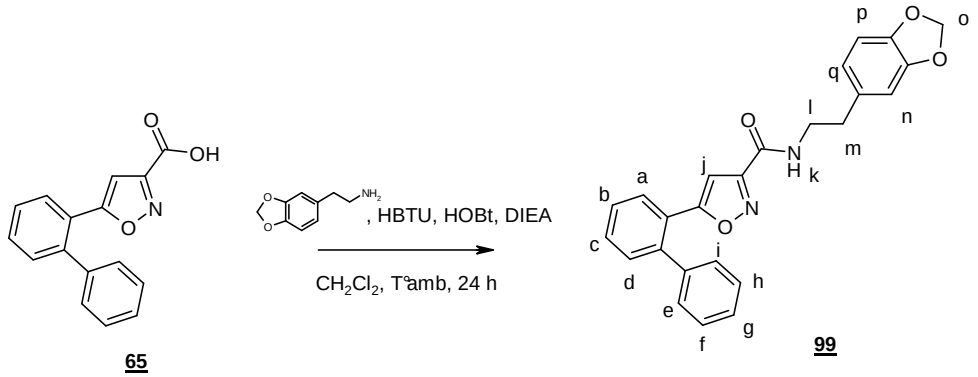
$C_{20}H_{15}F_3N_2O_4$
M = 404.34 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 38 %. ***Rf*** : 0.82 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 187 - 188 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.89 : Hf (t, J = 5.8 Hz, 1H); 8.15 : Ha et Hd (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.92 : Hb et Hc (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.54 : He (s, 1H); 6.83 - 6.81 : Hl et Hi (m, 2H); 6.68 : Hk (d, J = 8.2 Hz, 1H); 5.96 : Hj (s, 2H); 3.45 : Hg (q, J = 6.7 Hz, 2H); 2.77 : Hh (t, J = 7.3 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 405 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

N-(2-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(biphényl-2-yl)isoxazole-3-carboxamide



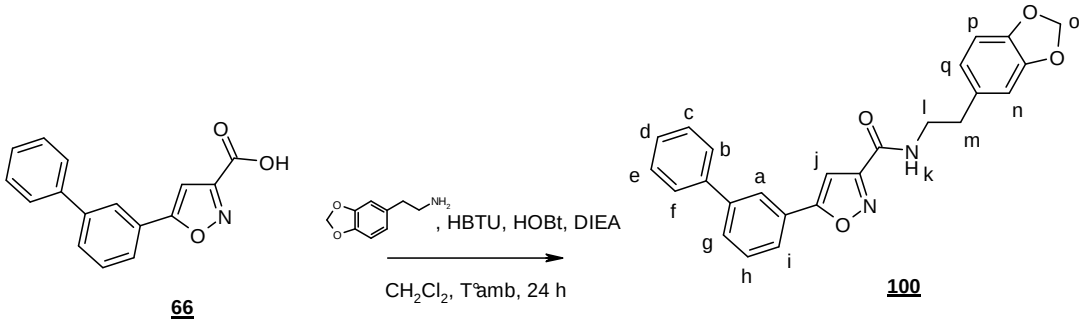
$C_{25}H_{20}N_2O_4$
M = 412.44 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 18 %. ***Rf*** : 0.76 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 137 - 138 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.44 : Hk (t, J = 5.7 Hz, 1H); 7.79 : Ha et Hb (m, 2H); 7.54 - 7.28 : Hc, Hd, He, Hf, Hg, Hh, Hi et Hj (m, 8H); 6.93 - 6.77 : Hn, Hq et Hp (m, 3H); 6.07 : Ho (s, 2H); 3.49 : Hl (q, J = 6.4 Hz, 2H); 2.81 : Hm (t, J = 7.2 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 413 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

N-(2-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(biphényl-3-yl)isoxazole-3-carboxamide



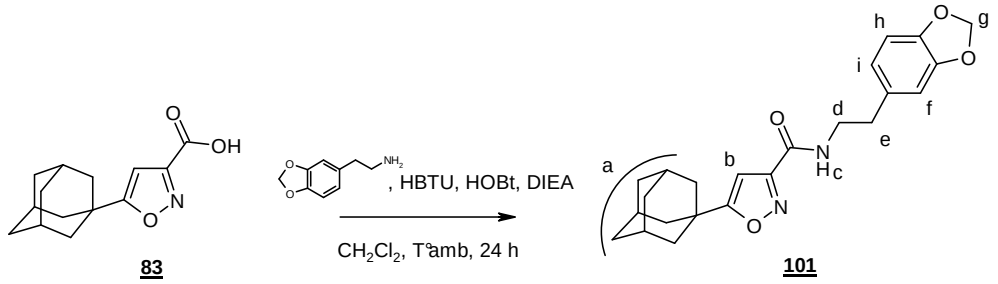
$C_{25}H_{20}N_2O_4$
M = 412.44 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 64 %. ***Rf*** : 0.74 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 149 - 150 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.76 : Hk (t, J = 5.7 Hz, 1H); 8.21 : Ha (s, 1H); 7.93 - 7.39 : Hb, Hc, Hd, He, Hf, Hg, Hh, Hi et Hj (m, 9H); 6.82 : Hn (s, 1H); 6.72 - 6.69 : Hq et Hp (m, 2H); 5.96 : Ho (s, 2H); 3.46 : Hl (q, J = 6.4 Hz, 2H); 2.77 : Hm (t, J = 7.3 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 413 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

N-(2-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)éthyl)-5-(adamantan-1-yl)isoxazole-3-carboxamide



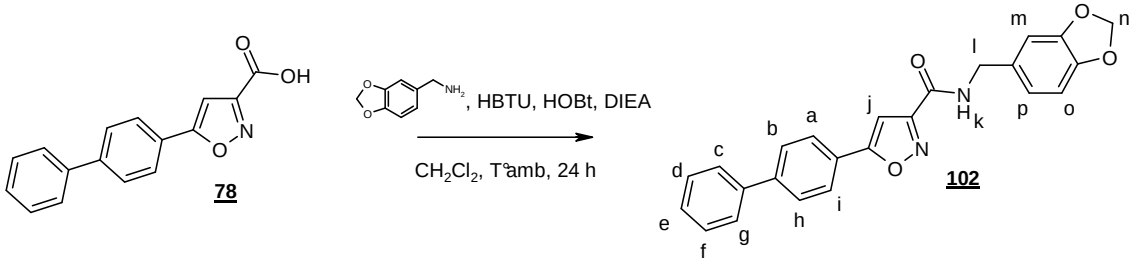
$C_{23}H_{26}N_2O_4$
M = 394.47 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 13 %. ***Rf*** : 0.73 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 126 - 127 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.78 : Hc (t, J = 5.7 Hz, 1H); 7.54 : Hb (s, 1H); 6.83 : Hf (s, 1H); 6.73 - 6.69 : Hi et Hh (m, 2H); 5.95 : Hg (s, 2H); 3.46 : Hd (q, J = 6.4 Hz, 2H); 2.77 : He (t, J = 7.3 Hz, 2H); 2.04 - 1.74 : Ha (m, 15H)

LC-MS (APCI$^+$) : 395 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

N-(2-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)méthyl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide



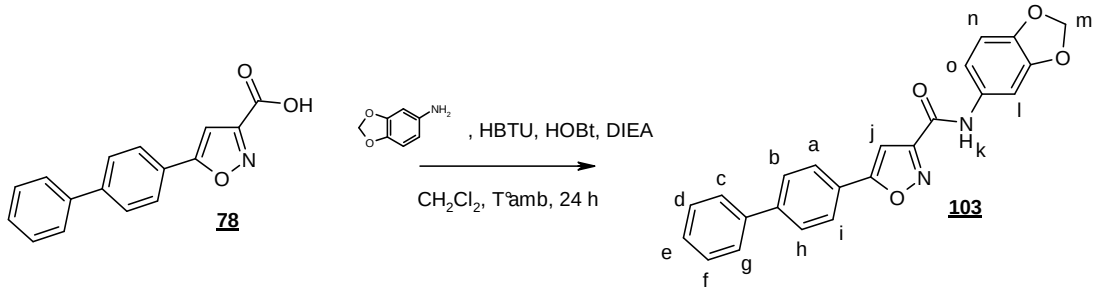
$C_{24}H_{18}N_2O_4$
M = 398.41 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 17 %. ***Rf*** : 0.76 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 197 - 198 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 9.34 : Hk (t, J = 6.1 Hz, 1H); 8.02 : Ha et Hi (d, J = 8.4 Hz, 2H); 7.85 : Hb et Hh (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.75 : Hc et Hg (d, J = 7.3 Hz, 2H); 7.52 - 7.39 : Hd, He, Hf et Hj (m, 4H); 6.91-6.80 : Hm, Hp et Ho (m, 3H); 5.98 : Hn (s, 2H); 4.35 : Hl (d, J = 6.1 Hz, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 399 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

N-(2-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide



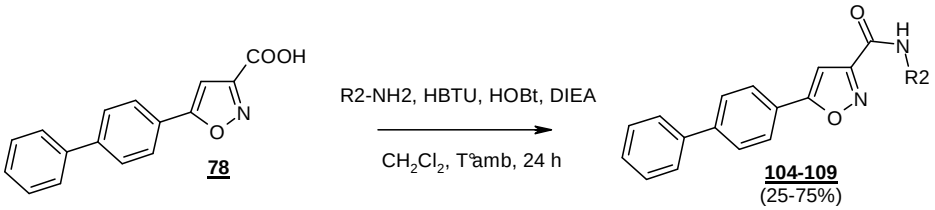
$C_{23}H_{16}N_2O_4$
M = 384.38 g/mol
Aspect : solide blanc

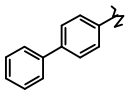
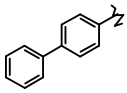
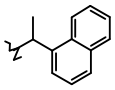
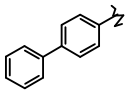
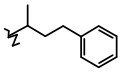
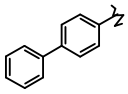
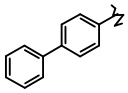
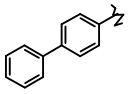
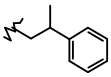
Rendement : 24 %. ***Rf*** : 0.74 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 215 - 216 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 10.70 : Hk (s, 1H); 8.05 : Ha et Hi (d, J = 8.4 Hz, 2H); 7.85 : Hb et Hh (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.76 : Hc et Hg (d, J = 7.0 Hz, 2H); 7.53 - 7.48 : Hd, He, Hf et Hj (m, 4H); 6.92 - 6.81 : Hl, Ho et Hn (m, 3H); 6.02 : Hm (s, 2H)

LC-MS (APCI$^+$) : 385 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

Synthèse des composés 104 à 109

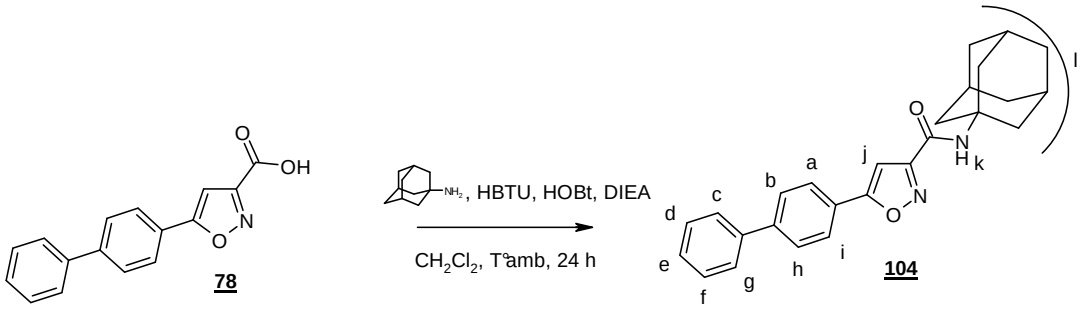


Produits	R1	R2	Page
104			230
105			230
106			231
107			231
108			232
109			232

Mode opératoire général

Le mode opératoire et les traitements sont identiques à ceux décrits pour l'obtention des composés **84** à **92**. Toutefois, pour les composés **105** à **109**, l'HBTU a été remplacé par l'EDCI (1.5 eq) et le dichlorométhane par du DMF.

N-(Adamantan-1-yl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide



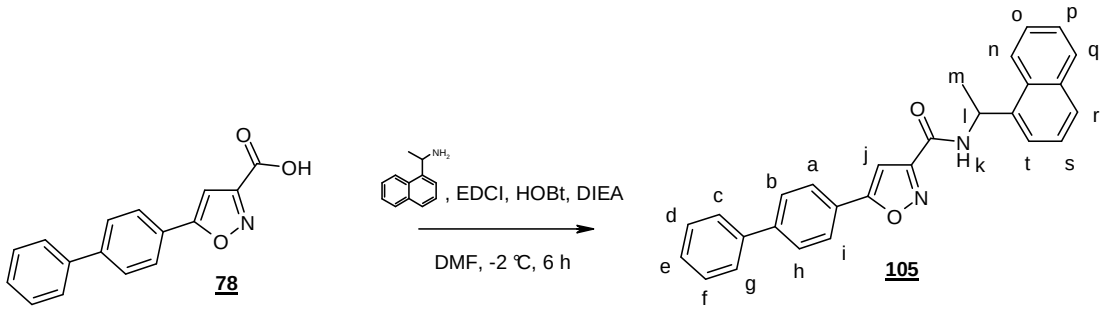
$C_{26}H_{26}N_2O_2$
M = 398.51 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 24 %. ***Rf*** : 0.74 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 215 - 216 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.01 : Ha et Hi (d, J = 8.4 Hz, 2H); 7.88 - 7.84 : Hb, Hh et Hk (m, 3H); 7.77 : Hc et Hg (d, J = 7.4 Hz, 2H); 7.53 - 7.42 : Hd, Hf et He (m, 3H); 7.35 : Hj (s, 1H); 2.07 : Hl (m, 9H); 1.66 : Hl (m, 6H)

LC-MS (APCI$^+$) : 399 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

N-(1-(Naphtalen-1-yl)éthyl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide



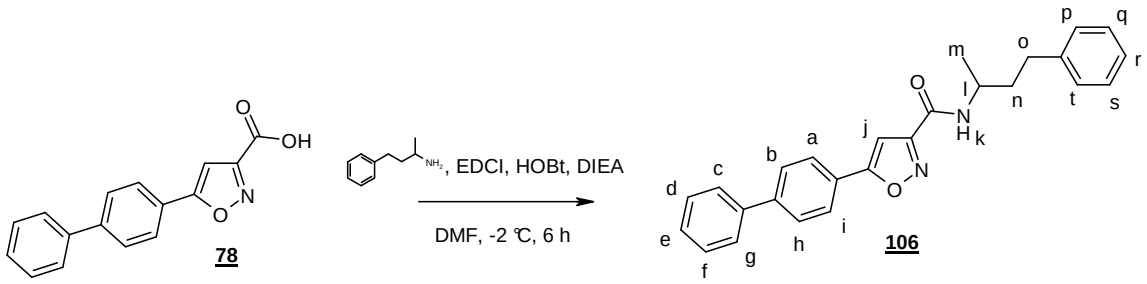
$C_{28}H_{22}N_2O_2$
M = 418.49 g/mol
Aspect : solide beige

Rendement : 63 %. ***Rf*** : 0.80 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 171 - 172 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H $CDCl_3$: δ (ppm) : 8.22 : Hk (d, J = 8.3 Hz, 1H); 7.96 - 7.83 : Ha, Hb, Hh, Hi (m, 4H); 7.72 : Hc et Hg (d, J = 8.3 Hz, 2H); 7.63 - 7.40 : Hd, He, Hf, Ho, Hp, Hq, Hr, Hs et Ht (m, 9H); 7.18 : Hn (d, J = 8.2 Hz, 1H); 7.04 : Hj (s, 1H); 6.17 : Hl (m, 1H); 1.82 : Hm (d, J = 6.8 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 419 $(M+H)^+$. Pureté = 100 %.

N-(4-Phénylbutan-2-yl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide



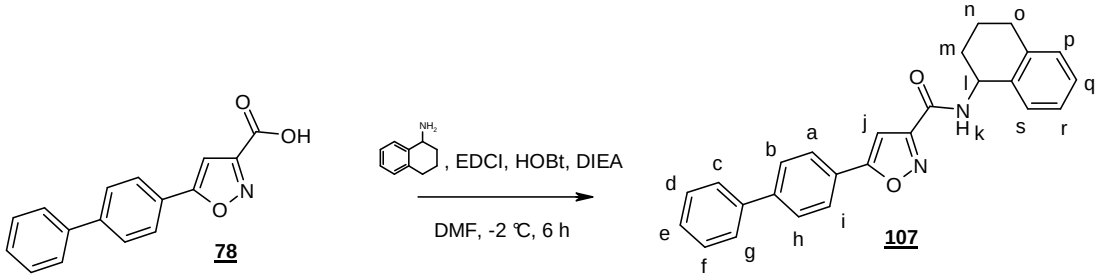
$C_{26}H_{24}N_2O_2$
M = 396.48 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 25 %. ***Rf*** : 0.83 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 173 - 174 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.70 : Hk (d, J = 8.4 Hz, 1H); 8.02 : Ha et Hi (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.86 : Hb et Hh (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.75 : Hc et Hg (d, J = 7.3 Hz, 2H); 7.53 - 7.41 : Hj, Hd, He et Hf (m, 4H); 7.30 - 7.16 : Hp, Hq, Hr, Hs et Ht (m, 5H); 4.01 : Hl (m, 1H); 2.61 : Ho (m, 2H); 1.93 - 1.73 : Hn (m, 2H); 1.18 : Hm (d, J = 6.7 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 397 $(M+H)^+$. Pureté = 100 %.

N-(1,2,3,4-Tétrahydronaphtalèn-1-yl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide



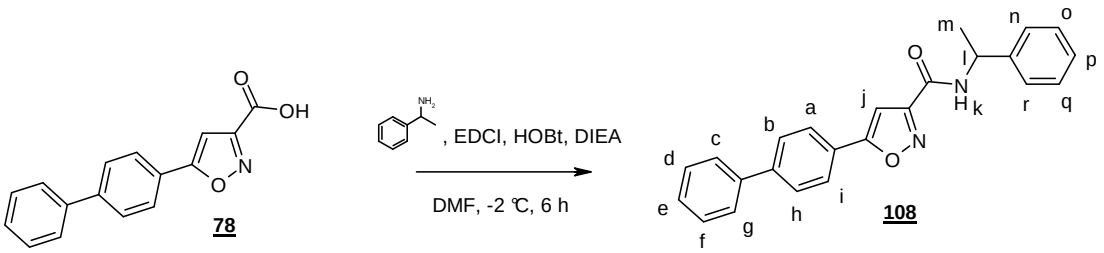
$C_{26}H_{22}N_2O_2$
M = 394.47 g/mol
Aspect : solide beige

Rendement : 56 %. ***Rf*** : 0.82 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 213 - 214 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 9.12 : Hk (d, J = 8.7 Hz, 1H); 8.01 : Ha et Hi (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.86 : Hb et Hh (d, J = 8.2 Hz, 2H); 7.75 : Hc et Hg (d, J = 7.6 Hz, 2H); 7.53 - 7.39 : Hj, Hd, He et Hf (m, 4H); 7.21 - 7.13 : Hp, Hq, Hr et Hs (m, 4H); 5.24 : Hl (m, 1H); 2.76 : Hm (m, 2H); 1.99 - 1.76 : Hn et Ho (m, 4H)

LC-MS (APCI$^+$) : 395 $(M+H)^+$. Pureté = 100 %.

N-(1-Phényléthyl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide



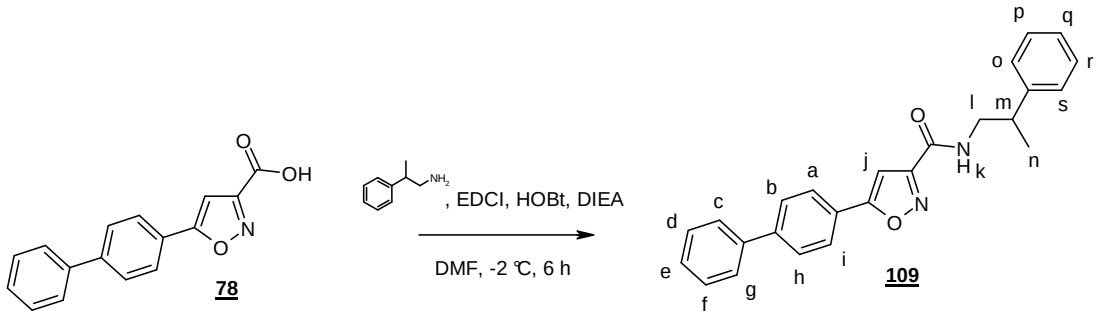
$C_{24}H_{20}N_2O_2$
M = 368.43 g/mol
Aspect : solide jaune

Rendement : 75 %. ***Rf*** : 0.83 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 182 - 183 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 9.28 : Hk (d, J = 8.2 Hz, 1H); 8.01 : Ha et Hi (d, J = 8.4 Hz, 2H); 7.75 : Hb et Hh (d, J = 8.4 Hz, 2H); 7.65 : Hc et Hg (d, J = 7.3 Hz, 2H); 7.53-7.22 : Hd, He, Hf, Hj, Hn, Ho, Hp, Hq et Hr (m, 9H); 5.17 : Hl (m, 1H); 1.49 : Hm (d, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 369 $(M+H)^+$. Pureté = 100 %.

N-(2-Phénylpropyl)-5-(biphényl-4-yl)isoxazole-3-carboxamide



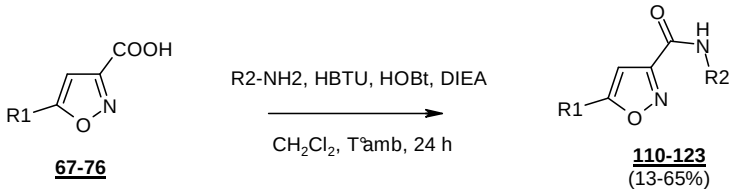
$C_{25}H_{22}N_2O_2$
M = 382.45 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 51 %. ***Rf*** : 0.76 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 198 - 199 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H CDCl$_3$: δ (ppm) : 9.28 : Hk (s, 1H); 7.87 : Ha et Hi (d, J = 8.3 Hz, 2H); 7.72 : Hb et Hh (d, J = 8.3 Hz, 2H); 7.65 : Hc et Hg (d, J = 7.3 Hz, 2H); 7.52 - 7.28 : Hd, He, Hf, Ho, Hp, Hq, Hr et Hs (m, 8H); 7.00 : Hj (s, 1H); 3.80 : Hl_1 (m, 1H); 3.55 : Hl_2 (m, 1H); 3.11 : Hm (m, 1H); 1.39 : Hn (d, J = 7.01 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 383 $(M+H)^+$. Pureté = 100 %.

Synthèse des composés 110 à 123

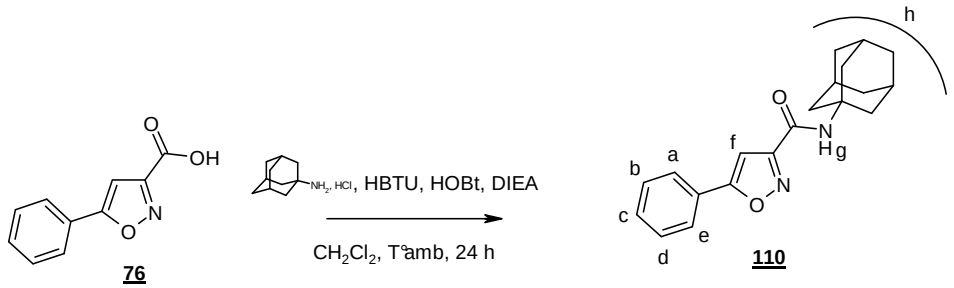


Produits	R1	R2	Page	Produits	R1	R2	Page
110			234	117	OC_5H_{11}		237
111			234	118	OC_6H_{13}		238
112			235	119	$C_5H_{11}O$		238
113	OMe		235	120	$C_5H_{11}O$		239
114	OC_2H_5		236	121			239
115	OC_3H_7		236	122	OC_5H_{11}		240
116	OC_4H_9		237	123	OC_5H_{11}	N	240

Mode opératoire général

Le mode opératoire et les traitements sont identiques à ceux décrits pour l'obtention des composés **84** à **92**.

N-(Adamantan-1-yl)-5-phénylisoxazole-3-carboxamide



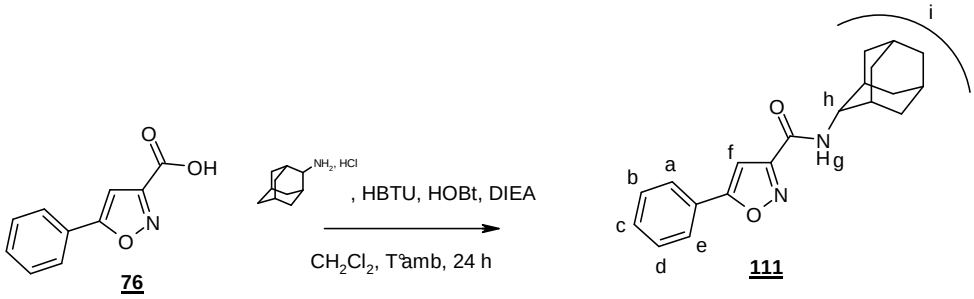
$C_{20}H_{22}N_2O_2$
M = 322.40 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 52 %. ***Rf*** : 0.72 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 156 - 157 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.92 - 7.89 : He, Hb et Hg (m, 3H); 7.55 - 7.53 : Ha, Hc et Hd (m, 3H); 7.30 : Hf (s, 1H); 2.06 : Hh (m, 9H); 1.65 : Hh (m, 6H)

LC-MS (APCI$^+$) : 323 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

N-(Adamantan-2-yl)-5-phénylisoxazole-3-carboxamide



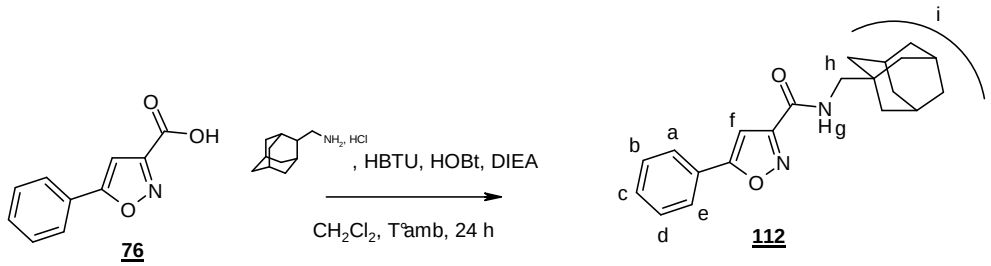
$C_{20}H_{22}N_2O_2$
M = 322.40 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 51 %. ***Rf*** : 0.73 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 157 - 158 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.36 : Hg (d, J = 6.4 Hz, 1H); 8.27 : He (d, J = 7.6 Hz, 1H); 7.95 : Hb (t, J = 8.2 Hz, 1H); 7.53 : Ha (d, J = 8.2 Hz, 1H); 7.34 : Hd (t, J = 7.8 Hz, 1H); 7.29 - 7.26 : Hc et Hf (m, 2H); 4.09 : Hh (d, J = 5.3 Hz, 1H); 2.63 : Hi (m, 9H); 1.84 : Hi (m, 5H)

LC-MS (APCI$^+$) : 323 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

N-(Adamantan-1-ylméthyl)-5-phénylisoxazole-3-carboxamide



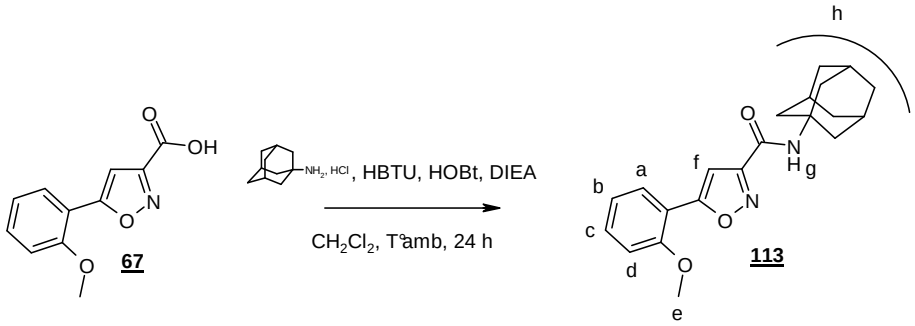
$C_{21}H_{24}N_2O_2$
M = 336.44 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 34 %. ***Rf*** : 0.79 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 165 - 166 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.60 : Hg (t, J = 6.1 Hz, 1H); 7.93 - 7.91 : He et Hb (m, 2H); 7.56 - 7.53 : Ha, Hc et Hd (m, 3H); 7.35 : Hf (s, 1H); 2.97 : Hh (d, J = 6.4 Hz, 2H); 1.92 : Hi (m, 3H); 1.68 - 1.49 : Hi (m, 12H)

LC-MS (APCI$^+$) : 337 $(M+H)^+$. Pureté = 100 %.

N-(Adamantan-1-yl)-5-(2-méthoxyphényl)isoxazole-3-carboxamide



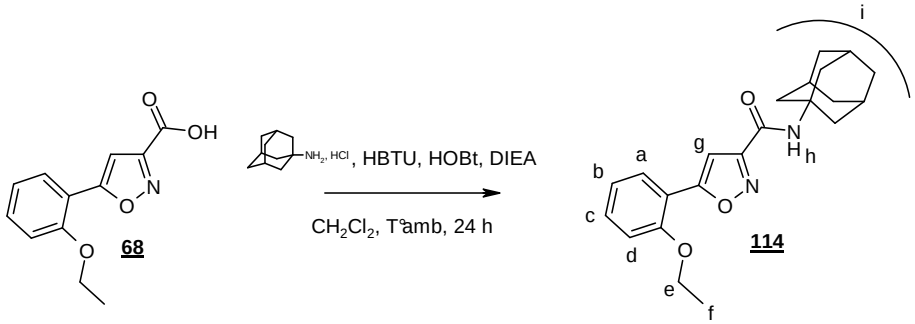
$C_{21}H_{24}N_2O_3$
M = 352.44 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 13 %. ***Rf*** : 0.77 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 101 - 102 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.88 - 7.86 : Hg et Hd (m, 2H); 7.53 : Hb (t, J = 7.0 Hz, 1H); 7.23 : Ha (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.12 : Hc (t, J = 7.6 Hz, 1H); 7.04 : Hf (s, 1H); 3.96 : He (s, 3H); 2.06 : Hh (m, 9H); 1.65 : Hh (m, 6H)

LC-MS (APCI$^+$) : 353 $(M+H)^+$. Pureté = 100 %.

N-(Adamantan-1-yl)-5-(2-éthoxyphényl)isoxazole-3-carboxamide



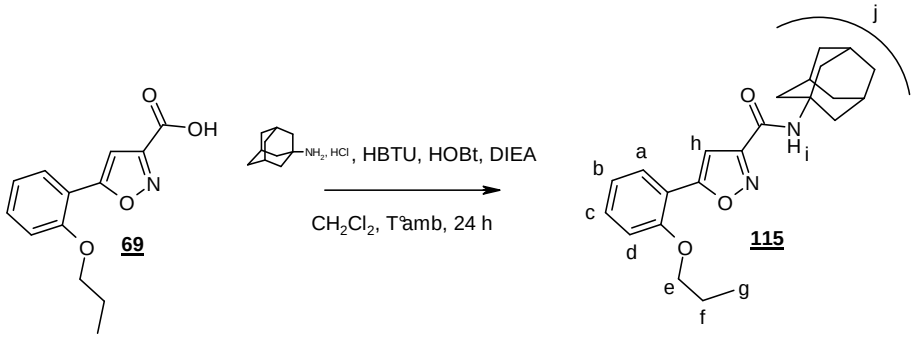
$C_{22}H_{26}N_2O_3$
M = 366.46 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 24 %. ***Rf*** : 0.75 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 75 - 76 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.96 : Hh (s, 1H); 7.86 : Hd (d, J = 7.6 Hz, 1H); 7.54 : Hb (t, J = 8.4 Hz, 1H); 7.25 : Ha (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.12 : Hc (t, J = 7.6 Hz, 1H); 7.06 : Hg (s, 1H); 4.28 : He (q, J = 6.5 Hz, 2H); 2.06 : Hi (m, 9H); 1.65 : Hi (m, 6H); 0.94 : Hf (t, J = 6.7 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 367 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

N-(Adamantan-1-yl)-5-(2-propoxyphényl)isoxazole-3-carboxamide



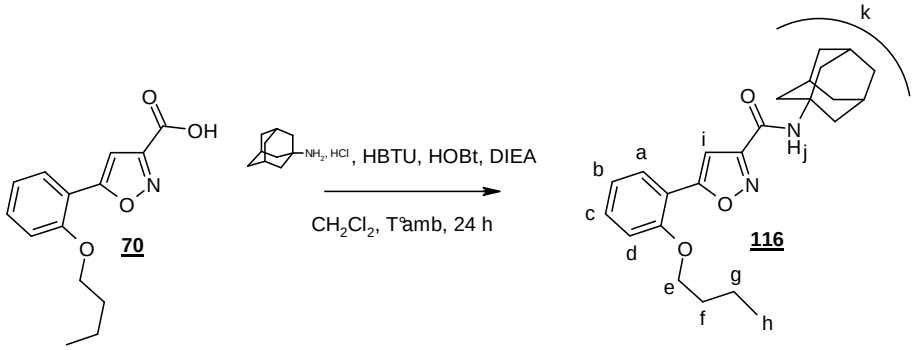
$C_{23}H_{28}N_2O_3$
M = 380.49 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 29 %. ***Rf*** : 0.76 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 61 - 62 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.88-7.86 : Hi et Hd (m, 2H); 7.50 : Hb (t, J = 8.5 Hz, 1H); 7.22 : Ha (d, J = 8.5 Hz, 1H); 7.11 : Hc (t, J = 7.6 Hz, 1H); 7.00 : Hh (s, 1H); 4.13 : He (t, J = 6.4 Hz, 2H); 2.06 : Hj (m, 9H); 1.81 : Hf (m, 2H); 1.65 : Hj (m, 6H); 1.04 : Hg (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 381 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

N-(Adamantan-1-yl)-5-(2-butoxyphényl)isoxazole-3-carboxamide



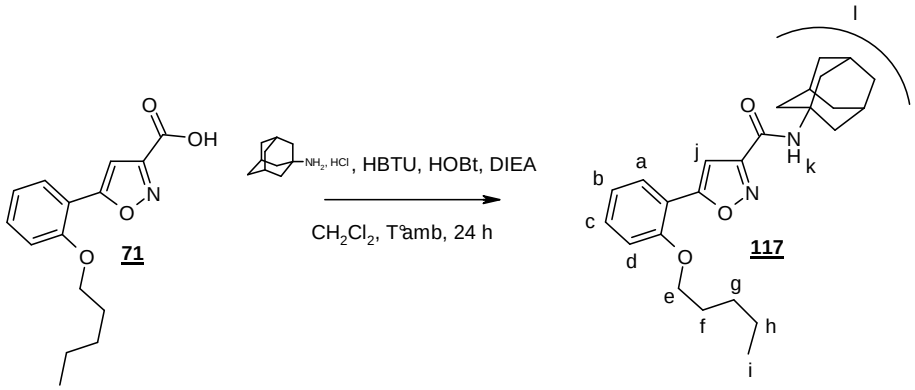
$C_{24}H_{30}N_2O_3$
M = 394.52 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 36 %. ***Rf*** : 0.89 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 81 - 82 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.88 - 7.86 : Hj et Hd (m, 2H); 7.50 : Hb (t, J = 8.5 Hz, 1H); 7.24 : Ha (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.10 : Hc (t, J = 7.6 Hz, 1H); 6.98 : Hi (s, 1H); 4.17 : He (t, J = 6.4 Hz, 2H); 2.06 : Hk (m, 9H); 1.81 : Hf (m, 2H); 1.65 : Hk (m, 6H); 1.48 : Hg (m, 2H); 0.96 : Hh (t, J = 7.3 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 395 $(M+H)^+$. Pureté = 97 %.

N-(Adamantan-1-yl)-5-(2-pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxamide



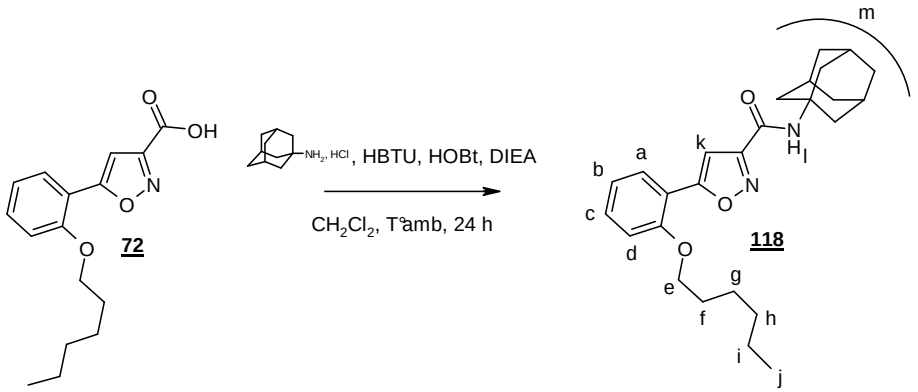
$C_{25}H_{32}N_2O_3$
M = 408.55 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 65 %. ***Rf*** : 0.90 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 64 - 65 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.88 - 7.86 : Hk et Hd (m, 2H); 7.49 : Hb (t, J = 8.5 Hz, 1H); 7.22 : Ha (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.10 : Hc (t, J = 7.6 Hz, 1H); 6.99 : Hj (s, 1H); 4.15 : He (t, J = 7.0 Hz, 2H); 2.05 : Hl (m, 9H); 1.82 : Hf (m, 2H); 1.77 : Hl (m, 6H); 1.68 - 1.21 : Hg et Hh (m, 4H); 0.90 : Hi (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 409 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

N-(Adamantan-1-yl)-5-(2-hexyloxyphényl)isoxazole-3-carboxamide



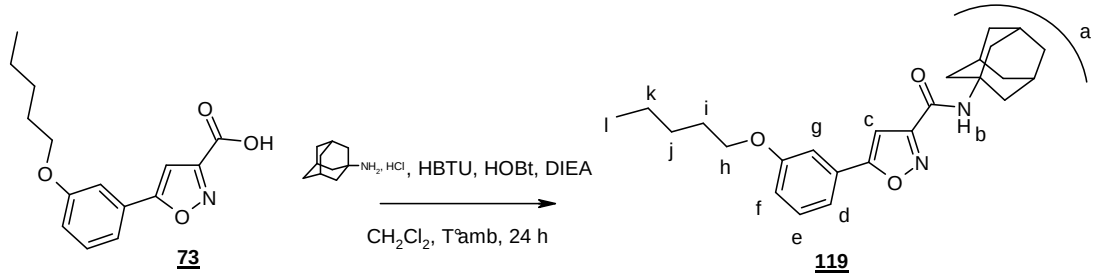
$C_{26}H_{34}N_2O_3$
M = 422.57 g/mol
Aspect : huile transparente

Rendement : 38 %. ***Rf*** : 0.89 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5).

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.88 - 7.86 : Hl et Hd (m, 2H); 7.50 : Hb (t, J = 8.5 Hz, 1H); 7.22 : Ha (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.10 : Hc (t, J = 7.6 Hz, 1H); 6.99 : Hk (s, 1H); 4.15 : He (t, J = 5.2 Hz, 2H); 2.12 : Hm (m, 9H); 1.83 : Hf (m, 2H); 1.65 : Hm (m, 6H); 1.44 : Hg (m, 2H); 1.31 : Hh et Hi (m, 4H); 0.87 : Hj (t, J = 6.7 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 423 $(M+H)^+$. Pureté = 99 %.

N-(Adamantan-1-yl)-5-(3-pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxamide



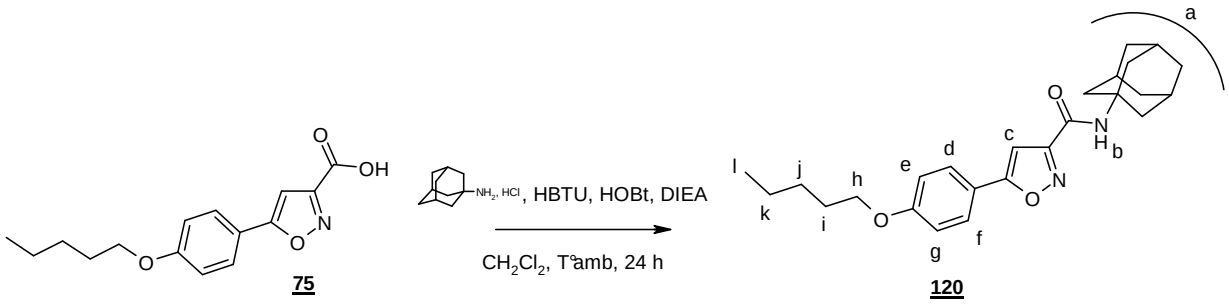
$C_{24}H_{32}N_2O_3$
M = 408.55 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 59 %. ***Rf*** : 0.93 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 108 - 109 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.87 : Hb (s, 1H); 7.44 : Hf, He et Hg (m, 3H); 7.34 : Hc (s, 1H); 7.08 : Hd (d, J = 8.2 Hz, 1H); 4.04 : Hh (t, J = 6.4 Hz, 2H); 2.05 : Ha (m, 9H); 1.73 : Hi (m, 2H); 1.65 : Ha (m, 6H); 1.42 - 1.32 : Hj et Hk (m, 4H); 0.90 : Hl (t, J = 6.7 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 409 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

N-(Adamantan-1-yl)-5-(4-pentyloxyphényl)isoxazole-3-carboxamide



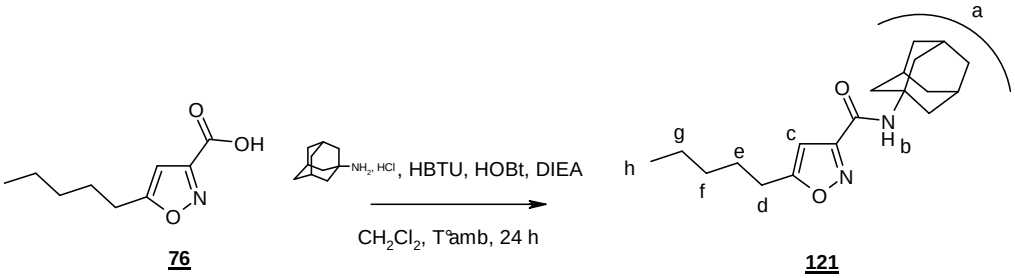
$C_{24}H_{32}N_2O_3$
M = 408.55 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 47 %. ***Rf*** : 0.89 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 155 - 156 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.83 : Hb (s, 1H); 7.80 : Hd et Hf (d, J = 8.6 Hz, 2H); 7.12 : Hc (s, 1H); 7.07 : He et Hg (d, J = 9.0 Hz, 2H); 4.03 : Hh (t, J = 6.4 Hz, 2H); 2.05 : Ha (m, 9H); 1.73 : Hi (m, 2H); 1.65 : Ha (m, 6H); 1.39 - 1.33 : Hj et Hk (m, 4H); 0.89 : Hl (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 409 $(M+H)^+$. Pureté = 100 %.

N-(Adamantan-1-yl)-5-pentylisoxazole-3-carboxamide



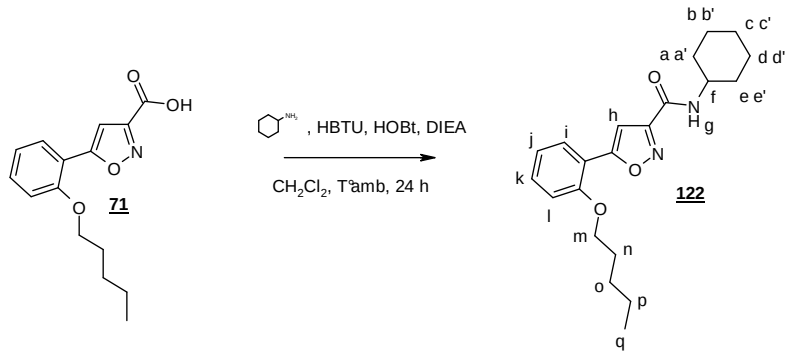
$C_{19}H_{28}N_2O_2$
M = 316.45 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 37 %. ***Rf*** : 0.90 (Cyclohexane / AcOEt, 5:5). ***Point de fusion :*** 48 - 49 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 7.70 : Hb (s, 1H); 6.49 : Hc (s, 1H); 3.17 : Hd (t, J = 5.3 Hz, 2H); 2.76 : He (m, 2H); 2.02 : Ha (m, 9H); 1.63 : Ha (m, 6H); 1.30 - 1.28 : Hf et Hg (m, 4H); 0.86 : Hh (t, J = 6.4 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 317 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

N-Cyclohexyl-5-(2-(pentyloxy)phényl)isoxazole-3-carboxamide



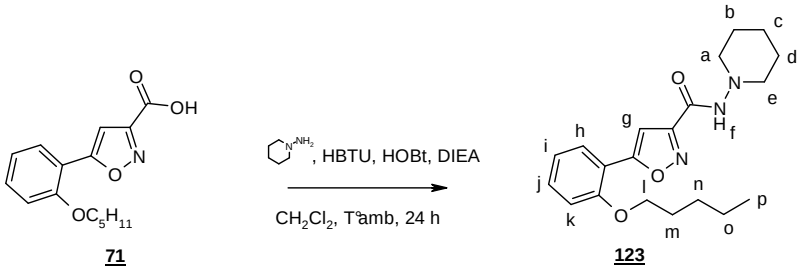
$C_{21}H_{28}N_2O_3$
M = 356.46 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 21 %. ***Rf*** : 0.65 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 68 - 69 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 8.61 : Hg (d, J = 5.7 Hz, 1H); 7.90 : Hl (d, J = 7.3 Hz, 1H); 7.50 : Hj (t, J = 8.4 Hz, 1H); 7.25 : Hi (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7.11 : Hk (t, J = 7.3 Hz, 1H); 7.04 : Hh (s, 1H); 4.16 : Hm (t, J = 6.4 Hz, 2H); 2.72 : Hf (m, 1H); 2.07 : Hn (m, 2H); 1.80 - 1.64 : Ha, Hb, Hc, Hd et He (m, 5H); 1.61 - 1.55 : Ho et Hp (m, 4H); 1.34 - 1.19 : Ha', Hb', Hc', Hd' et He' (m, 5H); 0.90 : Hq (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 357 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

N-(Pipéridin-1-yl)-5-(2-(pentyloxy)phényl)isoxazole-3-carboxamide



$C_{20}H_{27}N_3O_3$
M = 357.46 g/mol
Aspect : solide blanc

Rendement : 27 %. ***Rf*** : 0.60 (Cyclohexane / AcOEt, 7:3). ***Point de fusion :*** 73 - 74 °C. ***Recristallisation :*** Ethanol.

RMN ^{1}H DMSO-d6 : δ (ppm) : 9.78 : Hf (s, 1H); 7.87 : Hk (d, J = 7.6 Hz, 1H); 7.48 : Hi (t, J = 7.3 Hz, 1H); 7.21 : Hh (d, J = 8.5 Hz, 1H); 7.11 : Hj (t, J = 7.6 Hz, 1H); 7.03 : Hg (s, 1H); 4.16 : Hl (t, J = 6.4 Hz, 2H); 2.80 : Ha et He (m, 4H); 1.87 : Hm (m, 2H); 1.58 - 1.56 : Hn et Ho (m, 4H); 1.40 - 1.37 : Hb, Hc et Hd (m, 6H); 0.90 : Hp (t, J = 7.0 Hz, 3H)

LC-MS (APCI$^+$) : 358 $(M+H)^+$. Pureté = 98 %.

I) Protocole expérimental pour la détermination des affinités pour la FAAH

Les tests sont réalisés dans des tubes contenant :

- 6 µg de FAAH recombinante humaine (exprimée chez Escherichia Coli) dans 165 µL de tampon (100 mM de Tris HCl, 1 mM d'EDTA, 0.1 % (w/v) de BSA, pH = 7.4)

- 10 µL d'une solution de composés à tester dans le DMSO (ou le DMSO seul pour les tubes contrôles)

- 25 µL de [^{3}H]-AEA (50 000 dpm, concentration finale 2 µM)

Les tubes sont incubés pendant 10 min à 37 °C. La réaction est ensuite stoppée par un rapide ajout dans la glace, d'un mélange eau/méthanol (1:1, v/v). Les tubes sont ensuite vigoureusement agités. Les phases sont séparées par centrifugation à 850*g, et des aliquots de 200 µL de la phase méthylique supérieure sont prélevés puis passés au compteur de radioactivité.

A chaque test, les tubes ne contenant que du DMSO servent de contrôle et font « le blanc » pour l'hydrolyse chimique. Leur valeur est systématiquement soustraite pour les calculs. Dans ces conditions, l'URB597 inhibe la FAAH humaine avec une CI_{50} de 40 nM. Tous les essais ont été réalisés 3 fois en duplicate. Les CI_{50} ont été calculées quand le pourcentage d'inhibition était supérieur à 60 % à la concentration de 10^{-3} M.

II) Protocole expérimental pour la détermination des affinités pour les récepteurs aux cannabinoïdes

Les études de liaison sont réalisées sur des membranes de cellules CHO exprimant les récepteurs aux cannabinoïdes humains. Dans un premier temps, les composés sont solubilisés dans le DMSO pour obtenir des solutions à 10^{-2} M. Celles-ci sont ensuite diluées au moins 100 fois dans le tampon utilisé pour les études de liaison (50 mM de Tris HCl, 3 mM de $MgCl_2$, 1 mM d'EDTA, 0.5 % de BSA, pH = 7.4) pour atteindre une concentration finale en DMSO inférieure à 0.1 %.

Chaque composé à tester est mis à la bonne concentration, en présence de 40 µG de membranes et de 1 nM de radioligand de référence ([^{3}H]-SR-141716A pour le récepteur CB1, [^{3}H]-CP 55,940 pour le récepteur CB2) pour obtenir un volume final de 500 µL. La radioactivité non spécifique est déterminée en présence de 10 µM de HU-210. Après 1 h d'incubation à 30 °C, les solutions sont rapidement filtrées (filtre à fibres de verre préalablement traité avec 0.5 % de PEI) à l'aide d'un harvester M-48T brandell et lavées 2 fois avec 5 mL de tampon sans BSA. Cette étape permet la rétention des protéines et l'élimination du traceur libre. La

radioactivité liée, restée sur le filtre, est mesurée par scintillation (compteur Pharmacia Wallac 1410 β) après traitement des filtres avec 10 mL d'Aqualuma. Tous les essais sont réalisés trois fois en duplicate. Une valeur de Ki est également déterminée pour les composés présentant des pourcentages de déplacement supérieurs à 60 % à la concentration de 10^{-5} M.

III) Protocole expérimental pour l'évaluation de la colite induite par le TNBS

Les souris C57B16 (10 ou 6 par groupe) ont accès librement à la nourriture et à l'eau. Pour l'induction de la colite, les souris sont anesthésiées par l'administration sous-cutanée de xylazine-kétamine (50 mg/kg) et reçoivent une administration intrarectale de TNBS (40 µL, 150 mg/kg) solubilisé dans le même volume de NaCl 0.9 % - éthanol 100 % (1:1). Les souris contrôles reçoivent 40 µL de la solution de NaCl 0.9 % - éthanol 100 % mélangés avec un volume égal de sérum physiologique. Les granulés de 5-ASA sont mélangés dans la nourriture du groupe témoin à la dose de 150 mg/kg. Le composé **95** est dissous dans le véhicule (DMSO 2 %, Tween 80 1%) et administré par voie IP trois jours avant l'induction de la colite à la dose de 10 mg/kg.

Trois jours après l'induction de la colite, les animaux sont euthanasiés. Les variations de poids corporel, les indications macroscopiques et histologiques sont évaluées par deux manipulateurs. Le côlon de chaque souris est examiné pour évaluer les lésions macroscopiques selon le score de Wallace. Le score de Wallace chiffre les lésions sur une échelle de 0 à 10 en se basant sur les caractéristiques reflétant l'inflammation telles que l'hyperémie, l'épaississement de la paroi intestinale et l'étendue de l'ulcération.

Score	Critères d'évaluation macroscopique selon Wallace
0	Aucune inflammation
1	Hyperémie sans ulcération
2	Hyperémie avec épaississement de la muqueuse sans ulcération
3	Ulcération avec épaississement de la muqueuse
4	Deux ou plusieurs sites ulcérés ou inflammatoires
5	Deux ou plusieurs sites majeurs ulcérés et inflammatoires ou un site ulcéré ou inflammatoire = 1 cm
6	Zone ulcérée ou inflammatoire = 2 cm
7	Zone ulcérée ou inflammatoire = 3 cm
8	Zone ulcérée ou inflammatoire = 4 cm
9	Zone ulcérée ou inflammatoire = 5 cm
10	Zone ulcérée ou inflammatoire = 6 cm

Pour les évaluations histologiques, des échantillons de côlon localisés précisément 2 cm au-dessus du canal anal sont prélevés et fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 4 % avant d'être stockés à 4 °C pendant 24 h pour obtenir une fixation optimale. Les prélèvements sont ensuite déshydratés, inclus en paraffine et des coupes fines de 4 µM d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome. Comme pour l'évaluation macroscopique, l'intensité des dommages coliques est déterminée par 2 manipulateurs. Pour l'analyse des lames, une coloration de type May-Grunwald-Giemsa (MGG) est réalisée et le calcul du score histologique de la colite est effectué selon les critères d'Ameho. Ce score allant de 0 à 6 prend en compte le degré de l'infiltrat inflammatoire, la présence d'érosion de la muqueuse, d'ulcération ou de nécrose ainsi que la profondeur et l'étendue des lésions.

Score	Critères d'évaluation histologique selon Ameho
0	Histologie normale
1	Infiltrat inflammatoire muqueux et/ou sous-muqueux modéré avec œdème. Erosions muqueuses ponctiformes. Intégrité de la *muscularis mucosae*
2	Identique au score 1 mais anomalies présentes sur plus de 50 % du prélèvement
3	Infiltrat inflammatoire important avec des aires d'ulcération s'étendant au-delà de la *muscularis mucosae* et presque à la sous-muqueuse
4	Identique au score 3 mais anomalies présentes sur plus de 50 % du prélèvement
5	Ulcération très étendue avec nécrose cellulaire s'étendant au moins jusqu'à la *muscularis mucosae*
6	Identique au score 5 mais anomalies présentes sur plus de 50 % du prélèvement

La partie restante du côlon est congelée et utilisée pour la quantification par PCR en temps réel des taux d'ARNm de cytokines inflammatoires TNF-α et IL-1β. L'ARNm total est extrait du côlon à l'aide du kit commercial Nucleospin RNA II (Macherey Nagel, Hoerdt, France) selon les indications du fabricant. Les cellules sont lysées dans un tampon contenant 1 % de β-mercaptoéthanol. Les prélèvements de muqueuse coliques sont broyés dans le même tampon à l'aide d'un homogénéiseur (Ultra Turrax T8). Les lysats sont filtrés puis, après adjonction d'éthanol à 70 %, les acides nucléiques sont adsorbés sur une colonne de silice. Après élimination des sels contenus dans la membrane, l'acide désoxyribonucléique (ADN) génomique est digéré au moyen d'une désoxyribonucléase (DNAse I). Après lavage, les ARN totaux sont élués à l'aide de 60 µL d'eau sans ribonucléase puis quantifiés. 1 µg d'ARN est ensuite rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par action de la transcriptase inverse en utilisant le kit commercial High Capacity cDNA *Archive Kit* (Applied Biosystems) en suivant les instructions du fabricant. Les taux d'ADNc des gènes d'intérêt sont estimés par PCR en temps réel sur 40 cycles (détecteur : SYBR-GREEN, Applied biosystems). Le SYBR Green

est un fluorochrome qui a la capacité de s'intercaler entre les bases de l'ADN double brin. L'évolution de la PCR peut donc être suivie grâce à la fluorescence émise par le SYBR green et analysée par un automate ABIprism 7000. La quantification de l'expression des gènes est calculée par la méthode comparative des ΔCT selon la formule : $2^{-\Delta\Delta CT}$ où ΔΔCT = [(CTgène d'intérêt du groupe testé – CTgène de référence du groupe testé) – (CTgène d'intérêt du groupe témoin – CT gène de référence du groupe témoin)] en utilisant comme référence, la β-actine. Les séquences des amorces utilisées pour la reconnaissance de l'ADNc de souris sont :

β-actine, TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAACTAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG ;

TNF-α, TGGGAGTAGACAAGGTACAACCCCATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA ;

IL-1β, CAACCAACAAGTGATATTCTCCATGGATCCACACTCTCCAGCTGCA.

Modèle utilisé pour le docking des inhibiteurs de FAAH

Les travaux de modélisation moléculaire ont été réalisés au laboratoire du Pr. Philippe Chavatte et plus particulièrement par M. Nicolas Renault.

Le docking a été réalisé avec GOLD 3.0.1 à partir du fichier cristallographique 1MT5 disponible dans la Protein Data Bank (http : //www.rcsb.org/pdb/), représentant la FAAH cocristallisée avec le MAFP.[301] Les études de modélisation moléculaire ont été effectuées sur une station Silicon Graphics avec le logiciel SYBYL (version 6.9). Les modèles tridimensionnels des structures étudiées ont été construits à partir d'une librairie de fragments standards et leur géométrie a été optimisée par l'utilisation du champ de force Tripos dans lequel les termes électrostatiques sont calculés à partir des charges atomiques de Gasteiger et Hückel. La méthode de Powell disponible dans la procédure Maximin2 a été utilisée pour minimiser l'énergie de telle sorte que la valeur du gradient soit plus petite que 0,001 kcal/mol.Å.[302,303]

[301] Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 235-242

[302] Jones G., Willet P., Glen R. C., Leach A. R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.*, **1997**, *267*, 727-748

[303] Jones G., Willet P., Glen R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.*, **1995**, *245*, 43-53

Les MICI (Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin) invalident 200 000 personnes en France. La région Nord Pas-de-Calais est particulièrement touchée par ces affections et les traitements disponibles pour ces pathologies demeurent coûteux et peu nombreux.

Des études récentes ont suggéré que le système endocannabinoïde, exprimé au sein du tractus gastro-intestinal, est une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement des MICI.

Ce système se compose des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2, des ligands endogènes de ces récepteurs, notamment l'anandamide et le 2-arachidonoylglycérol et des protéines impliquées dans la biosynthèse et la biodégradation des ligands.

L'anandamide a présenté des capacités à prévenir la colite induite par le TNBS à des rongeurs. Toutefois, *in vivo* ce composé possède un temps de demi-vie court et est rapidement dégradé par une amidase à sérine, la FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase).

Nous avons ainsi envisagé la conception, la synthèse et l'évaluation pharmacologique de nouveaux inhibiteurs de la FAAH.

L'une de nos molécules, le composé **95**, présentant une CI_{50} sur l'enzyme de 88 nM a été injectée par voie intrapéritonéale à des souris dont la colite a été induite trois jours plus tard par l'injection intrarectale de TNBS. L'évaluation des scores macroscopiques et microscopiques des dommages causés sur le côlon par l'agent irritant a ensuite été effectuée. L'inflammation du côlon a été significativement réduite chez le groupe de souris ayant été traité par le composé **95**, montrant que l'inhibition de la FAAH est une stratégie thérapeutique efficace dans le traitement des MICI.

DESIGN, SYNTHESIS AND PAHRAMACOLOGICAL EVALUATION OF NEW FATTY ACID AMIDE HYDROLASE (FAAH) INHIBITORS POTENTIALLY USEFUL IN THE TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DESEASES (IBD)

IBD (Inflammatory Bowel Diseases) invalidate 200 000 persons in France. Nord Pas-de-Calais region is particularly touched by these diseases and the available treatments for these pathologies are few and expensive.

Recent studies have suggested that endocannabinoid system expressed in the gastrointestinal tract was a promising therapeutic target for the IBD treatment.

This system is made up of cannabinoids receptors CB1 and CB2, endogenous ligands of these receptors, notably anandamide and 2-arachidonoylglycerol, and proteins involved in ligands metabolism.

Anandamide has shown properties to prevent TNBS-induced colitis in mice. However, *in vivo*, anandamide possesses a short life time and is rapidly hydrolyzed by a serine amidase, the FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase). In this context, we have considered the design, the synthesis and the pharmacological evaluation of new FAAH inhibitors.

One of our molecules, compound **95**, inhibiting the enzyme with an IC_{50} value of 88 nM has been injected intraperitonally to mice which the colitis was induced three days later by intrarectal TNBS administration. The assessment of macroscopic and microscopic scores of colonic damages was undergone. Colonic inflammation was significatively reduced in the group of mice which has been treated by **95**, showing evidence that FAAH was an effective therapeutic strategy for the treatment of IBD.

Mots-clés : MICI, endocannabinoïde, anandamide, inhibiteur, FAAH, isoxazole

Key words : IBD, endocannabinoid, anandamide, inhibitor, FAAH, isoxazole