



HAL
open science

Synthèse et évaluation d'inhibiteurs du transport de l'iode dans la thyroïde

Pierre Lacotte

► **To cite this version:**

Pierre Lacotte. Synthèse et évaluation d'inhibiteurs du transport de l'iode dans la thyroïde. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112359 . tel-00923159

HAL Id: tel-00923159

<https://theses.hal.science/tel-00923159>

Submitted on 2 Jan 2014

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 PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : *CHIMIE PARIS-SUD (ED470)*

Laboratoire de Chimie Bioorganique, SCBM, CEA-Saclay

DISCIPLINE : CHIMIE

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 18 décembre 2012

par

Pierre LACOTTE

Synthèse et évaluation d'inhibiteurs du transport
de l'iode dans la thyroïde

Directeur de thèse : Yves AMBROISE Chef d'équipe (CEA-Saclay)

Composition du jury :

Président du jury :	Jean-Daniel BRION	Professeur (Université Paris-Sud)
Rapporteurs :	Jean-Claude FLORENT	Chef d'équipe (Institut Curie)
	Sylviane GIORGI-RENAULT	Professeur (Université Paris V)
Examineurs :	Pascal GEORGE	Vice-président (Société de Chimie Thérapeutique)
	Samir ZARD	Professeur (Ecole Polytechnique)
Membres invités :	Philippe DESBORDES	Chef d'équipe (BayerCropScience)

Abréviations, symboles & unités

A	Absorbance
ACN	Acétonitrile
ADME	Absorption-Distribution-Métabolisme-Excrétion
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
Asn	Asparagine
ATS	Anti-thyroïdiens de synthèse
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCM	Chromatographie sur couche mince
CD	<i>Circular dichroism</i>
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazole
cHex	Cyclohexane
cLog P	<i>Calculated Log P</i>
δ	Déplacement chimique (RMN)
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DHPM	Dihydropyrimidinone (étendu aux dihydropyrimidinethiones)
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DIT	Diiodotyrosine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDCI	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
éq.	Equivalent
ES	Electrospray
FRTL-5	<i>Fisher Rat Thyroid Low serum 5 %</i>
HATU	Hexafluorophosphate de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium
HBA	<i>Hydrogen bond acceptor</i>
HBD	<i>Hydrogen bond donor</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High-Resolution Mass Spectroscopy</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
IC ₅₀	Demi-concentration inhibitrice
<i>J</i>	Constante de couplage

K _d	Constante de dissociation
K _i	Constante d'inhibition
λ	Longueur d'onde
LAH	<i>Lithium Aluminium Hydride</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>
Log P	Logarithme du coefficient de partition eau/octanol P
<i>m</i> -CPBA	<i>meta-Chloroperbenzoic acid</i>
MIT	Monoiodotyrosine
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MW	<i>Molecular weight</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimide</i>
NIS	<i>Na⁺/I⁻ symporter</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCC	<i>Pyridinium chlorochromate</i>
PD	<i>Pharmacodynamics</i>
PK	<i>Pharmacokinetics</i>
ppm	Partie par million
PSA	<i>Polar surface area</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RAIU	<i>Radioactive Iodine Uptake</i>
RB	<i>Rotatable bond</i>
R _f	Rapport frontal (CCM)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROF	<i>Rule of Five (Règles de Lipinski)</i>
rpm	<i>Revolution per minute</i>
SAR	<i>Structure-Activity Relationships</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
siRNA	<i>Short Interfering RNA</i>
t.a.	Température ambiante
TEA	Triéthylamine
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
Tf	Triflate
Tg	Thyroglobuline
THF	Tétrahydrofurane
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
TPO	Thyropéroxydase
Ts	Tosyle
TSH	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	p.11
CHAPITRE I : Rapport bibliographique.....	p.13
I.1 LA THYROÏDE : FONCTIONNEMENT, PHYSIOPATHOLOGIE.....	p.13
I.1.a. Généralités.....	p.13
i) Anatomie.....	p.13
ii) Physiologie.....	p.14
iii) Régulation de l'activité thyroïdienne.....	p.16
I.1.b. Le symporteur iode/sodium (NIS).....	p.17
i) Structure.....	p.17
ii) Caractérisation fonctionnelle.....	p.18
I.1.c. Physiopathologie de la thyroïde.....	p.19
i) Hypothyroïdie.....	p.19
ii) Hyperthyroïdie.....	p.20
iii) Exposition aux isotopes radioactifs de l'iode.....	p.20
iv) Cancers thyroïdiens.....	p.21
v) Cancers extra-thyroïdiens.....	p.22
I.2 MODULATEURS DU TRANSPORT DE L'IODE.....	p.22
I.2.a. Activateurs du transport de l'iode.....	p.22
I.2.b. Inhibiteurs du transport de l'iode.....	p.23
i) Inhibiteurs inorganiques.....	p.23
ii) Inhibiteurs organiques.....	p.24
I.3 DIHYDROPYRIMIDINONES – SYNTHÈSE ET ACTIVITÉ BIOLOGIQUE.....	p.26
I.3.a. Synthèse - La réaction de Biginelli.....	p.27
i) Mécanisme.....	p.27
ii) Conditions opératoires.....	p.30
iii) Réactifs.....	p.30
I.3.b. Applications biologiques des dihydropyrimidinones.....	p.32
I.4 TETRAHYDROCARBOLINES – SYNTHÈSE ET ACTIVITÉ BIOLOGIQUE.....	p.33
I.4.a. Synthèse - La réaction de Pictet-Spengler.....	p.34
I.4.b. Applications biologiques des tétrahydrocarboline.....	p.36

I.5 LA CHEMOGENOMIQUE.....	p.37
I.5.a. Principe.....	p.37
I.5.b. Identification de protéines par méthodes d'affinité.....	p.39
i) Chromatographie d'affinité.....	p.39
ii) Photomarquage d'affinité.....	p.40
I.6 CONCLUSION.....	p.44
<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>p.45</i>
CHAPITRE II : Objectifs et stratégies envisagées.....	p.51
II.1 OBJECTIFS.....	p.51
II.2 STRATEGIES ENVISAGEES.....	p.51
II.2.a. Relations structure-activité.....	p.51
II.2.b. Optimisation de l'activité biologique.....	p.52
II.2.c. Recherche de protéines impliquées dans le transport de l'iode.....	p.53
<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>p.55</i>
CHAPITRE III : Etude du composé <u>ITB₉</u>.....	p.57
III.1 ANALYSES PRELIMINAIRES.....	p.57
III.1.a. Analyse de la structure d'<u>ITB₉</u> et nomenclature.....	p.57
III.1.b. Stratégies de synthèse d'analogues d'<u>ITB₉</u>.....	p.58
III.2 SYNTHÈSE D'ANALOGUES « DE PREMIÈRE GÉNÉRATION ».....	p.60
III.2.a. Mise au point des conditions opératoires.....	p.60
III.2.b. Modification de B₄ et R₄.....	p.62
i) Substitution du cycle aromatique.....	p.62
ii) Remplacement par des hétérocycles.....	p.64
iii) Remplacement par des chaînes aliphatiques.....	p.65
iv) Longueur du bras B ₄	p.65
III.2.c. Modification de B₅ et R₅.....	p.66
i) Substitution du cycle aromatique.....	p.67
ii) Remplacement par des hétérocycles.....	p.68
iii) Autres analogues.....	p.69
iv) Longueur du bras B ₅	p.70
III.2.d. Modification de R₆.....	p.71
III.2.e. Modification de R₁ et R₃.....	p.72
i) Substitution en R ₁	p.72

ii) Substitution en R ₃	p.73
III.2.f. Autres analogues.....	p.74
i) Modification du cycle DHPM.....	p.74
ii) Modification des hétéroatomes X et Y.....	p.75
III.2.g. Conclusion.....	p.76
III.3 DETERMINATION DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE.....	p.76
III.3.a. Principe du test d'incorporation d'iodures dans les cellules FRTL-5.....	p.77
III.3.b. Partie Nord.....	p.78
III.3.c. Partie Est.....	p.80
i) Longueur du bras B ₄	p.80
ii) Résultats en série « phényl substitué »	p.80
iii) Résultats en série hétérocyclique.....	p.82
iv) Résultats en série aliphatique.....	p.84
v) Conclusion de la SAR pour la partie Est.....	p.85
III.3.d. Partie Sud.....	p.85
i) Longueur du bras B ₅	p.85
ii) Influence de la nature de R ₅	p.85
III.3.e. Partie Ouest.....	p.87
III.3.f. Cœur DHPM.....	p.89
III.3.g. La question de l'ester.....	p.89
III.3.h. Mesures de cytotoxicité.....	p.92
III.3.i. Conclusion.....	p.93
III.4 VERS DES MEDICAMENTS DERIVES D'ITB₉ ?.....	p.94
III.4.a. Synthèse d'analogues « de seconde génération »	p.95
III.4.b. Activités biologiques.....	p.96
III.4.c. Etude de la stéréochimie en C₄.....	p.98
III.4.d. Des candidats pharmaceutiques prometteurs.....	p.101
III.4.e. Conclusion.....	p.102
III.5 SONDES PHOTOACTIVABLES DERIVEES D'ITB₉.....	p.103
III.5.a. Conception des sondes.....	p.103
III.5.b. Synthèse des groupements <u>141</u> et <u>142</u>.....	p.104
i) Synthèse du bras desthiobiotinylé <u>141</u>	p.104
ii) Synthèse du groupement photoactivable <u>142</u>	p.105
III.5.c. Synthèse de la sonde <u>139</u>.....	p.106
III.5.d. Synthèse de la sonde <u>140</u>.....	p.109

III.5.e. Photomarquage d'affinité.....	p.112
i) Principe et conditions.....	p.112
ii) Résultats.....	p.113
III.5.f. Conclusion.....	p.115
III.6 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	p.116
Références bibliographiques.....	p.119
CHAPITRE IV : Etude du composé ITB_2	p.121
IV.1 TRAVAUX PRELIMINAIRES.....	p.121
IV.1.a. Analyse de la structure d' ITB_2 et nomenclature.....	p.121
IV.1.b. Stratégies de synthèse d'analogues d' ITB_2	p.122
IV.1.c. Travaux antérieurs.....	p.123
i) Travaux effectués par le Dr. Verhaeghe.....	p.123
ii) Travaux effectués par le Dr. Waltz.....	p.124
iii) Travaux effectués par le Dr. Ambroise.....	p.125
iv) Travaux effectués par X. Monchaussat.....	p.126
IV.2 SYNTHÈSE D'ANALOGUES « DE PREMIÈRE GÉNÉRATION »	p.127
IV.2.a. Modification du cycle A.....	p.127
IV.2.b. Modification du cycle B.....	p.128
i) Isoquinolines.....	p.128
ii) Modulation de l'azote N_{12}	p.129
IV.2.c. Modification du cycle C.....	p.131
i) Oxydation.....	p.131
ii) Extension/réduction du cycle.....	p.132
iii) Position de l'azote.....	p.135
iv) Nature de l'hétéroatome.....	p.136
v) Fonctionnalisation de l'azote N_2	p.138
IV.2.d. Modification du cycle D.....	p.140
i) Série alkyle.....	p.140
ii) Série hétérocyclique.....	p.141
iii) Substitution du noyau phényle.....	p.141
iv) Nature du bras espaceur.....	p.143
v) Autres analogues.....	p.144
IV.3 DÉTERMINATION DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ.....	p.145
IV.3.a. Cycles A-B-C.....	p.146
IV.3.b. Cycle D.....	p.148

i)	Série alkyle.....	p.148
ii)	Série hétérocyclique.....	p.149
iii)	Substitution du noyau phényle.....	p.149
iv)	Nature du bras espaceur.....	p.152
IV.3.c.	Conclusion.....	p.153
IV.4	OPTIMISATION DE L'ACTIVITE DANS LA FAMILLE D'ITB₂.....	p.154
IV.4.a.	Analogues « de seconde génération »	p.154
IV.4.b.	Détermination de la configuration active.....	p.156
i)	Co-cristallisation.....	p.157
ii)	Dichroïsme circulaire.....	p.158
IV.4.c.	Conclusion.....	p.160
IV.5	SONDES PHOTOACTIVABLES DERIVEES D'ITB₂.....	p.160
IV.5.a.	Conception des sondes.....	p.160
IV.5.b.	Synthèse d'une sonde dérivée d'ITB₂.....	p.161
i)	Synthèse d'une première sonde 285	p.161
ii)	Synthèse d'une deuxième sonde 288	p.162
iii)	Activité biologique de 288 et des intermédiaires de synthèse.....	p.163
IV.5.c.	Photomarquage d'affinité.....	p.163
i)	Identification de protéines spécifiques d'ITB ₂	p.163
ii)	Comparaison de deux sonde dérivées d'ITB ₂ , 166 et 288	p.165
iii)	Purification des échantillons marqués par 288 pour identification...	p.166
IV.6	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	p.167
	<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>p.169</i>
CHAPITRE V	: A la recherche de nouvelles familles d'inhibiteurs.....	p.171
V.1	DETERMINATION D'UN MODELE PHARMACOPHORIQUE D'ITB₉.....	p.171
V.2	CRIBLAGE SUR LES CHIMIOTHEQUES COMMERCIALES.....	p.173
V.2.a.	Présentation des chimiothèques.....	p.174
V.2.b.	Résultats du criblage virtuel.....	p.174
V.3	EVALUATION BIOLOGIQUE – FAIRE DU NEUF AVEC DU VIEUX ?.....	p.176
V.4	CONCLUSION.....	p.178

Références bibliographiques..... p.179

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... p.181

PARTIE EXPERIMENTALE..... E-1

Biologie et biochimie..... E-3

Chemistry and organic synthesis..... E-25

ANNEXES

Annexe I : Calcul des PSA

Annexe II : Diffraction aux rayons X de (S)-ITB₂

Annexe III : Résultats du criblage des chimiothèques sur le pharmacophore

Annexe IV : Structures et activités des analogues d'ITB₉

Annexe V : Structures et activités des analogues d'ITB₂

Introduction générale

L'iode (du grec ιωδης : violet) a été découvert par le chimiste français Bernard Courtois en 1811. D'une faible abondance naturelle, il est pourtant l'oligo-élément essentiel le plus lourd, indispensable à l'homme pour la synthèse des hormones thyroïdiennes. Les principales sources terrestres d'iode sont les gisements de nitrate (Chili), les eaux saumâtres des champs gaziers (Japon, Etats-Unis), ainsi que certaines algues de la famille des *Laminariaceae* (laminaires). Les apports en iode chez l'être humain proviennent presque exclusivement de l'alimentation ; les principales sources d'iode alimentaire sont les algues, les poissons de mer, ainsi que le sel iodé. L'absorption quotidienne d'iode doit être d'environ 100 µg chez l'adulte afin de garantir un fonctionnement normal de la thyroïde. Cette glande endocrine constitue en effet le principal réservoir d'iode de l'organisme. Sa capacité à accumuler l'iode sous forme d'ions iodure a été observée pour la première fois en 1896 et utilisée à des fins thérapeutiques dès 1942.

En 1996, le transporteur responsable de l'accumulation d'iode dans les cellules folliculaires thyroïdiennes a été identifié : il s'agit du symporteur iode/sodium (NIS). Ce transporteur représente une cible thérapeutique d'importance, dans la mesure où il est impliqué plus ou moins directement dans un certain nombre de pathologies thyroïdiennes se traduisant par une dérégulation de la synthèse hormonale. Par ailleurs, il est aussi responsable de l'accumulation d'isotopes radioactifs de l'iode dans la glande thyroïde chez les populations exposées à l'industrie nucléaire. Enfin, son utilisation est envisagée pour le traitement de cancers extra-thyroïdiens par radiothérapie à l'iode 131. Cependant, les mécanismes qui régissent le fonctionnement de ce transporteur (interactions avec des protéines partenaires, régulations cellulaire et post-traductionnelle...) sont encore très mal connus.

Le rôle crucial joué par le NIS dans le fonctionnement de la thyroïde et le transport de l'iode conduit naturellement à rechercher des petites molécules organiques pouvant moduler son activité. Celles-ci permettront à terme de couvrir trois champs d'application :

- une meilleure prise en charge des patients atteints de pathologies thyroïdiennes, notamment dans les cas de résistance aux traitements existant actuellement ou à cause de certains effets secondaires qu'ils engendrent.
- une meilleure protection des populations exposées aux isotopes radioactifs de l'iode, de manière régulière (industrie nucléaire) ou accidentelle (populations civiles à proximité des centrales).

- une meilleure caractérisation des mécanismes impliqués dans le transport de l'iode, *via* l'utilisation de biosondes dérivées d'inhibiteurs de forte affinité.

Dans cette optique, un criblage haut-débit a été réalisé au laboratoire en 2006 ; il a conduit, entre autres, à l'identification de deux « têtes de file » : la tétrahydro- β -carboline **ITB₂** et la dihydropyrimidinone **ITB₉**, qui feront l'objet des travaux présentés dans ce manuscrit.

Dans le chapitre I seront donc présentés le fonctionnement général de la glande thyroïde et du NIS, ainsi que les pathologies thyroïdiennes et les traitements existants. Une autre partie traitera plus spécifiquement des petites molécules organiques reportées dans la littérature pour leur activité modulatrice du transport d'iode. A cette occasion seront introduites les deux « têtes de file » **ITB₂** et **ITB₉**, qui feront l'objet des travaux de ce manuscrit ; les deux familles chimiques auxquelles elles appartiennent seront succinctement présentées. Enfin, nous aborderons la technique de génétique chimique directe, qui permet, entre autres, d'identifier les protéines-cibles d'un ligand organique. Après avoir défini les objectifs et les stratégies envisagées dans le chapitre II, nous présenterons dans les chapitres III et IV les résultats des travaux respectivement effectués sur **ITB₉** et **ITB₂**. Enfin, le chapitre V sera consacré à une approche de modélisation moléculaire basée sur les résultats du chapitre III et visant à découvrir de nouvelles structures chimiques inhibant le transport de l'iode.

Chapitre I : Rapport Bibliographique

Dans ce chapitre bibliographique seront exposés dans un premier temps le fonctionnement, la physiologie et la physiopathologie de la glande thyroïde, en mettant particulièrement l'accent sur le symporteur iode/sodium (NIS) et son rôle dans l'accumulation de l'iode par les thyrocytes. Dans une deuxième partie, nous présenterons les petites molécules organiques décrites à ce jour comme modulateurs de cette activité de transport (activateurs ou inhibiteurs). Puis, deux familles de molécules à activité biologique – les dihydropyrimidinones et les tétrahydro- β -carbolines – seront rapidement étudiées du point de vue synthétique et biologique ; ces deux familles correspondent en effet aux deux séries de molécules inhibitrices du transport de l'iode étudiées dans ce manuscrit. Enfin, un dernier aspect traitera de la génétique chimique directe, méthode biochimique permettant entre autres d'identifier les protéines-cibles d'une molécule organique ; cette approche sera en effet employée pour tâcher de déterminer la ou les cible(s) protéique(s) de chaque inhibiteur.

1. La thyroïde : fonctionnement, physiopathologie

a. Généralités

i) Anatomie^{1,2}

La thyroïde est une glande endocrine située dans la partie inférieure du cou, en avant de la trachée et sous le larynx. D'une dimension de quelques centimètres et d'un poids de 15 à 20 grammes, elle est formée de deux lobes verticaux reliés par l'isthme thyroïdien et est très richement vascularisée. Le tissu thyroïdien est organisé en lobules, séparés par du tissu conjonctif ; ces lobules contiennent chacun 20 à 40 follicules (Figure 1).

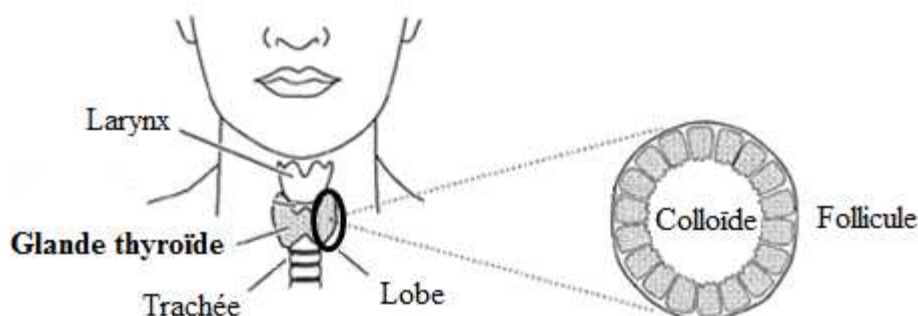


Figure 1 : Morphologie de la thyroïde (d'après De la Vieja & al.³)

Ces follicules thyroïdiens représentent l'unité morpho-fonctionnelle élémentaire de la glande thyroïde. Siège de la synthèse des hormones thyroïdiennes, le follicule est une structure sphérique constituée d'une unique couche de cellules épithéliales, les thyrocytes, entourant une matrice protéique de thyroglobuline, la colloïde. Dans les espaces interfolliculaires, on trouve également des cellules parafolliculaires (ou cellules C) sécrétant de la calcitonine, ainsi que les vaisseaux sanguins qui vascularisent l'ensemble. Les thyrocytes représentent toutefois plus de 99 % des cellules du parenchyme thyroïdien. Les thyrocytes sont des cellules polarisées, comprenant un pôle basolatéral en contact avec la circulation sanguine et un pôle apical en contact avec la lumière du follicule.

ii) Physiologie

La fonction physiologique de la thyroïde est la production des hormones thyroïdiennes. Mis à part la calcitonine sécrétée par les cellules parafolliculaires, il s'agit de (Figure 2):

- La triiodothyronine (ou T_3), molécule triiodée
- La thyroxine (ou T_4), prohormone de T_3 , molécule tétraiodée

Les hormones T_3 et T_4 sont impliquées dans la stimulation de nombreux processus et métabolismes : synthèse protéique, métabolisme du glucose et du cholestérol, régulation du rythme cardiaque... Par ailleurs, ces hormones jouent un rôle capital dans le développement du système nerveux central aux stades embryonnaire et fœtal, et sont indispensables à la croissance générale des tissus osseux et musculaires en particulier⁴.

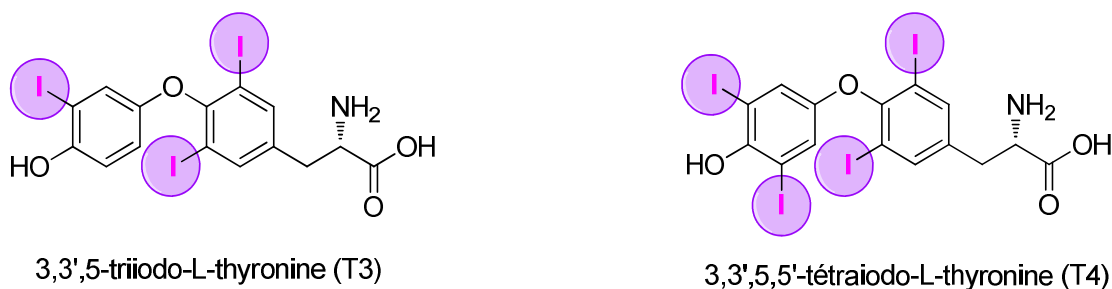


Figure 2 : Structures chimiques des hormones thyroïdiennes T_3 et T_4

Le mécanisme général de production des hormones thyroïdiennes peut être décomposé en quatre étapes principales (Figure 3).

- *Captation de l'iode* : les ions iodure plasmatiques sont captés au niveau du pôle basolatéral des thyrocytes. Cette première étape cruciale fait intervenir un mécanisme de séquestration puissant, assuré par un transporteur dépendant du sodium, le NIS (*Sodium-Iodide Symporter*).⁵ Il s'agit de l'étape limitante de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes.

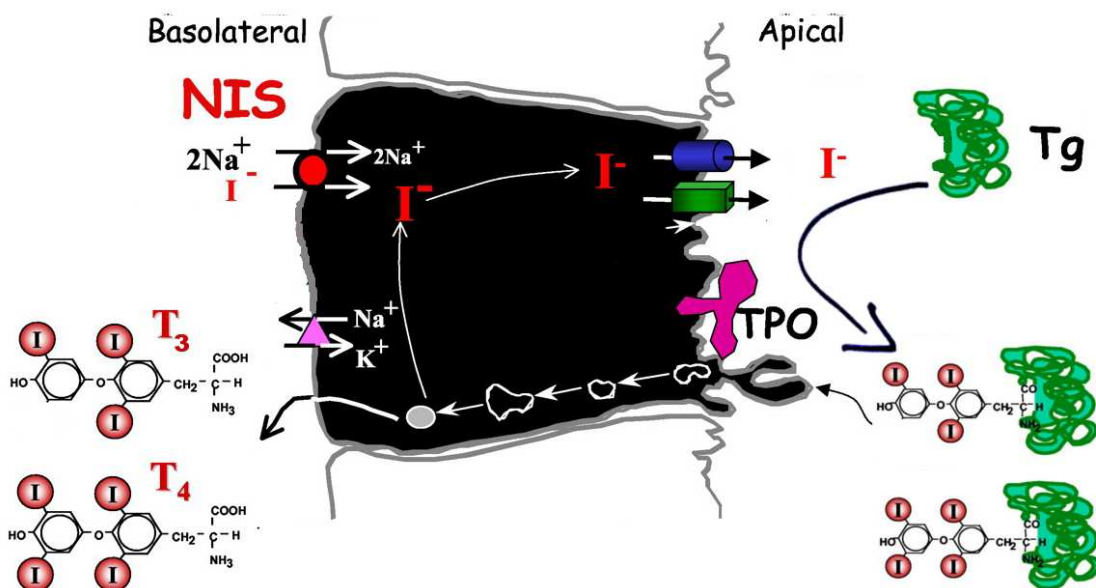


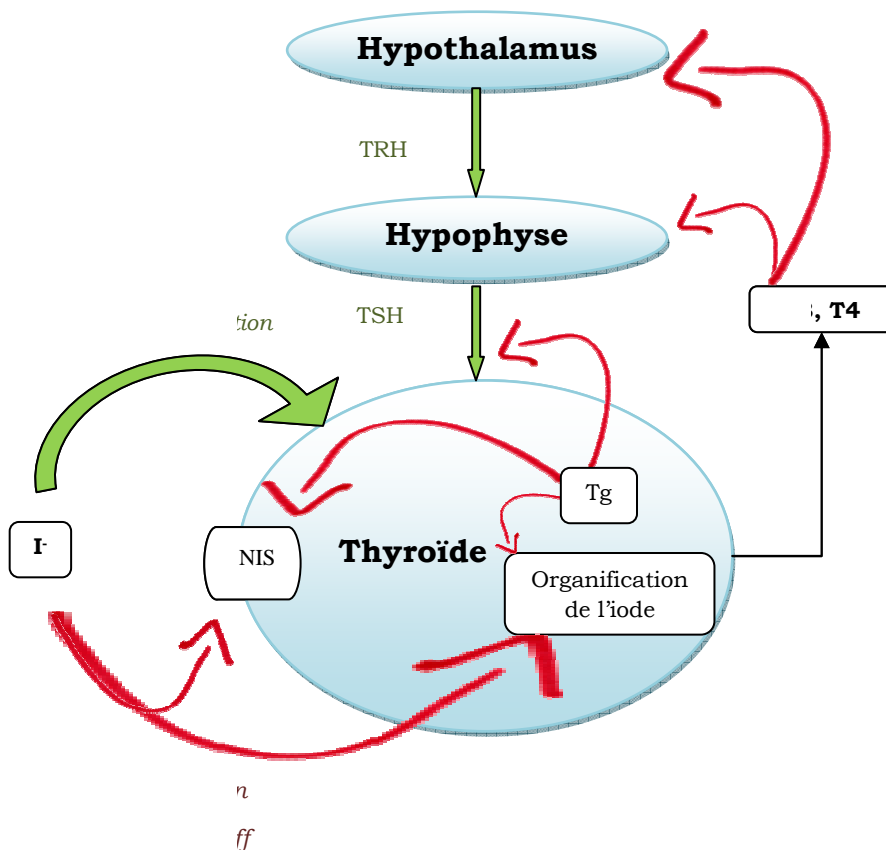
Figure 3 : Biosynthèse des hormones thyroïdiennes (adapté de Carrasco & coll.⁶)

- *Transport vers la lumière folliculaire* : cet efflux à travers le pôle apical s'effectue dans le sens du gradient électrochimique, mais les mécanismes exacts qui le régissent sont mal connus⁷ ; tout au plus l'implication d'un transporteur membranaire – la pendrine^{8,9} - a-t-elle été reportée, mais de nombreuses controverses subsistent quant à son rôle exact.^{10,11}
- *Organification* : dans la lumière folliculaire, l'iodure est aussitôt pris en charge par la thyroperoxydase (TPO), enzyme à fer ferrique, qui catalyse son incorporation à la thyroglobuline (Tg, glycoprotéine de 660 kDa). Plus en détail, l'iodure est d'abord oxydé à l'état 0, puis incorporé sur les tyrosines de la thyroglobuline pour former des résidus MIT (monoiodotyrosine) ou DIT (diiodotyrosine). Enfin, un couplage d'une unité DIT à un MIT ou un DIT permet de former respectivement les précurseurs de T₃ (Tg-DIT-MIT) et T₄ (Tg-DIT-DIT).
- *Relargage des hormones* : plus de 99 % de l'iode thyroïdien est stocké dans la colloïde sous forme organifiée (Tg-T₃ et Tg-T₄). Les stocks ainsi constitués sont suffisants pour deux mois et permettent de pallier les variations des apports journaliers. Lorsque la sécrétion d'hormones est nécessaire, la thyroglobuline iodée est endocytée, puis la fusion des vésicules d'endocytose avec un lysosome permet le clivage des précurseurs. Les hormones T₃ et T₄ sont ensuite sécrétées dans la circulation sanguine, tandis que les résidus simples MIT et DIT sont eux pris en charge par une iodotyrosine déhalogénase afin de recycler l'iode non utilisé. De manière générale, T₄ est majoritairement sécrétée (environ 80 %), mais elle est ensuite clivée par une 5'-désiodase pour produire T₃ qui est l'hormone la plus active. T₄ est donc une prohormone de T₃.

On peut également noter que, une fois secrétées dans le plasma, les hormones T_3 et T_4 se fixent de manière réversible à deux protéines, la TBG (*Thyroxine-Binding Globulin*) et la TBPA (*Thyroxine-Binding PreAlbumin*) ; ceci afin d'être acheminées vers les différents tissus de l'organisme. Une fois secrétées, les durées de vie approximatives de T_3 et T_4 sont respectivement de 24 h et une semaine.

iii) Régulation de l'activité thyroïdienne

De manière générale, l'activité thyroïdienne est stimulée par la TSH (*Thyroid-stimulating hormone*). Cette dernière est une glycoprotéine de 30 kDa produite par l'hypophyse et qui possède des récepteurs à TSH situés au niveau de la membrane basale des thyrocytes. Lors de l'augmentation de la concentration en TSH au niveau des récepteurs, une cascade de réactions enzymatiques se met en place *via* la production d'AMPC et active tous les niveaux de biosynthèse des hormones thyroïdiennes : expression d'ARN_m du NIS, organification de l'iode, activation du gène de la TPO et donc augmentation des concentrations plasmatiques de T_3 et T_4 (Figure 4).¹²



↑ négatifs (en rouge).
Un rétrocontrôle de ce
modeur plasmatique.

Il faut noter par ailleurs que, de façon rétroactive, T₃ et T₄ inhibent la sécrétion de TSH, ce qui permet la mise en place d'une régulation fine de la production hormonale¹³ (Figure 4). Les ions iodure possèdent également une fonction régulatrice, appelée « Effet Wolff-Chaikoff ». Au-delà d'une concentration plasmatique d'iodures supérieure à 30 µM, Wolff et Chaikoff ont observé une inhibition du processus d'organification.^{14,15} Dans une telle situation, la production importante d'iodolipides serait susceptible d'inhiber la production d'AMPC et de peroxyde d'hydrogène nécessaires au bon déroulement du processus.^{16,17} Cependant, on observe également un « échappement à l'effet Wolff-Chaikoff », retour à la normale lors d'une exposition prolongée à de hautes concentrations d'iodures plasmatiques. Celui-ci serait dû en partie à la moindre expression du NIS, impliquant ainsi une plus faible concentration intracellulaire d'iodures et un retour à la normale du processus d'organification.¹⁸ Enfin, la thyroglobuline (Tg) constitue elle aussi un puissant régulateur de l'activité thyroïdienne : *via* l'inhibition de différents facteurs de transcription, elle peut être responsable du blocage de l'expression des récepteurs à la TSH, du NIS et de la TPO, ainsi que de sa propre expression.¹⁹

b. Le symporteur iode-sodium (NIS)

i) Structure

Le premier isolement d'une portion d'ADN de rat permettant l'expression d'un phénotype « transport d'iodures » a été reportée en 1996 par l'équipe de Carrasco. Ce clone codait pour une protéine de 618 acides aminés et d'un poids de 65 kDa. Plusieurs expériences de mutagenèse dirigée et de localisation ont permis de déterminer les caractéristiques du NIS de rat (Figure 5) :

- 13 segments transmembranaires (TMS) ancrés dans la membrane basolatérale du thyrocyte
- Localisation cytosolique de l'extrémité C-terminale et extracellulaire de l'extrémité N-terminale
- 3 sites de glycosylation (Asn 225, Asn 485 et Asn 497)
- Présence dans l'extrémité C-terminale d'un motif *leucine zipper*, pouvant jouer un rôle dans l'oligomérisation du transporteur.⁶

L'identification du symporteur Na⁺/I⁻ humain (hNIS) a été publiée la même année par l'équipe de Jhiang.²⁰ D'une longueur de 643 acides aminés et d'un poids de 87 kDa, il présente 84 % d'identité et 92 % de similitude avec le rNIS.²¹ Si la structure secondaire du transporteur fait maintenant l'objet d'un consensus entre scientifiques, la structure tertiaire de ce transporteur est encore inconnue ; seul un modèle, construit par analogie avec la structure tertiaire du symporteur Na⁺/galactose de *Vibrio parahaemolyticus* - a été proposé par l'équipe de Carrasco.²²

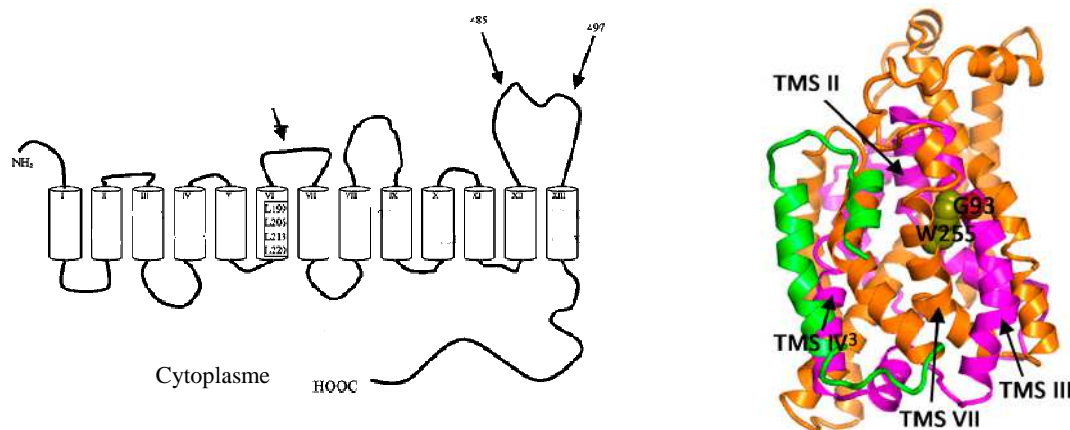


Figure 5 : Structures secondaire du NIS et structure tertiaire putative du hNIS. Sur la structure secondaire sont notamment indiqués les extrémités N- et C-terminales, les sites de glycosylation et le motif *leucine zipper* dans le domaine VI. Sur la structure tertiaire, les TMS II à VI sont en magenta et les TMS VII-XI en orange (d'après Carrasco & coll.^{22,23}).

ii) Caractérisation fonctionnelle

Appartenant à la famille des symporteurs Sodium/Soluté 5A (SLC5A5), il utilise le gradient électrochimique du sodium comme source d'énergie pour assurer le transport du soluté.²⁴ Plus précisément, ce symporteur assure le transport couplé de cations sodium dans le sens de leur gradient et d'anions iodeure contre leur gradient, le gradient des ions sodium étant maintenu par des pompes Na^+/K^+ ATPases.²⁵ En particulier, de nombreuses études ont été entreprises pour déterminer la stoechiométrie du sodium par rapport à l'iode et le mécanisme exact de symport. En 1988, l'équipe de Nakamura démontre que le nombre de Hill est supérieur à 1, et propose une stoechiométrie de deux ions sodium pour un iodeure.²⁶ Cette stoechiométrie est démontrée de manière formelle par l'équipe de Carrasco en 1997²⁷ : grâce à des mesures d'électrophysiologie sur ovocytes de *X. laevis*, elle démontre tout d'abord que le NIS se comporte comme un transporteur simple de sodium avec un nombre de Hill égal à 1 et un *turn-over* de 22 s^{-1} en l'absence de substrat anionique. Dans un second temps, en présence d'iodeures, elle suggère un changement conformationnel de la protéine induit par la fixation successive des deux ions sodium. Par la suite, l'iodeure se fixe à son site de liaison devenu accessible et un nouveau changement conformationnel permet la translocation simultanée des trois ions à travers la membrane (Figure 6). Le *turn-over* du NIS en mode symport est également estimé à 36 s^{-1} , tandis que les constantes de dissociation apparentes pour Na^+ et I^- sont respectivement évaluées à 28 mM et $33 \text{ }\mu\text{M}$.^{6,27}

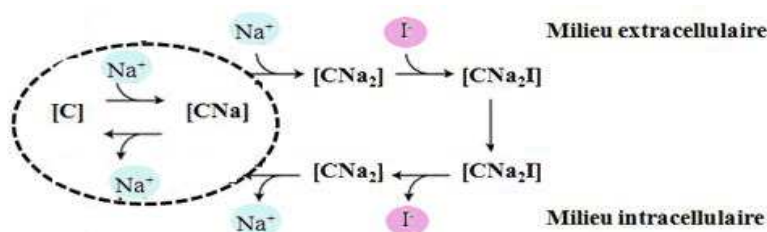


Figure 6 : Modèle de symport iode / sodium par le NIS. Le mode de fonctionnement uniport est indiqué en pointillés (d'après Eskandari & al.²⁷)

c. Physiopathologie de la thyroïde

La thyroïde et les processus qui s'y déroulent peuvent être le siège de nombreux dysfonctionnements. Certains sont étroitement associés à des dysfonctionnements du transport d'iodures. Nous décrivons succinctement l'hypothyroïdie et l'hyperthyroïdie, qui recouvrent chacune des étiologies variées, puis l'exposition aux radioisotopes de l'iode et enfin les cancers de la thyroïde. Les traitements actuellement existants ainsi que les nécessités de nouvelles approches thérapeutiques sont également détaillés dans chaque cas.

i) Hypothyroïdie

Il s'agit d'une insuffisance en hormones thyroïdiennes, d'une prévalence estimée à 7,5 % chez les femmes et 2,5 % chez les hommes. L'étiologie recouvre trois cas distincts : l'hypothyroïdisme congénital, les carences en iode nutritionnel et la thyroïdite de Hashimoto, une maladie auto-immune. L'hypothyroïdisme congénital est développé de manière sporadique et recouvre un ensemble de mutations touchant des gènes impliqués dans la synthèse des hormones thyroïdiennes, mais aussi dans le fonctionnement général de la thyroïde ou encore dans le transport des hormones fonctionnelles.²⁸ Caractérisée par la production d'anticorps anti-TPO²⁹, la thyroïdite de Hashimoto aboutit à l'inhibition progressive de l'activité thyroïdienne. Des anticorps anti-NIS sont également détectés. A l'heure actuelle, en fonction de l'étiologie, les seuls traitements existants consistent en la prise continue d'iode (KI, KIO₃) ou d'hormones de synthèse ; les formulations existantes de ces dernières sont la L-T₃ (Cynomel®), la L-T₄ (Levothyrox®) et une combinaison des deux hormones (Euthyral®).³⁰

ii) Hyperthyroïdie

A l'inverse de l'hypothyroïdie, l'hyperthyroïdie est une thyrotoxicose caractérisée par un excès d'hormones thyroïdiennes circulantes. L'étiologie recouvre ici aussi trois cas distincts : la surexposition aux dérivés iodés de synthèse, l'adénome toxique et la maladie de Basedow-Graves. Deux molécules riches en iode sont principalement responsables de surexposition aux iodures. L'amiodarone (Cordarone®) est un antiarythmique de classe III, stocké dans les tissus adipeux et au métabolisme lent – pouvant libérer des iodures jusqu'à plusieurs mois après arrêt du traitement. Le diatrizoate et agents de contraste apparentés, utilisés pour l'imagerie du tractus gastrointestinal, sont susceptibles de provoquer des effets similaires (Figure 7).³¹

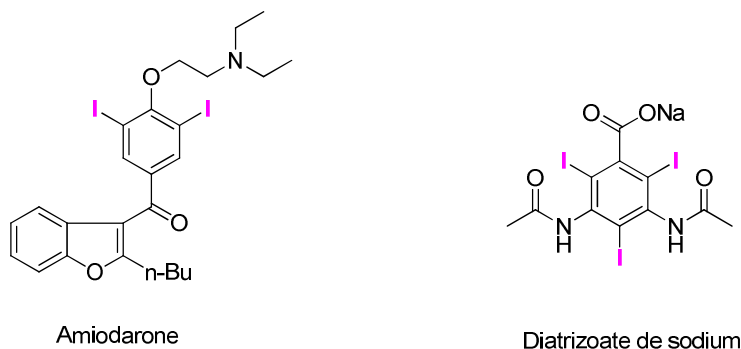


Figure 7 : Structures chimiques de l'amiodarone (Cordarone®) et du diatrizoate.

L'adénome toxique est une tumeur thyroïdienne capable de produire de façon anarchique des hormones T_3 et T_4 , et dont l'apparition est liée à la mutation d'un récepteur à la TSH. Quant à la maladie de Basedow-Graves, il s'agit sans doute de la pathologie thyroïdienne la plus connue. Maladie auto-immune causée par la production d'anticorps anti-TSH, elle conduit à l'activation permanente de ces récepteurs.²⁹ Ainsi, la synthèse thyroïdienne est stimulée en permanence et le transport intracellulaire d'iodures augmente fortement, ce qui permet de diagnostiquer la pathologie par radioimagerie à l'iode 123 ou à l'iode 131. Dans tous les cas, les traitements actuels vont de l'administration d'anti-thyroïdiens synthétiques (ATS) à la destruction par l'iode 131 ou l'ablation chirurgicale. Les ATS appartiennent à deux familles :

- les thiouraciles (benzylthiouracile/Basdene® et propylthiouracile/Proracyl®) inhibent de façon principale la TPO, et de façon périphérique la 5'-désiodase qui convertit T_4 en T_3 .
- les dérivés d'imidazole (méthimazole/Thyrozol® et carbimazole/Néo-mercazole®), quant à eux, inhibent seulement la TPO.

Cependant, dans les situations les plus radicales, l'endommagement des processus de synthèse hormonale peut conduire au déclenchement d'une hypothyroïdie et contraindre ainsi à la prise continue d'hormones de synthèse (40 % des hypothyroïdies trouvent leur origine dans le traitement préalable d'une hyperthyroïdie).³² Par ailleurs, le risque de rechute reste important (40 %) et on estime à 15 % la proportion de patients atteints de la forme chronique de la maladie. Enfin, les ATS existants agissent tous sur la même cible thérapeutique – la TPO. On devine donc ici l'importance thérapeutique d'inhibiteurs du NIS. Ces derniers – en association ou non avec d'autres traitements – pourraient permettre un blocage de l'influx d'iodures en fonction des besoins physiologiques ; ils ouvriraient ainsi la voie à une nouvelle classe d'ATS agissant non seulement sur une cible thérapeutique différente, mais de façon plus remarquable sur l'étape limitante dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes.

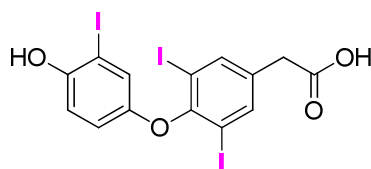
iii) Exposition aux isotopes radioactifs de l'iode

Comme l'a rappelé le dramatique accident de la centrale nucléaire de Fukushima (Japon) en mars 2011, l'exposition potentielle des populations aux radioisotopes de l'iode représente un enjeu

de santé publique majeur. Le puissant mécanisme de séquestration de l'iode thyroïdien conduit dans le cas de retombées nucléaires à l'accumulation prolongée de radioisotopes toxiques de l'iode (^{129}I , ^{131}I) dans la thyroïde. L'exposition à ces radioéléments conduit à un risque accru de développer un cancer de la thyroïde.^{33,34} Dans les 25 années qui ont suivi l'accident de la centrale de Tchernobyl, on estime que 4 000 cas de cancers thyroïdiens ont été développés en Russie, en Ukraine et en Biélorussie par des adolescents de moins de 15 ans.³⁵ La contre-mesure actuelle consiste en l'absorption de comprimés d'iodure de potassium avant exposition. A court terme, il s'agit de saturer la thyroïde en iode non-radioactif et d'induire l'effet Wolff-Chaikoff pour éviter l'organification d'iodures radioactifs. Cependant, le risque accru d'effets secondaires chez certaines populations (femmes enceintes, nouveaux-nés, personnes âgées de plus de 40 ans) conduit l'OMS à envisager le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour mieux protéger personnels de l'industrie nucléaire et populations susceptibles d'être exposées.³⁶

iv) Cancers de la thyroïde

Différenciées en quatre types histologiques (papillaire, médullaire, anaplasique et folliculaire), les tumeurs cancéreuses de la thyroïde sont habituellement traitées par une ablation chirurgicale de la thyroïde couplée à une radiothérapie à l'iode 131. Cette méthode efficace (90 % de survie à 10 ans chez l'homme adulte) ne doit pas faire oublier un taux de rechute particulièrement élevé (30 %) et un pronostic de survie nettement moins bon dans les cas où le déficit de transport d'iode est plus marqué (cancers réfractaires à l'iode 131, cancers anaplasiques). Dans ces derniers cas, le symporteur est surexprimé mais n'est pas fonctionnel, car non localisé à la membrane.⁶ Quelques études ont permis de réinduire une capture d'iode par ces cellules cancéreuses et cependant, la réduction du volume tumoral après radiothérapie à l'iode 131 n'est pas systématique. Des progrès importants restent donc à accomplir pour améliorer le traitement des cancers de la thyroïde, et particulièrement dans l'étude des mécanismes de régulation et d'expression du NIS. Mentionnons enfin que, en cas de résistance aux hormones thyroïdiennes ou pour certains cancers différenciés TSH-dépendants, un traitement au tiratricol (Téatrois®) peut être envisagé.³⁷ Ce dernier est un métabolite mineur de T_3 (Figure 8), qui freine la sécrétion de TSH et donc l'activité thyroïdienne.



Tiratricol

Figure 8 : Structure chimique du tiratricol (Téatrois®)

v) Cancers extra-thyroïdiens

Il est par ailleurs connu que le NIS est exprimé de manière endogène par les tumeurs cancéreuses dans 80 % des carcinomes mammaires. Cette expression est par ailleurs totalement absente dans les tissus sains, hors période de lactation.⁶ Cependant, la radiothérapie à l'iode 131 ne peut être appliquée de manière efficace car les niveaux d'expression et la localisation membranaire ne sont pas suffisants. Bien que l'efficacité du traitement ait été améliorée par combinaison de plusieurs molécules (dont l'acide rétinoïque), une marge de progression importante subsiste en termes de connaissance des mécanismes de régulation post-traductionnels du NIS, afin de pouvoir réinduire un NIS fonctionnel – et ainsi de pouvoir appliquer la radiothérapie à l'iode 131 à ces tumeurs cancéreuses.³⁸ Par ailleurs, il a été très tôt envisagé d'appliquer la radiothérapie à l'iode 131 au traitement de divers autres cancers extra-thyroïdiens, même dans des tissus n'exprimant pas le NIS de façon endogène. En effet, après induction de l'expression du NIS par transfert génique, la quantité de NIS exprimé peut aisément être mesurée par scintigraphie (en raison de l'activité de transport des ions TcO_4^- par le symporteur). Par la suite, le rayonnement de l'iode 131 peut permettre de détruire dans une zone localisée les cellules tumorales géographiquement proches des cellules transfectées.³⁹ Cependant, il a également été nécessaire d'utiliser des promoteurs forts et spécifiques des tissus cibles pour augmenter des niveaux d'expression qui demeuraient insuffisants. Par ailleurs, *via* l'utilisation de rétrovirus permettant une vectorisation *in vivo* de l'ADN_c exprimant le NIS directement dans certaines tumeurs, plusieurs études ont démontré que l'on pouvait obtenir, en combinant ces techniques, des effets thérapeutiques et sélectifs très intéressants sur le cancer de la prostate⁴⁰ et du foie.⁴¹ Ici encore, ces résultats encourageants pourraient être potentialisés par une meilleure connaissance des mécanismes d'accumulation d'iode ainsi que d'expression, de localisation et de régulation du NIS.³⁹

2. Modulateurs du transport de l'iode

Outre les boucles de régulation qui ont été présentées en partie I.1.a.iii) et les effets de certains polluants environnementaux^{42,43} qui ne seront pas développés ici, le transport de l'iode peut être modulé par des petites molécules organiques ou inorganiques, à activité inhibitrice ou activatrice. Ces molécules représentent à la fois des outils pharmacologiques essentiels pour mieux caractériser les mécanismes de transport de l'iode et des agents thérapeutiques potentiels pour traiter certaines pathologies thyroïdiennes.

a. Activateurs du transport de l'iode

Lecat-Guillet & *al.* ont récemment décrit une famille d'imidazo-[2,1-*b*]-thiazoles comme activateurs du transport de l'iode. Les composés **1-5** permettent une séquestration d'iodures dans

des thyrocytes de rat augmentée d'un facteur 2 à 4 (Figure 9). Le mécanisme d'action précis de ces composés n'a pas encore été élucidé mais ils agiraient *a priori* comme des inhibiteurs de l'efflux d'iodures.^{44,45}

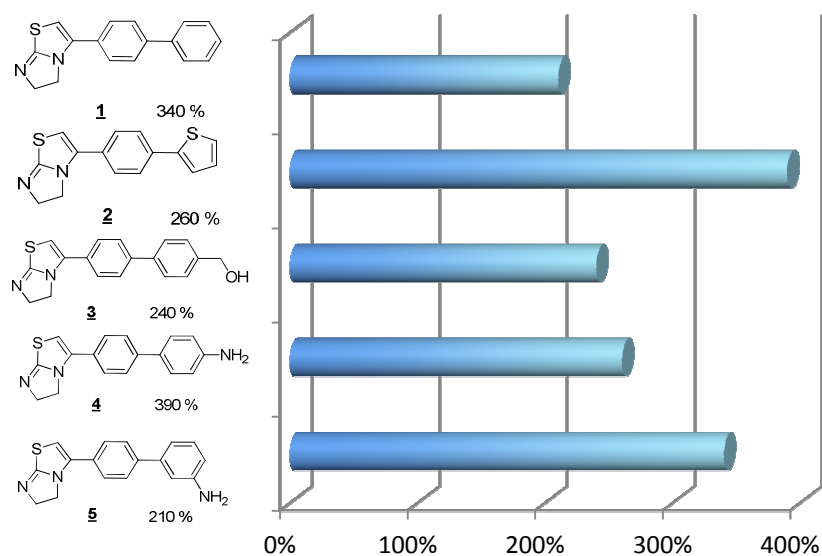


Figure 9 : Meilleurs inhibiteurs d'efflux identifiés par Lecat-Guillet & al.
La concentration intracellulaire d'iodures est indiquée pour chaque composé, en prenant pour référence 100 % (témoin négatif).

b. Inhibiteurs du transport de l'iode

Les inhibiteurs du transport de l'iode peuvent être classés en deux catégories : les inhibiteurs inorganiques sont des ions qui se fixent de façon compétitive sur le site de fixation de l'iodure, et les inhibiteurs organiques qui modulent cette activité de différentes manières.

i) Inhibiteurs inorganiques

L'activité de transport du NIS ne se limite pas aux ions iodures, et plusieurs anions sont ainsi des inhibiteurs compétitifs du NIS. En particulier, l'ion perchlorate ClO_4^- est celui pour lequel le NIS possède la plus grande affinité. Historiquement utilisé pour le traitement de thyrotoxicoses aux Etats-Unis dans les années 1960, il a toutefois été au centre de controverses car il n'induisait aucun courant électrique comme certains autres anions (dont I^-) ; il n'apparaissait donc pas comme substrat du NIS.⁴⁶ Il a été finalement démontré que le transport du perchlorate et des ions apparentés (ReO_4^- , TcO_4^-) n'était pas électrogène car se produisant avec une stoechiométrie 1 : 1 (et non pas 2 : 1 comme pour l'iodure).⁴⁷ L'équipe de Carrasco a également synthétisé des mutants du NIS dans lesquels cette stoechiométrie était rétablie à 2 : 1 ; elle a ainsi démontré que l'interférence de ces anions avec un des deux sites de fixation du sodium était responsable de cette stoechiométrie particulière.²² Enfin, il faut mentionner que, tout comme I^- , de nombreux anions sont substrats du NIS. Des études révèlent l'importance de la monovalence et établissent des critères de sélectivité du

transporteur envers ces anions, particulièrement la taille et la géométrie.^{46,48} Quelques exemples sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Quelques anions transportés par le NIS et les IC₅₀ dans les cellules FRTL-5⁴⁹

Anion	Rayon de Van der Waals (pm)	Géométrie	IC ₅₀ (μM)
I ⁻	220	Sphérique	/
ClO ₄ ⁻	240	Tétraédrique	0,62
Br ⁻	196	Sphérique	26,3
SCN ⁻	/	Linéaire	33,6
ClO ₃ ⁻	166	Pyramidale	1,37
ReO ₄ ⁻	188	Tétraédrique	1,22

ii) Inhibiteurs organiques

La dysidénine (Figure 10), une toxine de l'éponge *Dysidea Herbacea* est un tripeptide hexachloré qui inhibe le transport d'iode de façon « pseudo-compétitive » ($K_i = 5 \mu\text{M}$).⁵⁰ Van Sande & *al.* montrent en particulier au moyen d'une étude structure-activité que la configuration des centres asymétriques ainsi qu'au moins un motif trichloré sont indispensables à la reconnaissance de la cible. Cependant, sa non spécificité pour le NIS ainsi que les difficultés synthétiques ont conduit à l'abandon progressif de cette molécule. Le Dr. Lecat-Guillet a montré par ailleurs dans sa thèse que la dysidénine est inactive sur cellules hNIS-HEK293⁵¹ ; cela laisse supposer que la cible protéique serait une protéine spécifique des cellules FRTL-5.

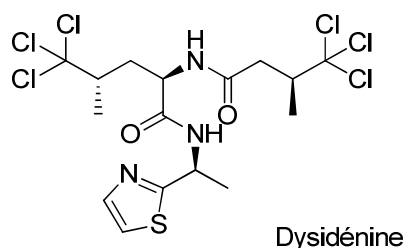


Figure 10 : Structure chimique de la dysidénine

Les harmanes sont une famille d'alcaloïdes, particulièrement présents dans la plante médicinale *Peganum harmala* (harmal). Possédant comme structure commune un noyau tricyclique de type carboline, ce sont des antagonistes sérotoninergiques. Parmi eux, seuls l'harmane et le dérivé synthétique TRP-P-2 possèdent une activité inhibitrice du transport d'iodures améliorée par rapport à l'harmaline prise comme référence (Figure 11). Les expériences menées sur cellules FRTL-5 et sur vésicules membranaires par l'équipe de Carrasco montrent que ces inhibiteurs interagissent avec le site de fixation du sodium du NIS. L'inhibition est en effet compétitive vis-à-vis du sodium et réversible.^{52,53} De plus, l'harmaline est connue pour inhiber de la même façon plusieurs symporteurs sodium-soluté.⁵⁴ TRP-P-2 est dix fois plus actif que l'harmaline avec des K_i respectifs de 250 μM et 4 mM. Le K_i de l'harmane n'a quant à lui pas été déterminé précisément. Par ailleurs, la non-spécificité

de ces inhibiteurs vis-à-vis du NIS et leur toxicité (TRP-P-2 est un mutagène⁵⁵) ont conduit à l'abandon progressif des recherches sur cette famille.

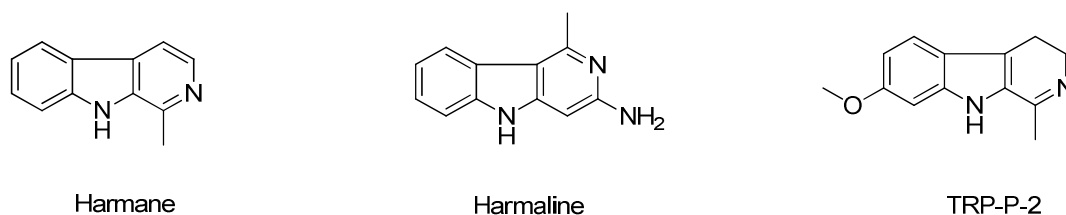
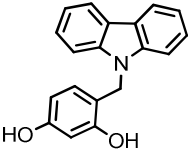
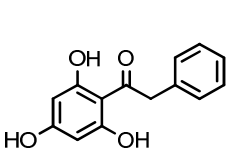
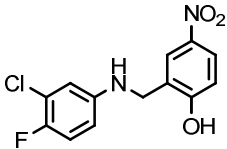
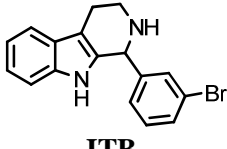
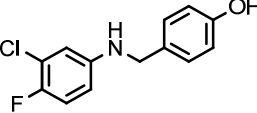
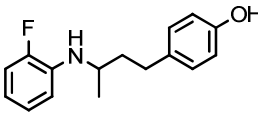
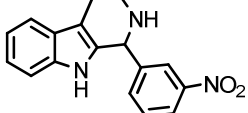
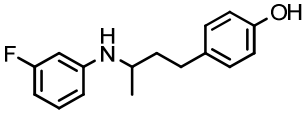
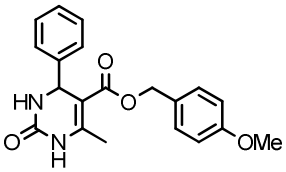
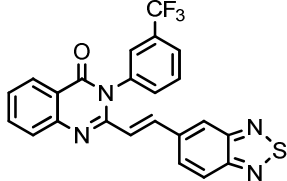


Figure 11 : Structures chimiques de l'harmaline, de l'harmaline et du TRP-P-2

Dans un travail jusque là inédit pour rechercher des inhibiteurs organiques du transport de l'iode, un criblage à haut-débit sur une sous-chimiothèque DIVERSet de CHEMBRIDGE (16 720 composés) a été réalisé par le Dr. Lecat-Guillet et a conduit à l'identification de 10 inhibiteurs puissants ($0,04 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} < 2 \mu\text{M}$) du transport de l'iode (*Iodide Transport Blockers*), **ITB1** à **ITB10**.^{51,56} Le Dr. Lecat-Guillet décrit par ailleurs dans sa thèse une première série de tests visant à s'assurer de la spécificité des inhibiteurs. Comme le montre le Tableau 2, les résultats des expériences d'électrophysiologie sur ovocytes de *X. laevis* ont permis de les classer en « inhibiteurs directs » et « inhibiteurs indirects » en fonction de leur rapidité à bloquer l'influx d'iodures. Les auteurs supposent ainsi que les premiers pourraient inhiber le NIS lui-même, de proches partenaires ou des interactions protéiques nécessaires à l'activité, tandis que les seconds agiraient sur des processus plus en amont (maturation, régulations post-traductionnelles, adressage...).

Tableau 2 : Inhibiteurs du transport de l'iode découverts par Lecat-Guillet & al. Les valeurs mesurées des IC_{50} sont indiquées pour chaque composé.

Inhibition immédiate			Inhibition retardée
 ITB₃ 0,3 μM	 ITB₄ 1 μM	 ITB₅ 0,04 μM	 ITB₁ 0,4 μM
 ITB₆ 1,3 μM	 ITB₇ 0,6 μM		 ITB₂ 0,3 μM
 ITB₈ 0,3 μM	 ITB₉ 0,4 μM		 ITB₁₀ 2 μM

Ces analogues peuvent être d'ores et déjà regroupés en plusieurs familles : la carboline **ITB₃**, le triphénol **ITB₄** et les anilines **ITB₇** et **ITB₈** n'ont pas pour l'instant fait l'objet d'études plus approfondies. Les N-benzylanilines (**ITB₅** et **ITB₆**) ont fait l'objet d'une étude structure-activité par le Dr. Waltz⁵⁷ : à cette occasion, 13 analogues de structure et d'activité similaire (IC₅₀ compris entre 0,02 μM et 0,09 μM) ont été découverts. Nous aurons l'occasion de revenir ultérieurement sur la suite de ces travaux. Les tétrahydrocarboline **ITB₁** et **ITB₂** ont fait l'objet d'un certain nombre de travaux non publiés au laboratoire et le Chapitre IV de ce manuscrit leur est consacré. La dihydropyrimidinone **ITB₉** sera quant à elle étudiée extensivement dans le chapitre III de ce manuscrit. Enfin, le composé **ITB₁₀** n'a pas été étudié à l'heure actuelle.

Par ailleurs, dans l'optique de découvrir des inhibiteurs spécifiques du site de fixation de l'iode sur le NIS, des travaux ont été réalisés par le Dr. Lecat-Guillet en s'inspirant du caractère inhibiteur compétitif de l'anion tétrafluoroborate BF₄⁻ vis-à-vis du site de fixation de l'iode sur le NIS.⁴⁸ Le criblage de composés de type organotrifluoroborate contre l'incorporation d'iodures sur cellules hNIS-HEK293 a conduit à la découverte de trois inhibiteurs puissants (composés **6**, **7** et **8**, Figure 12) de cette activité, d'IC₅₀ respectifs 0,2 μM, 2 μM et 28 μM.⁵⁸ Ces composés n'ont pour l'instant pas fait l'objet d'études plus approfondies mais leur intérêt reste élevé, étant donné leur spécificité potentielle vis-à-vis du site de fixation de l'iode sur le NIS.

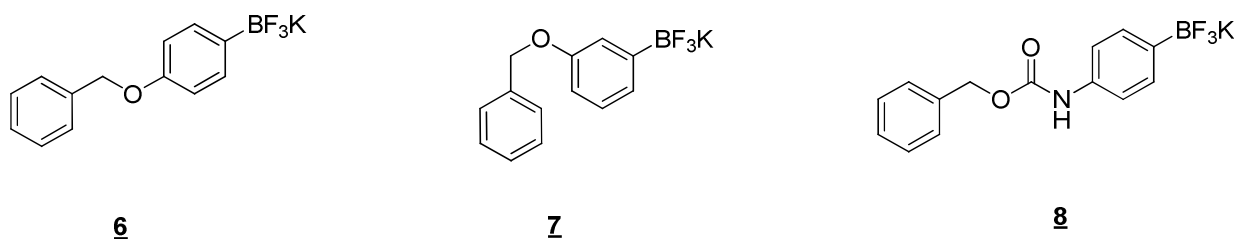


Figure 12: Structure des meilleurs inhibiteurs de type organotrifluoroborate découverts par Lecat-Guillet & al.

3. Dihydropyrimidinones - synthèse et activités biologiques

La plus grande partie de ce manuscrit traite du composé **ITB₉**, appartenant à la famille des dihydropyrimidinones (DHPM). Ces dernières sont aisément accessibles synthétiquement en utilisant la réaction multicomposants de Biginelli. Dans cette partie, nous aborderons donc dans un premier temps les aspects mécanistiques et synthétiques de la réaction de Biginelli, avant de présenter la diversité d'applications biologiques que connaît cette famille de composés.

a. Synthèse - La réaction de Biginelli

Découverte par le chimiste italien Pietro Biginelli⁵⁹ en 1893 à l'Université de Florence, elle impliquait la condensation acido-catalysée d'une urée, d'un aldéhyde et d'un β-cétoester (Figure 13).⁶⁰ Tombée dans l'oubli pendant presque un siècle, elle a fait l'objet d'un regain d'intérêt dans les années 1980 et a été considérablement améliorée, tant au niveau des synthons de départ que des conditions de réaction.

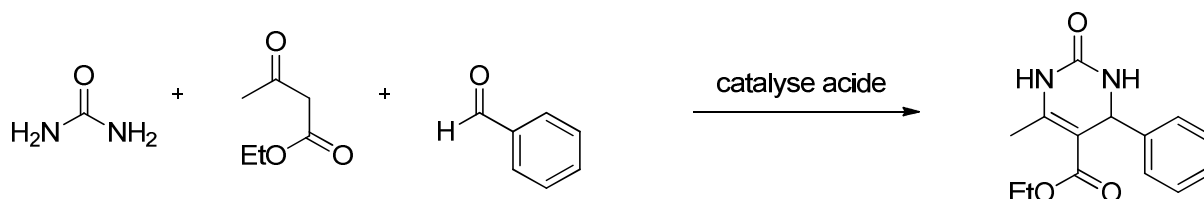


Figure 13 : Réaction multicomposants de Biginelli.

En conditions acides, la condensation d'une urée, d'un β-cétoester et d'un aldéhyde forme une dihydropyrimidinone.

i) Mécanisme

Depuis les travaux de Biginelli, divers mécanismes expliquant la formation des adduits ternaires de type DHPM ont été proposés. En effet, une réaction bimoléculaire entre deux des trois réactifs, suivie de l'addition du troisième, permet en théorie d'obtenir le produit attendu dans tous les cas (Figure 14).

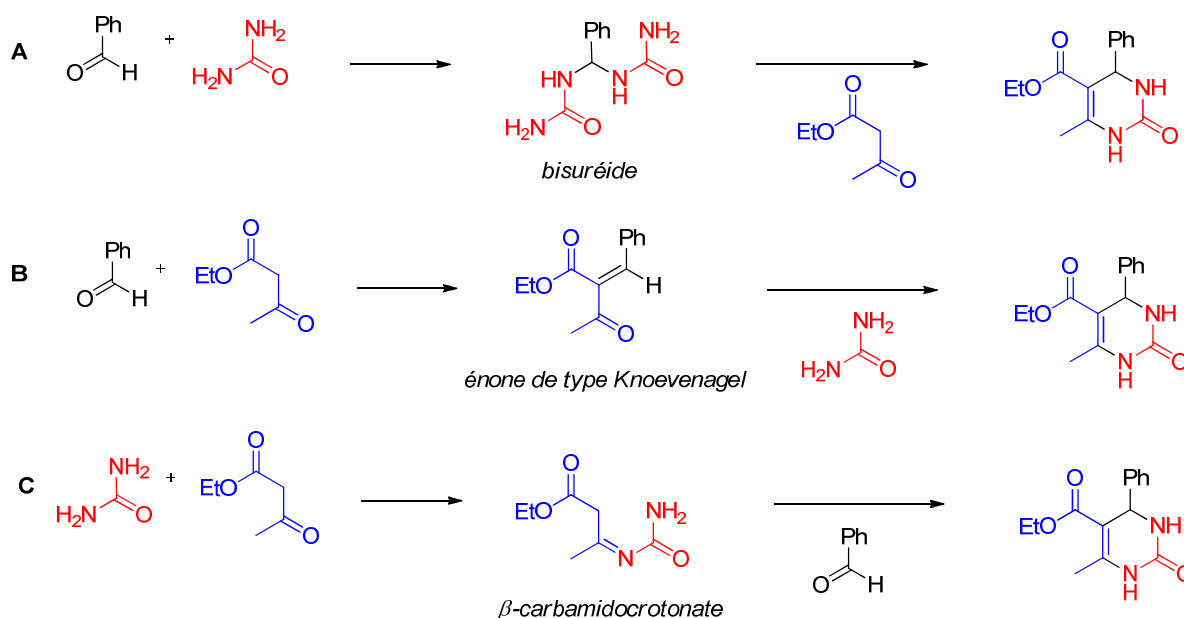


Figure 14 : Voies de synthèse théoriques conduisant à l'obtention de produits de Biginelli. La réaction modèle pour déterminer le mécanisme utilise l'urée, le benzaldéhyde et l'acétoacétate d'éthyle comme réactifs.

Depuis la publication de Biginelli, les principales avancées dans l'élucidation du mécanisme ont été les suivantes :

- En 1933, Folkers et Johnson forment séparément les trois adduits bimoléculaires, puis additionnent le dernier réactif en présence de différentes concentrations d'acide sulfurique.⁶¹ La voie B est éliminée car elle ne conduit pas à la formation du produit attendu. En revanche, les voies A et C contribuent significativement à la réaction, même si l'intermédiaire β -carbamidocrotonate de la voie C est hydrolysé aux fortes concentrations d'acide.
- En 1973, Sweet et Fissekis reprennent des expériences similaires en utilisant l'acide chlorhydrique comme catalyseur et déclarent invalide le modèle de Folkers et Johnson ; ils proposent comme première étape une condensation d'aldol pour former un ion carbénium comme intermédiaire-clé (Figure 15).⁶² Ce dernier peut alors être piégé par l'urée pour former directement le produit attendu ou perdre un proton pour donner le produit de condensation de type Knoevenagel. L'énone ainsi obtenue ne réagissait pas avec l'urée dans les conditions de Folkers et Johnson. Dans les conditions de Sweet et Fissekis, la réaction a lieu mais s'avère difficile (36 % de produit isolé après 2 semaines de réaction à reflux !).

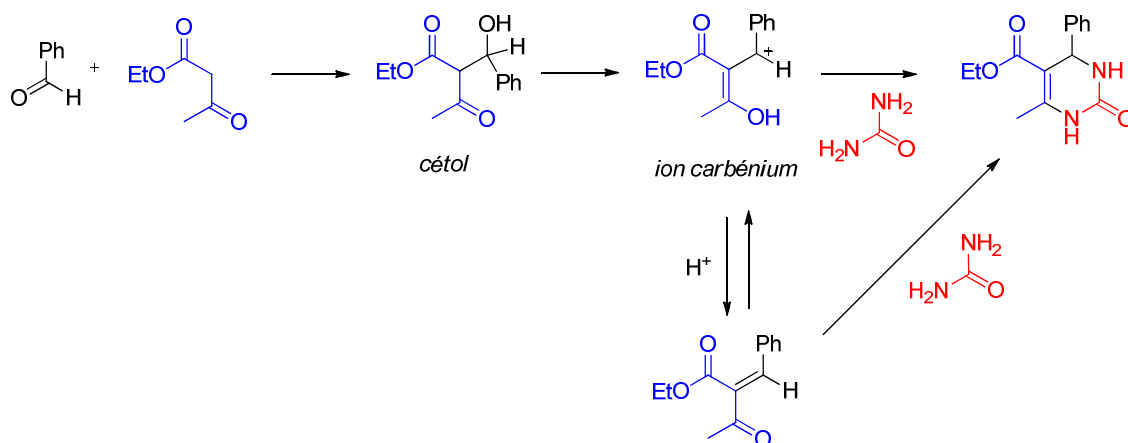


Figure 15 : Mécanisme proposé par Sweet & Fissekis

La voie C est par ailleurs éliminée car elle ne permet pas d'expliquer la régiosélectivité observée avec les urées monofonctionnalisées. L'utilisation de la N-méthylurée ne conduit en effet qu'à l'obtention d'un régioisomère en N₁ qui n'est pas compatible avec la formation du β -carbamidocrotonate majoritaire (Figure 16).

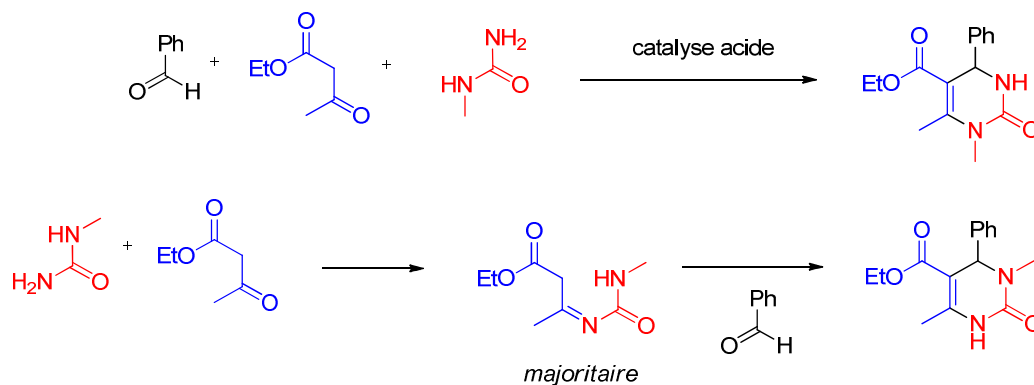


Figure 16 : Elimination de la voie C grâce à la régiosélectivité de la réaction de Biginelli.

En haut est figuré l'isomère N₁ obtenu dans les conditions expérimentales classiques ;

En bas l'isomère N₃ qui serait obtenu par la voie C.

- Enfin, en 1997, Kappe démontre grâce à des expériences de spectroscopie RMN que la formation d'un ion acyliminium à partir de l'urée et de l'aldéhyde constitue la première étape de la réaction. Ce dernier est ensuite intercepté par le cétoester pour former la DHPM⁶³. Le mécanisme de Sweet et Fissekis est à son tour invalidé par les suivis RMN ¹H et par l'utilisation de thiourée : dans l'hypothèse où l'intermédiaire de type Knoevenagel est formé, la condensation subséquente avec la thiourée forme uniquement une isothiazine et non la dihydropyrimidinethione usuellement observée (Figure 17).

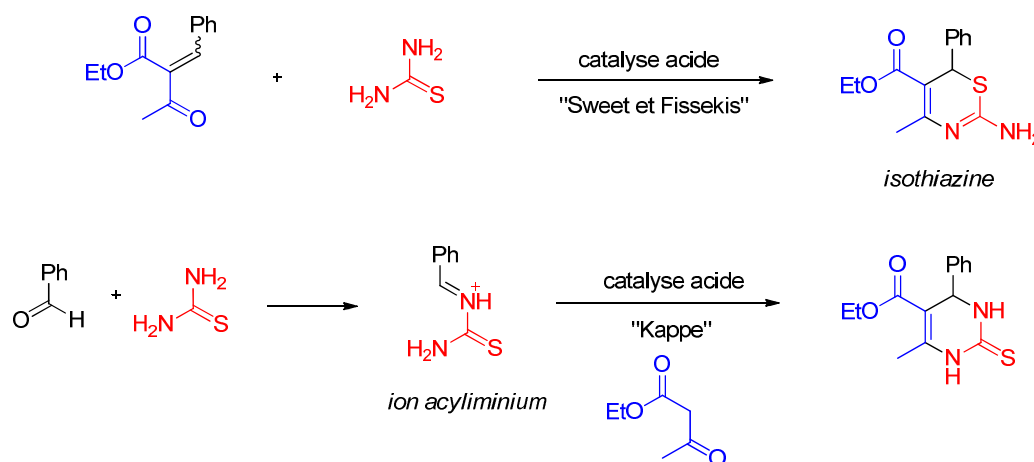


Figure 17 : Invalidation du modèle de Sweet et Fissekis et modèle de Kappe. En haut, formation d'isothiazine à partir de la thiourée dans les conditions de Sweet et Fissekis ; en bas, mécanisme proposé par Kappe.

Le modèle de Folkers et Johnson est également invalidé par la formation du bisuréide proposé comme intermédiaire-clé n'est pas observée en présence d'acétoacétate. Le mécanisme de Kappe a ensuite été confirmé par le piégeage d'intermédiaires réactionnels *a posteriori* en jouant sur la nature des synthons.^{64,65} Cependant, l'extension récente des conditions opératoires existantes pour la réaction de Biginelli, et notamment l'emploi d'acide de Lewis comme catalyseurs, ont conduit certains auteurs à restreindre le mécanisme de Kappe aux seuls acides de Brønsted. La voie C est notamment proposée pour les acides de Lewis, grâce à la stabilisation du β -carbamidocrotonate intermédiaire

par le cation métallique⁶⁶. Notons toutefois que cette proposition semble en contradiction avec la régiosélectivité usuellement observée en N₁ (Figure 16). D'autres auteurs suggèrent au contraire que les acides de Lewis stabilisent particulièrement l'ion acyliminium et/ou le composé dicarboxylé, favorisant ainsi le mécanisme proposé par Kappe.⁶⁷

ii) Conditions opératoires

Au cours des deux dernières décennies, le regain d'intérêt pour la réaction de Biginelli a conduit à un net élargissement des conditions réactionnelles par rapport aux travaux antérieurs. Le solvant et l'espèce catalytique ont été largement explorés et une grande diversité existe aujourd'hui. Le solvant utilisé était traditionnellement le méthanol ou l'éthanol, qui permettaient de précipiter directement le produit en fin de réaction, mais limitaient la température de réaction. Depuis, des réactions de Biginelli ont été reportées dans le THF^{68,69}, l'acétonitrile^{70,71}, l'acide acétique^{72,73}, l'eau⁷⁴, des liquides ioniques⁷⁵ ou même en l'absence de solvant.⁷⁶ De la même façon, le catalyseur utilisé était traditionnellement un acide de Brønsted (acide sulfurique ou chlorhydrique). Si, dans certains cas, la présence de catalyseur ne s'avère pas indispensable⁷⁷, un nombre impressionnant de catalyseurs a toutefois été recensé.^{78,79} L'utilisation d'acides de Lewis – comme FeCl₃⁸⁰, Yb(OTf)₃⁸¹, Zn(OTf)₂⁸², LiBr⁷¹ ou Mn(OAc)₃⁸³ par exemple – reste cependant prépondérante de par les nombreux avantages qu'ils présentent (rendements élevés, temps de réaction courts, stabilité, facilité à manipuler). Remarquons par ailleurs que l'utilisation du micro-ondes a montré de nombreux succès, particulièrement en chimie combinatoire.^{84,85,86} Enfin, dans les années 2000, des réactions de Biginelli énantiosélectives ont été développées : en effet, les dihydropyrimidinones possèdent un centre stéréogène dont la configuration n'est pas contrôlée en utilisant des conditions opératoires « classiques ». Or, l'activité biologique est souvent portée par un seul des deux énantiomères. De nombreux exemples récents illustrent ainsi la synthèse énantiosélective de DHPM avec des excès énantiomériques supérieurs à 80 % grâce à l'utilisation de catalyseurs chiraux : complexes thiourée/amine primaire^{87,88}, acides phosphoriques de type BINOL⁸⁹ ou SPINOL⁹⁰, complexes de cations métalliques (ytterbium (III)⁹¹, niobium (V)⁹²)...

iii) Réactifs

Outre les conditions opératoires, les réactifs de départ de cette réaction multicomposants ont également été amplement diversifiés (Figure 18) :

- l'aldéhyde reste le réactif par lequel peut être introduit la plus grande diversité ; ont été utilisés notamment divers aldéhydes aliphatiques, aromatiques, hétérocycliques, ainsi que des sucres.⁹³

- le β -cétoster a été étendu à de nombreux composés carbonylés comportant un hydrogène acide en α . Mentionnons notamment l'utilisation de dicétones, de β -cétamides, d' α -nitrocétones ou de β -cétophosphonates
- l'urée est généralement le réactif le moins variable. Récemment, divers blocs ont été introduits : thiourées, isourées, guanidines... Toutefois, les conditions réactionnelles doivent être ajustées : de manière générale, les temps de réactions et les températures plus élevées sont requises pour les thiourées et les urées substituées. Quant aux guanidines, elles requièrent des conditions faiblement basiques (HCO_3^-) et dépendent fortement de la nature des deux autres synthons.^{94,95} Pour pallier ce problème, les analogues comportant un motif guanidine peuvent aussi être synthétisés de manière masquée et déprotégés dans une seconde étape.^{96,97,98}

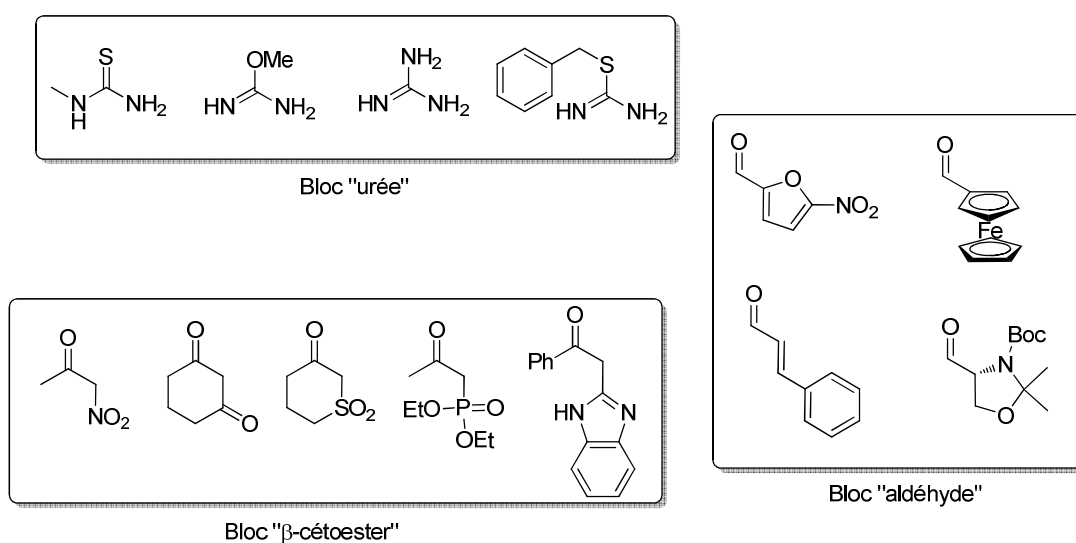


Figure 18 : Réactifs originaux pour la réaction de Biginelli (d'après Kappe⁷⁹)

Par ailleurs, peu de modifications ont été apportées dans la voie de synthèse des DHPM. La réaction de Biginelli est en effet puissante du point de vue synthétique et permet de combiner de nombreux motifs variés. Cependant, la seule amélioration notable est sans doute la modification d'Atwal^{97,99} qui condense une énone de type Knoevenagel avec une isourée ; cette dernière est ensuite déprotégée pour fournir la DHPM (Figure 19). Outre les rendements élevés qu'elle fournit et les conditions « douces » dans lesquelles elle est effectuée (base faible), cette variante permet également de fonctionnaliser régiosélectivement l'atome d'azote N_3 avant déprotection de l'isourée. Elle apporte ainsi une voie d'accès aisée à des DHPM d'intérêt pharmacologique, ce que ne permettait pas la réaction de Biginelli, régiosélective en N_1 :

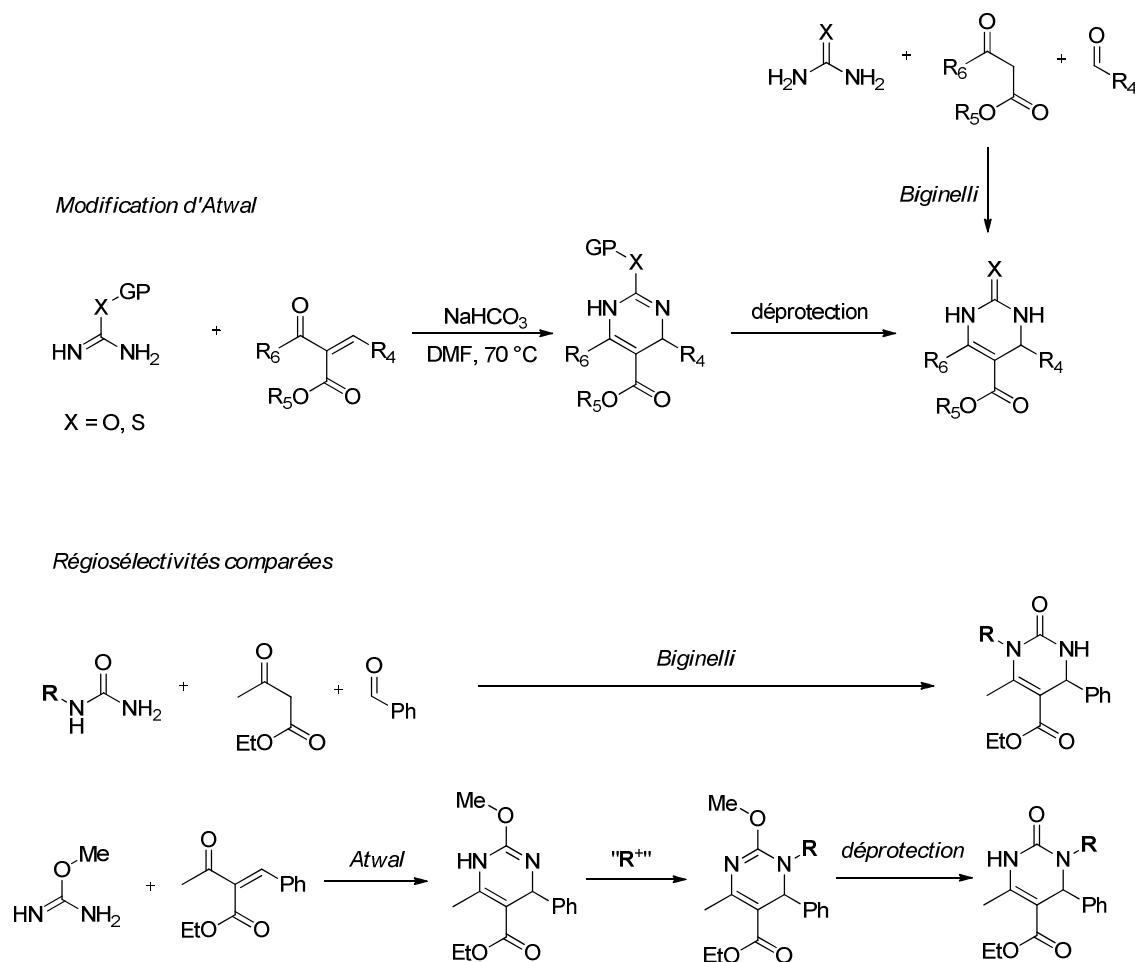


Figure 19 : Modification d'Atwal et fonctionnalisation régiosélective de l'atome N₃

b. Applications biologiques des dihydropyrimidinones

La grande diversité des synthons pour lesquels la réaction de Biginelli a pu être étendue permet d'accéder à une importante variété de substituants autour du squelette principal. De nombreuses séries de DHPM figurent maintenant dans les librairies de composés ; en effet, de nombreuses activités biologiques ont été décrites pour cette famille. On remarque de manière récurrente des articles reportant une activité inhibitrice de canaux calciques^{100,101}, le squelette étant proche des dihydropyridines connues pour cette activité (nifedipine, benidipine, nicardipine...). Cependant, beaucoup d'autres potentialités thérapeutiques sont décrites sur cette large famille (inhibiteurs de topoisomérase I¹⁰², anti-tuberculeux¹⁰³, anti-paludéens¹⁰⁴, activité cytotoxique¹⁰⁵, antioxydant¹⁰⁶...). Une revue détaillée de Kappe décrit les activités les plus importantes¹⁰⁷, dont quelques exemples représentatifs sont exposés en Figure 20.

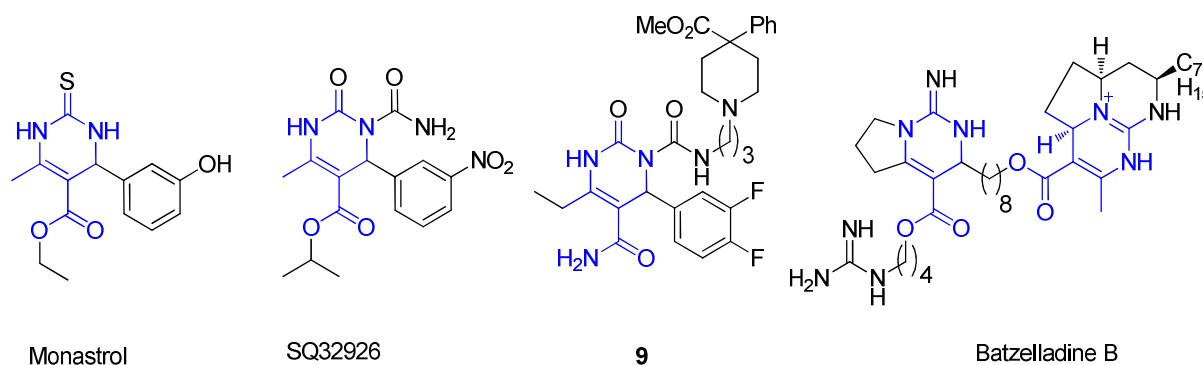


Figure 20 : Quelques dérivés de dihydropyrimidinones à activité biologique. Le monastrol inhibe la kinésine Eg5 (anticancéreux), SQ32926 est un inhibiteur de canaux calciques (antihypertenseur), **9** est un antagoniste des récepteurs adrénergiques α 1a (antihypertenseur) et la batzelladine B inhibe l'interaction gp120-CD₄ (anti-VIH)

Outre la diversité des applications biologiques, il est intéressant de constater que différentes approches de *drug discovery* ont été utilisées pour associer ces structures et leurs activités biologiques :

- Le monastrol est issu d'un criblage haut-débit sur cellules A549 (tumeur du poumon). Son action sur la kinésine Eg5 a été déduite du phénotype observé par analogie avec des inhibiteurs connus.¹⁰⁸ Ce mode d'action original fournit une alternative aux anti-mitotiques « classiques » interagissant avec la tubuline (Paclitaxel, alcaloïdes de Vinca...).
- Le composé SQ32926 a été conçu de façon semi-rationnelle en s'inspirant de relations structure-activité observées sur d'autres inhibiteurs de canaux calciques de la famille de la nifédipine.¹⁰⁹
- Le composé **9** est issu de façon similaire d'une optimisation de la nifédipine, qui est un inhibiteur de canaux calciques et un antagoniste des récepteurs adrénergiques α 1. Cette optimisation visait à développer sélectivement cette deuxième activité biologique.¹¹⁰
- La batzelladine B a été découverte à partir d'un criblage d'extraits naturels afin d'inhiber la liaison entre la protéine d'enveloppe gp-120 du VIH et les lymphocytes CD₄ humains. A partir des résultats positifs obtenus avec l'extrait de l'éponge marine *Batzella sp.*, 21 produits naturels dont la batzelladine B ont été isolés.¹¹¹

4. Tétrahydrocarbolines - synthèse et activités biologiques

Une autre partie de ce manuscrit est consacrée au composé **ITB₂**, appartenant à la famille des tétrahydro- β -carbolines. Ces dernières se prêtent globalement moins à la chimie combinatoire que les analogues d'**ITB₂** mais sont retrouvées dans un grand nombre de squelettes de produits naturels. Nous présenterons donc dans cette partie quelques méthodes de synthèse de tétrahydrocarbolines, ainsi que les activités biologiques recensées de cette famille.

a. Synthèse - La réaction de Pictet-Spengler

Découverte en 1911 par Amé Pictet et Theodor Spengler, la réaction de Pictet-Spengler est une réaction de condensation entre un dérivé carbonyle et une amine aromatique.¹¹² A l'origine destinée à la préparation d'isoquinolines, elle a rapidement été étendue à la synthèse de tétrahydro-β-carbolines à partir de dérivés du tryptophane (Figure 21).¹¹³

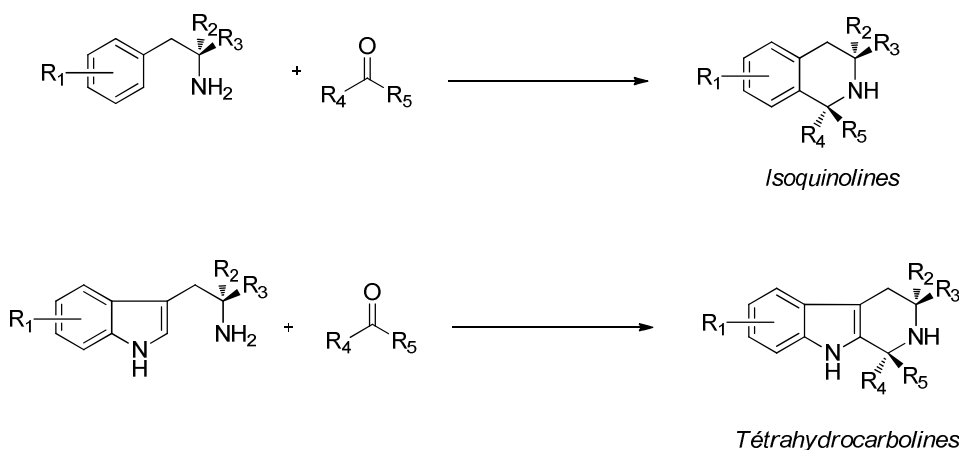


Figure 21 : Réaction de Pictet-Spengler pour la préparation d'isoquinolines et de tétrahydro-β-carbolines

Le mécanisme peut être décomposé en deux étapes : la formation préliminaire de l'imine, suivie d'une cyclisation intramoléculaire par attaque nucléophile de la position 3 de l'indole pour former un intermédiaire spiro (Figure 22).¹¹⁴ Ce dernier se réarrange ensuite en tétrahydro-β-carboline. Toutefois, ce mécanisme est controversé et il a été montré que, dans le cas d'imines particulièrement électrophiles, l'attaque nucléophile pouvait provenir directement de la position 2.¹¹⁵ En tout état de cause, la réactivité du nucléophile (cycle aromatique) et de l'électrophile (imine) sont des paramètres-clés dans le contrôle de la réaction.

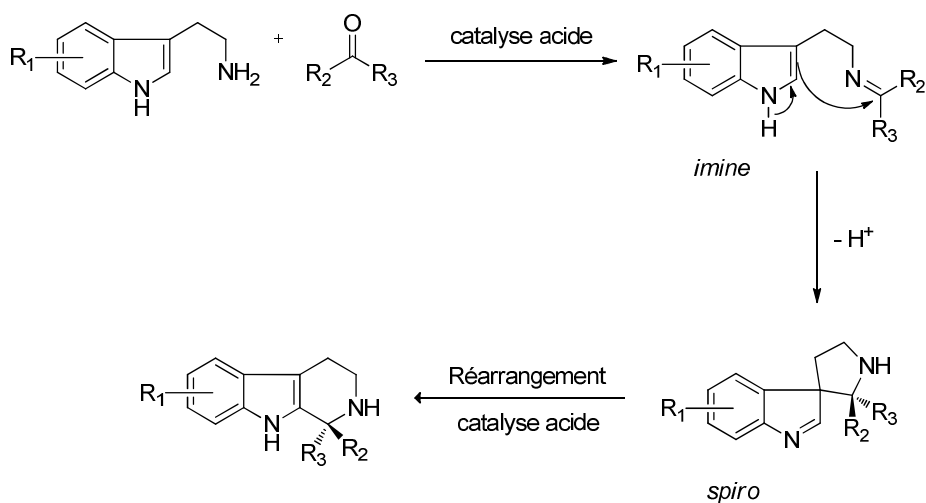


Figure 22 : Mécanisme simplifié de la réaction de Pictet-Spengler

De récents développements de la réaction de Pictet-Spengler ont vu l'émergence de nombreuses variantes (Figure 23) : la réaction d'« oxa-Pictet-Spengler »¹¹⁶ (exemple **A**¹¹⁷) ou la cyclisation intramoléculaire d'ions acyliminium – qui constituent de puissants électrophiles. Grâce à ces derniers, l'accès à de nombreux dérivés originaux des tétrahydro-β-carbolines a été possible. L'ion acyliminium peut-être préformé en partant d'un amide (exemples **B**¹¹⁸ et **D**¹¹⁹) ou généré *in situ* en employant un chloroformate (exemple **C**¹²⁰). Ces stratégies sont particulièrement utiles lors des Pictet-Spengler « difficiles » (faible réactivité des partenaires, encombrement stérique...). Nous renvoyons le lecteur à une revue exhaustive sur les cyclisations utilisant un ion acyliminium¹²¹, dont nous présentons seulement quelques exemples ici.

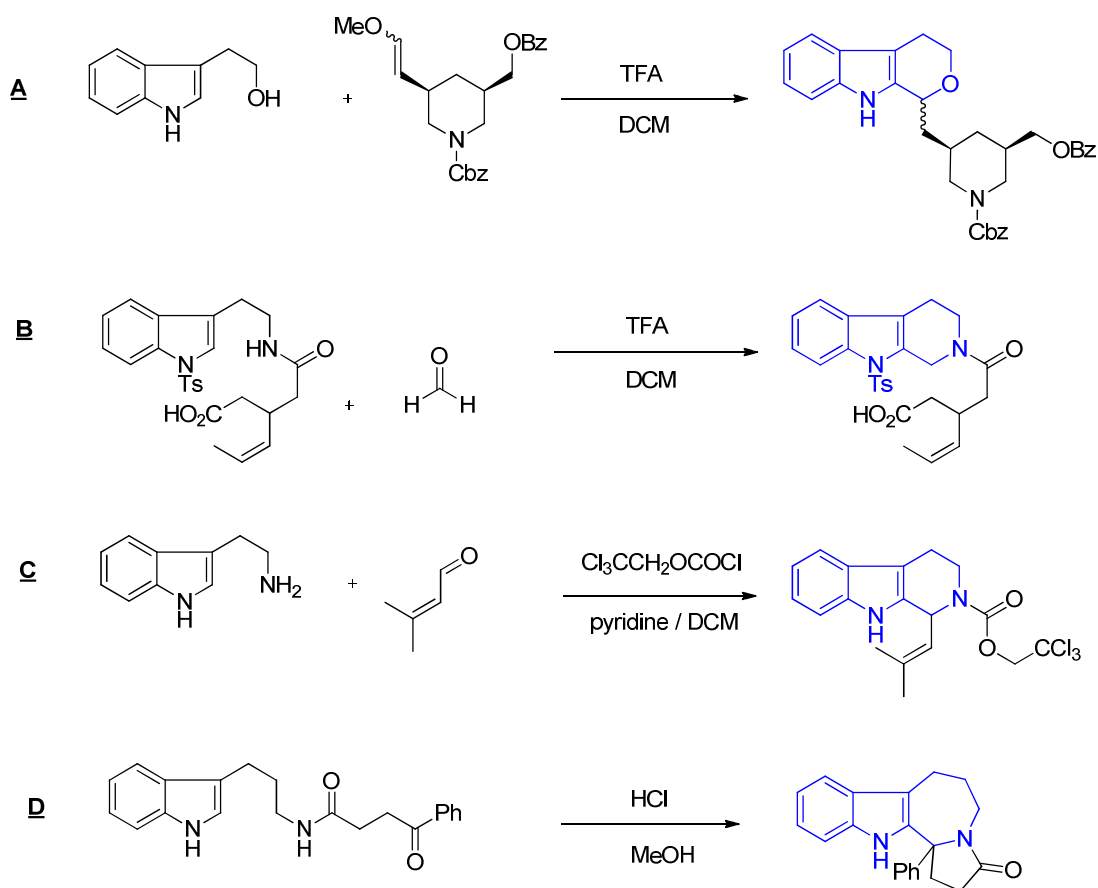


Figure 23 : Variantes de la réaction de Pictet-Spengler

Mentionnons enfin l'existence de réactions de Pictet-Spengler énantiosélectives : développées à partir des années 2000, elles reposent sur deux stratégies : l'utilisation de catalyseurs acides chiraux (haloboranes¹²², acide phosphorique de type binaphtyl¹²³, chlorosilanes¹²⁴...) ou l'utilisation de copules chirales greffées sur l'atome d'azote, pouvant être clivées dans un second temps (sulfoxydes¹²⁵, chlorures d'acyle¹²⁶). Enfin, les réactions de Pictet-Spengler basées sur des dérivés énantio-purs du tryptophane peuvent fournir des tétrahydrocarbolines-1,3-disubstituées avec une diastéréosélectivité totale.¹²⁷ Par ailleurs, des tétrahydro-β-carbolines énantio-pures peuvent également être obtenues par résolution enzymatique¹²⁸ ou par hydrogénation asymétrique des

imines correspondantes^{129,130,131}, accessibles par réaction de Bischler-Napieralski. L'ensemble de ces approches est résumé dans la Figure 24.

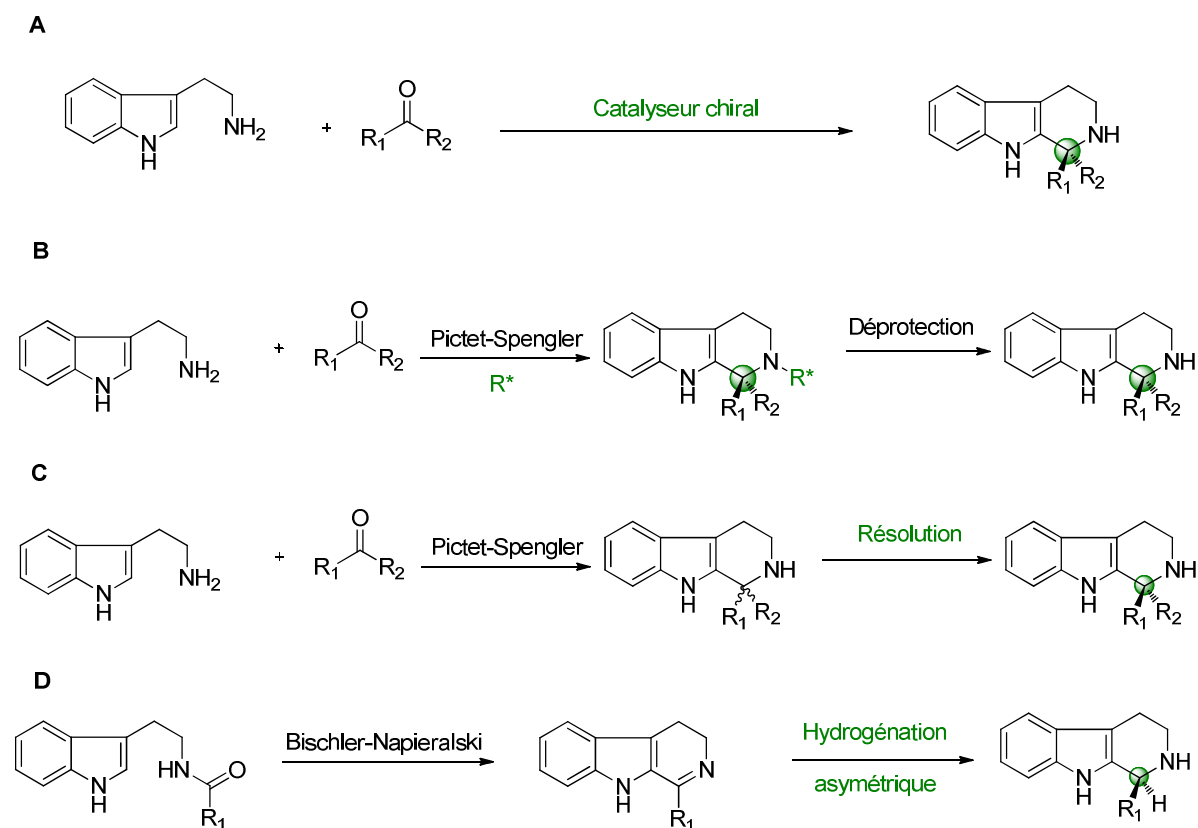


Figure 24 : Méthodes d'obtention de tétrahydro-β-carbolines énantiopures.

En A, l'utilisation d'un catalyseur chiral ; en B, l'utilisation d'une copule chirale R* greffées sur l'azote, qui est retirée dans un second temps ; en C, la résolution chirale de mélanges racémiques ; en D, l'hydrogénation asymétriques d'imines formées par réaction de Bischler-Napieralski.

b. Applications biologiques des tétrahydrocarbolines

Les tétrahydro-β-carbolines sont formées par condensation d'un dérivé du tryptophane et d'un composé carbonyle. Elles possèdent donc une proximité structurale avec le tryptophane et ses métabolites (sérotonine, mélatonine) et sont présentes notamment dans les fruits et légumes ou elles pourraient jouer le rôle d'antioxydants.¹³² Ce squelette est par ailleurs retrouvé dans de nombreux alcaloïdes naturels, dont la réserpine (antipsychotique), l'éléagnine (anti-inflammatoire¹³³) ou l'ajmalicine (Iskédyl®), antagoniste des récepteurs adrénergiques α1¹³⁴.

Enfin, des médicaments actuellement sur le marché possèdent également cette structure avec une variété d'indications thérapeutiques. Outre les dérivés des alcaloïdes précédemment cités, on peut également mentionner le tadalafil ; commercialisé sous le nom de Cialis® par les laboratoires Eli Lilly, cet inhibiteur de la phosphodiesterase 5 (PDE5) est indiqué dans les troubles érectiles et fait partie des 100 médicaments les plus vendus aux Etats-Unis en 2010.¹³⁵

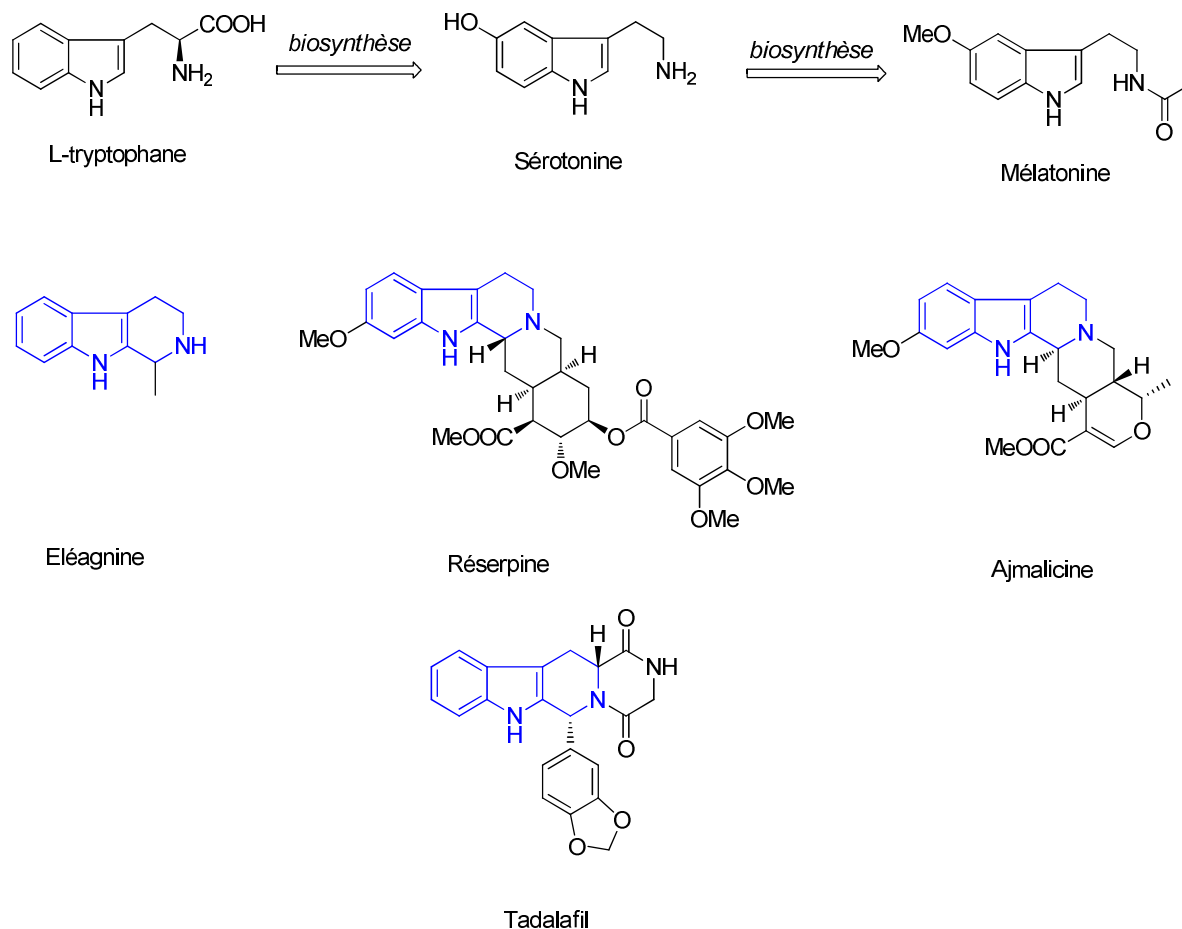


Figure 25 : Molécules biologiques apparentées aux tétrahydro-β-carbolines. Sont présentés successivement le tryptophane et ses métabolites (sérotinine, mélatonine), des alcaloïdes naturels (éléagnine, réserpine, ajmalicine) et le tadalafil (Cialis®)

5. La chémogénomique

La chémogénomique, ou génétique chimique, est une alternative aux méthodes de génomique dite « classique ». Elle consiste à étudier la fonction d'un gène, non pas par mutagenèse mais à travers la modulation par des petites molécules organiques de la protéine pour laquelle il code.

a. Principe

Deux approches peuvent être distinguées¹³⁶, dont le principe est exposé en Figure 26 :

- La génétique chimique directe consiste à cribler des bibliothèques de petites molécules pour induire un phénotype particulier. Le test biologique est généralement conçu de façon à détecter le phénotype d'intérêt par des méthodes spectrophotométriques. Après analyse des résultats, la ou les molécule(s) d'intérêt sont dérivées en sondes pharmacologiques permettant d'isoler et d'identifier la ou les protéine(s)-cible(s) impliquée(s) dans le

phénotype observé. C'est dans cette optique qu'une partie des travaux présentés dans ce manuscrit a été réalisée.

- La génétique chimique inverse est basée, à l'inverse, sur la recherche de molécules modulant l'activité d'une protéine isolée. Les protéines sont exprimées généralement de façon recombinante et purifiées, avant d'être greffées ou transférées sur des supports permettant de travailler en haut-débit (plaques, micropuces...). Le criblage des bibliothèques de molécules permet alors d'identifier une ou plusieurs molécules actives ; l'observation du phénotype induit par ces dernières sur des organismes ou des cellules permet d'établir l'implication de la protéine dans le processus observé.

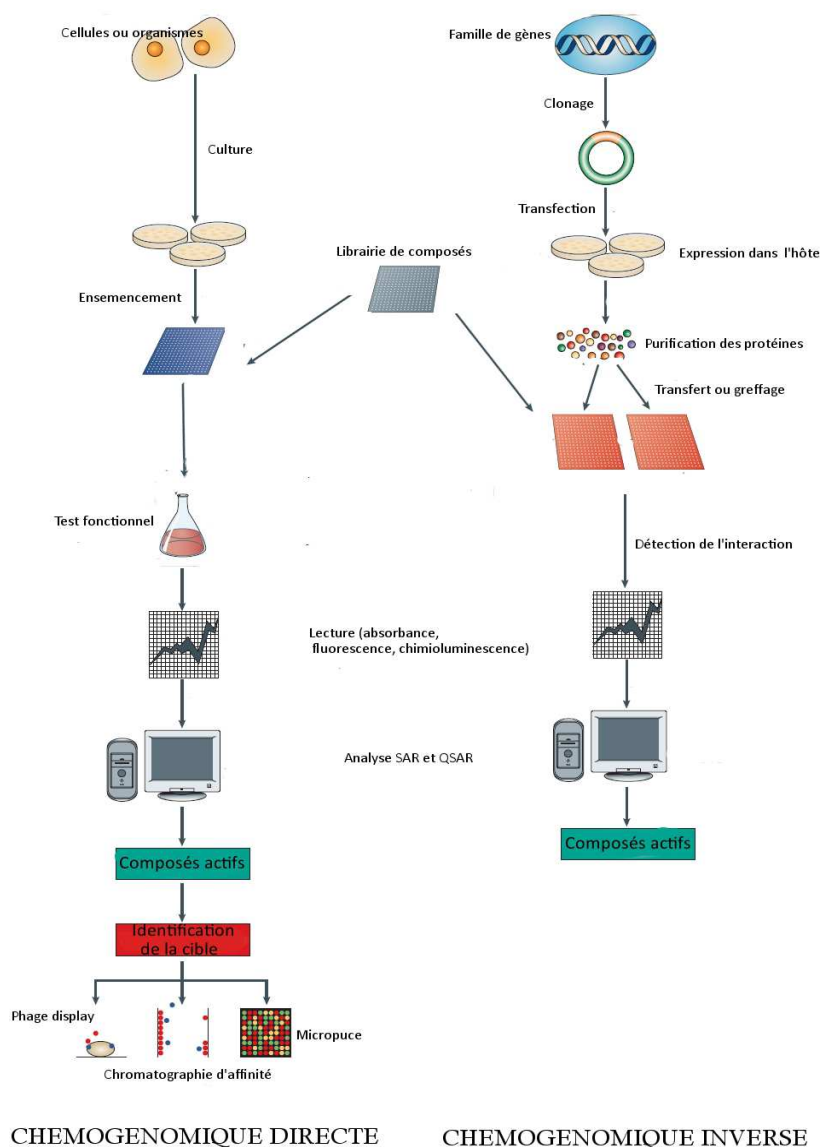


Figure 26 : Principes de la génétique chimique directe et inverse (d'après Bredel & Jacoby¹³⁷)

Grâce au développement récent des plateformes de criblage à haut débit (HTS), de la chimie combinatoire et des techniques de protéomique, ces techniques – qui offrent une alternative

intéressante aux méthodes de génétique classique – connaissent un essor rapide et sont d'un intérêt grandissant pour la découverte de nouvelles molécules bioactives d'intérêt thérapeutique.^{137,138} En effet, ce type d'approche se révèle particulièrement indiqué dans certaines situations où les techniques de génétique classique trouvent leurs limitations (mutations létales, mise en place de mécanismes de compensation du gène invalidé conduisant à un phénotype « sauvage »...).

b. Identification de protéines par méthodes d'affinité

Dans le contexte de la chémogénomique directe, plusieurs *hits* peuvent être identifiés. Ces derniers doivent alors être dérivés en biosondes afin de pouvoir isoler et identifier la (ou les) protéine(s)-cible(s). L'ensemble de ces processus présente plusieurs intérêts : la découverte de nouvelles cibles ou approches thérapeutiques, l'élucidation de nouveaux mécanismes biochimiques ou biologiques, la validation du potentiel thérapeutique des molécules étudiées... L'identification de protéines-cibles de molécules possédant une activité biologique repose donc sur un ensemble de stratégies que nous ne présenterons pas en détail ici.^{139,140} Cette partie sera consacrée uniquement aux méthodes d'affinité biochimiques : la chromatographie d'affinité et le photomarquage d'affinité, qui sera exploité dans les chapitres suivants. Ces approches nécessitent une modification chimique de la molécule d'origine afin de pouvoir isoler le complexe [sonde + protéine-cible] et identifier cette dernière.

i) Chromatographie d'affinité

Inspirée des techniques de chromatographie « classique », la chromatographie d'affinité consiste à éluer des mélanges protéiques sur une résine greffée de manière covalente avec la molécule d'intérêt. La formation de complexes [protéine + ligand] covalently liés la résine permet d'isoler sélectivement la protéine-cible. Les complexes non spécifiques sont ensuite éliminés par lavages, avant de procéder à l'élution de la protéine d'intérêt. Celle-ci est ensuite identifiée par spectrométrie de masse (Figure 27).

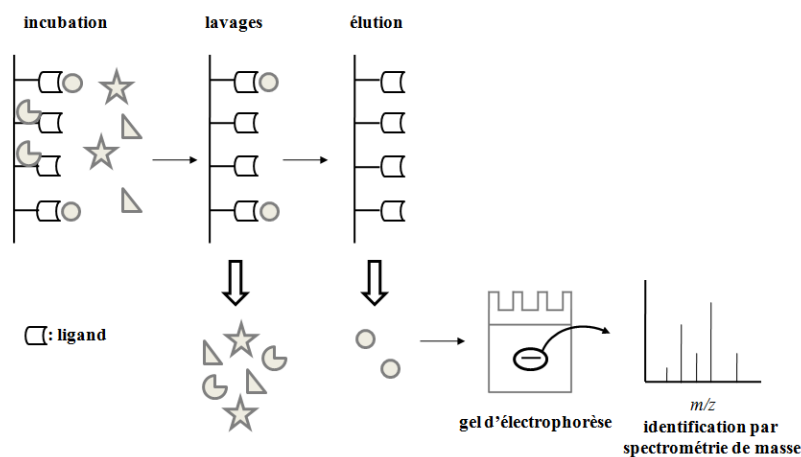


Figure 27 : Identification d'une protéine-cible par chromatographie d'affinité (d'après Waltz¹⁴¹)

L'utilisation de cette technique a permis par exemple d'identifier l'isomérase FKBP12 (*FK506 Binding Protein 12*) comme cible de l'immunosuppresseur FK506¹⁴², ou d'isoler la pyridoxal kinase comme cible jusqu'alors inconnue de la roscovitine.¹⁴³ Cependant, la chromatographie d'affinité souffre d'un certain nombre de limitations :

- Nécessité de modifier chimiquement la molécule d'intérêt : celle-ci étant usuellement fixée à la matrice via un bras espaceur covalent (polyéthylène glycol, polyproline¹⁴⁴ ...), une étude structure-activité est en général nécessaire afin de ne pas impacter négativement l'affinité de la cible pour son ligand.
- Nécessité de travailler sur des mélanges protéiques « homogènes » (lysats cellulaires) et non sur des organismes ou des cellules vivantes.
- Nécessité d'une forte affinité ligand-protéine : afin que le complexe ne soit pas dissocié lors des différents lavages, une forte affinité – de l'ordre du nanomolaire – est en général requise. Cette difficulté peut être en partie contournée en éluant le même mélange protéique sur une colonne greffée avec ligand inactif, mais structuralement proche. Les interactions non spécifiques peuvent ainsi être distinguées de la protéine d'intérêt.¹⁴⁵ Ces expériences peuvent également être utilisées comme contrôles négatifs.^{144,146}
- Manque de sensibilité : lorsque la cible recherchée est faiblement exprimée, par exemple dans le cas des facteurs de transcription. Cette technique ne permet en effet que l'isolement de protéines relativement abondantes.

En conclusion, la chromatographie d'affinité est particulièrement adaptée lorsque deux paramètres sont réunis : une forte affinité du ligand pour sa cible protéique et une forte concentration de la protéine-cible.¹⁴⁷ Le risque d'échec est donc important lorsque la protéine-cible d'un inhibiteur n'est pas connue.

ii) Photomarquage d'affinité

Le photomarquage d'affinité est basé sur une approche « inversée » par rapport à la chromatographie d'affinité (Figure 28) :^{148,149} au lieu d'éluer des fractions protéiques sur une matrice greffée avec le ligand, c'est une sonde dérivée du ligand qui est incubée dans un mélange protéique (lysats, cellules entières, fractions cellulaires...). Cette sonde forme un complexe réversible avec la protéine-cible car elle possède tout ou partie de la structure du ligand originel. Afin d'établir un lien covalent entre la protéine-cible et la sonde, cette dernière possède un groupement photoactivable qui, sous irradiation lumineuse, génère une espèce hautement réactive (nitrene, carbène...) et établit ainsi une liaison avec les acides aminés à proximité. Cette étape permet de s'assurer que le complexe ne sera pas dissocié dans les étapes de lavages ou d'élution. Enfin, ce complexe covalent [sonde + protéine-cible] est isolé au moyen d'une étiquette, afin d'identifier la protéine-cible.

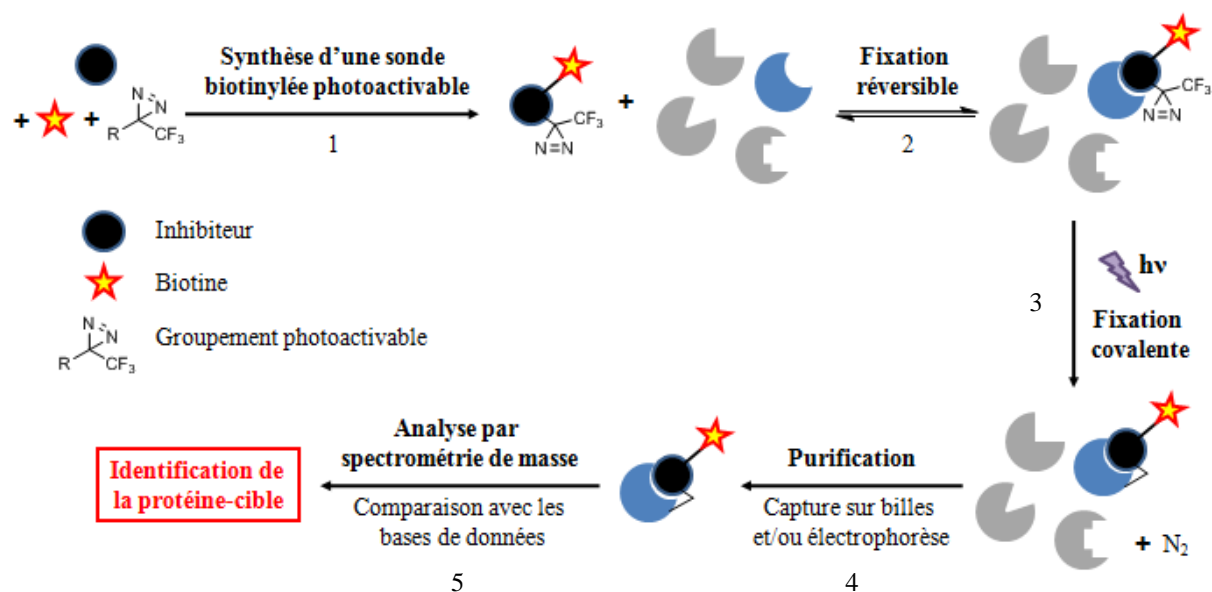


Figure 28. Stratégie d'identification de protéine cible par photomarquage d'affinité (d'après Verhaeghe¹⁵⁰). La sonde est composée du squelette de l'inhibiteur nécessaire à la reconnaissance de la cible (étape 2), d'un groupe photoactivable pour générer une liaison covalente (étape 3) et d'une étiquette pour isoler le complexe (ici une biotine, étape 4).

L'avantage de cette stratégie par rapport à la chromatographie d'affinité est double : outre le fait de pallier les inconvénients exposés dans la partie précédente, ces sondes permettent de travailler directement sur du matériel biologique vivant et donc d'interagir avec la cible en conditions « réelles » ; d'autre part, l'activité biologique de ces sondes peut être évaluée au préalable pour s'assurer qu'elles restent fonctionnelles malgré les modifications structurales. Nous allons à présent détailler succinctement les groupes photoactivables et les étiquettes les plus couramment utilisées pour le photomarquage d'affinité.

Différents groupements photoactivables ont été décrits dans la littérature.^{151,152} Ils sont généralement regroupés en fonction de l'espèce réactive qu'ils génèrent : nitrène, carbène, carbocation, radical...¹⁵³ Les fonctions les plus couramment utilisées sont les azotures d'aryle, les benzophénones et les trifluorométhyl diazirines.¹⁵⁴ Leurs intérêts comparés pour le photomarquage d'affinité sont exposés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Propriétés comparées des trois groupes photoactivables les plus courants

Groupe photoactivable	Azotures d'aryle $Ar-N_3$	Benzophénones 	Trifluorométhyl diazirines
Synthèse	+++	++	+
Espèce réactive	Nitrène $Ar-\ddot{N}$	Biradical 	Carbène
Longueur d'onde d'activation	< 300 nm	360 nm	360 nm

Temps d'irradiation nécessaire pour établir la liaison covalente	--	---	-
Autres réactions possibles	Insertion du nitrène dans l'aromatique ¹⁵⁵	Activation réversible du carbonyle	Réarrangement en diazo, qui peut à son tour générer un carbène
Réaction avec l'eau	--	-	--

Les azotures aromatiques présentent pour principal inconvénient une longueur d'onde d'activation moins compatible avec le matériel protéique (< 300 nm) ; par ailleurs, les nitrènes peuvent former des liaisons N-N et N-O relativement instables et peuvent se réarranger. Cependant, le principal avantage de ce groupement photoactivable réside dans leur taille modeste (et donc une faible modification structurale du ligand originel) et leur synthèse chimique particulièrement simple à mettre en œuvre. En ce qui concerne les benzophénones, les problèmes sont liés au biradical dont la formation est complètement réversible ; par ailleurs, pour pouvoir créer une liaison covalente, le carbonyle activé doit être parallèle à une liaison C-H de la protéine. Il en résulte la nécessité de temps d'irradiation prolongés qui peuvent être délétères pour le matériel biologique. Enfin, les trifluorométhyl diazirines souffrent essentiellement d'une synthèse chimique compliquée et d'un encombrement stérique important. Néanmoins, elles présentent des caractéristiques idéales pour le photomarquage d'affinité : l'espèce réactive (carbène) est formée rapidement à des longueurs d'onde biocompatibles et génère des liaisons covalentes stables (C-O, C-N ou C-C). L'interconversion photochimique de la diazirine en composé diazo est contrebalancée par le fait que ce dernier peut à son tour générer un carbène sous irradiation prolongée (Figure 29).^{156,157}

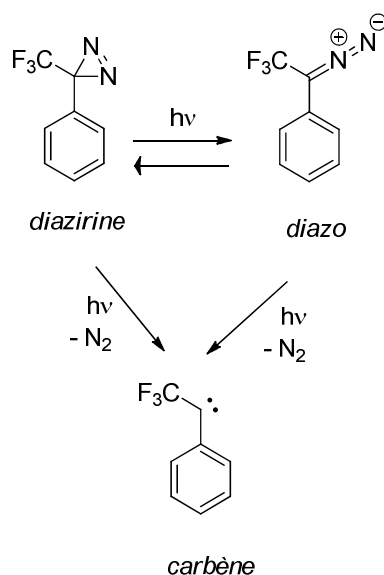


Figure 29 : Génération d'un carbène à partir d'une diazirine ou de son isomère diazo.

En ce qui concerne le choix des étiquettes servant à isoler le complexe [sonde + protéine-cible], celles-ci peuvent être de deux types :

- un atome radioactif (^3H , ^{125}I , ^{14}C ...) permet de repérer la protéine d'intérêt sur gel d'électrophorèse en 2D et d'exciser directement la bande correspondante pour analyse en spectrométrie de masse. La structure chimique du ligand ne se retrouve pas affectée mais l'utilisation d'atomes radioactifs entraîne de nombreuses contraintes de manipulation ainsi que des purifications plus compliquées (HPLC, SDS-PAGE 2D). L'utilisation du tritium a notamment permis l'identification du canal calcique PC_2 comme cible biologique du triptolide.¹⁵⁸
- les dérivés de la biotine, dont l'utilisation repose sur la forte affinité du complexe [biotine + avidine] ($K_d \approx 10^{-14}$ M). Plus particulièrement, l'utilisation de Streptavidine, variante non glycosylée et non chargée de l'avidine, permet de s'affranchir de nombreuses interactions non spécifiques. L'avantage des sondes biotinylées est que l'interaction biotine/avidine peut être exploitée de différentes manières pour caractériser la protéine d'intérêt : d'une part le complexe [sonde + protéine] peut être visualisé *in vivo* par imagerie - grâce à de l'avidine conjuguée à un fluorophore, ou sur gel SDS-PAGE par chimioluminescence en utilisant une protéine fusion avidine-HRP.¹⁵⁹ D'autre part, il peut être isolé par chromatographie d'affinité, en utilisant une résine greffée avec de la Streptavidine.¹⁶⁰ Un exemple particulièrement illustratif de ces méthodologies - mais aussi des limitations qu'elles rencontrent - est la withaferine A, molécule naturelle issue de l'ashwagandha (*Withania somnifera*) et induisant l'agrégation des filaments d'actine. Deux sondes biotinylées dérivées de la withaferine A, différant seulement par la longueur du bras espaceur (**10a** et **10b**), ont permis d'isoler deux cibles protéiques différentes auxquelles la withaferine A se lie covallement, l'annexine II¹⁶¹ et la vimentine (Figure 30).¹⁶²

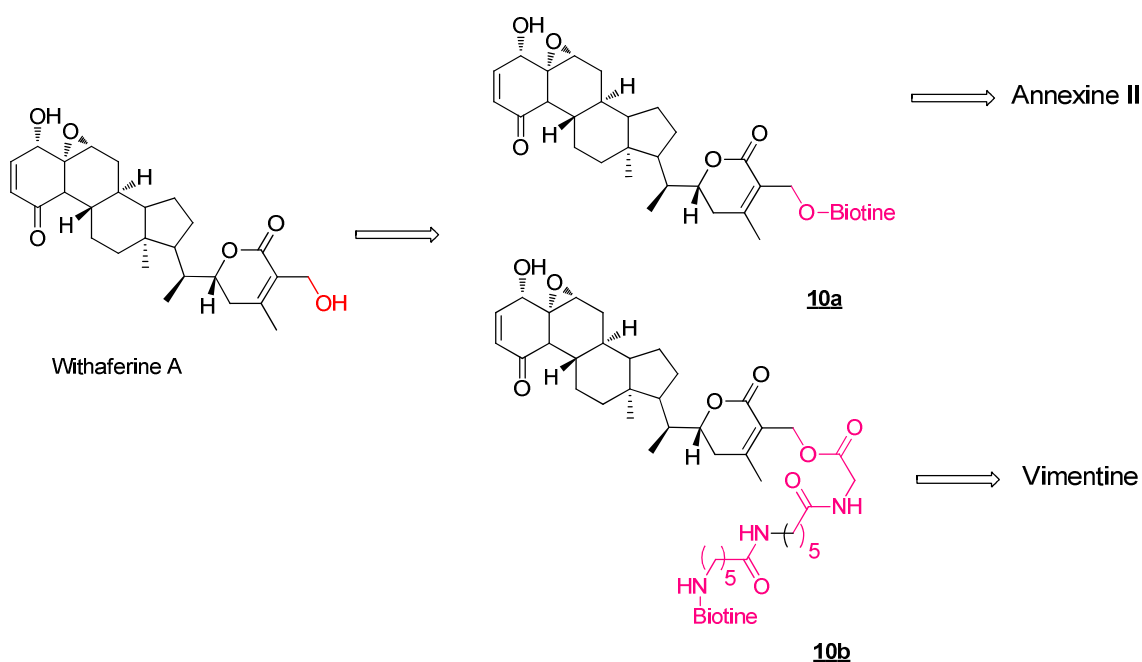


Figure 30 : Détermination de cibles de la withaferine A à l'aide de sondes biotinylées

Cet exemple démontre que le choix de l'étiquette peut avoir une grande influence sur le résultat des expériences d'identification de protéines. Cependant, il est quasiment impossible de rationaliser le choix de l'étiquette ainsi que la taille et la nature du bras espaceur *a priori*. Notons toutefois que, compte tenu de la forte affinité du complexe [biotine + avidine], l'élution du complexe [sonde + protéine-cible] peut s'avérer difficile et nécessiter des conditions drastiques, empêchant ainsi de conserver des protéines-cibles fonctionnelles. De nombreuses alternatives sont actuellement développées, telles que l'utilisation de dérivés de la biotine ayant une moins forte affinité pour l'avidine (desthiobiotine...) ou l'utilisation de bras espaceurs clivables en conditions plus douces (disulfure, diazo...).^{163 164 165}

6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté différentes notions. Tout d'abord, nous avons examiné la physiologie globale de la thyroïde ainsi que le rôle central joué par le NIS dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes. Nous avons pu mettre en évidence l'importance de ce dernier comme cible thérapeutique d'intérêt pour le traitement de pathologies thyroïdiennes, la radioprotection et la thérapie anticancéreuse. L'ensemble des modulateurs du transport de l'iode connus, dont une majorité a été découverte au laboratoire, a ensuite été introduit. Parmi eux, deux molécules constituant les têtes de série pour les travaux présentés dans ce manuscrit ont été sélectionnées : la dihydropyrimidinone **ITB₉** et la tétrahydro- β -carboline **ITB₂** ; ces deux familles chimiques ont fait l'objet d'une présentation succincte (voies de synthèse et applications biologiques). Enfin, certaines techniques de génétique chimique ont été présentées dans la dernière partie ; nous nous sommes particulièrement focalisés sur l'approche utilisée dans ce manuscrit, à savoir le photomarquage d'affinité à partir d'une sonde biotinylée.

Références bibliographiques

- ¹ Werner SC, Ingbar S, *The thyroid : a fundamental and clinical text*, Ed Braverman LE, Utiger RD, Philadelphia : Lippincott-Raven, **1991**, 1-1362
- ² Leclere J, Orgiazzi J, Rousset B, Sclienger JL, Werneau JL, *La thyroïde* 2^e édition, Elsevier Press, Paris, **2001**, 11-22
- ³ De la Vieja A, Dohán O, Levy O, Carrasco N, *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 1083-1105
- ⁴ Dai G, Levy O, Amzel LM, Carrasco N, *Chapter 15 : "The Mediator of Thyroidal Iodide Accumulation : The Sodium/Iodide symporter"* in *Handbook of Biological Physics, Vol. 2*, Konings WN, Kaback HR, Lolkema JS, Elsevier Science, **1996**
- ⁵ Alexander WD, Wolff J, *Endocrinology* **1966**, *78*, 581-590
- ⁶ Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N, *Endocr. Rev.* **2003**, *1*, 48-77
- ⁷ Rousset BA, *European Endocrine Disease* **2007**, Issue I, Section "Thyroid disorders"
- ⁸ Yoshida A, Taniguchi S, Hisatome I, Royaux IE, Green ED, Kohn LD, Suzuki K, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *7*, 3356-3361
- ⁹ Pesce L, Bizhanova A, Caraballo JC, Westphal W, Butti ML, Comellas A, Kopp P, *Endocrinology* **2012**, *1*, 512-521
- ¹⁰ Bizhanova A, Kopp P, *Cell Physiol. Biochem.* **2011**, *3*, 485-490
- ¹¹ Bizhanova A, Kopp P, *Endocrinology* **2009**, *3*, 1084-1090
- ¹² Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T, *Endocrinology*, **1997**, *138*, 2227-2232
- ¹³ Massart C, Corbineau E, *Immuno-analyse & biologie spécialisée*, **2006**, *21*, 138-143.
- ¹⁴ Wolff J, Chaikoff IL, *J. Biol. Chem.* **1948**, *174*, 555-564
- ¹⁵ Wolff J, Chaikoff IL, Goldberg RC, Meier JR, *Endocrinology* **1949**, *45*, 504-513
- ¹⁶ Boeynaems JM, Van Sande J, Dumont JE, *Eur. J. Endocrinol.* **1995**, *132*, 733-734
- ¹⁷ Pisarev MA, Gartner R, in *The Thyroid 8th edition*, Braverman LE, Utiger RD, **2000**, 85-90
- ¹⁸ Eng PHK, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, Chin WW, Braverman LE, *Endocrinology* **1999**, *8*, 3404-3410
- ¹⁹ Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Ohta M, Saito J, Pietrarelli M, Singer DS, Kimura S, Katoh R, Kawaoi A, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 8251-8256
- ²⁰ Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferi EL, Jhiang SM, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *2*, 339-345
- ²¹ Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazzaferi EL, Jhiang SM, *Endocrinology*, **1997**, *8*, 3555-3558
- ²² Paroder-Belenistky M, Maestas MJ, Dohán O, Nicola JP, Reyna-Neyra A, Follenzi A, Dadachova E, Eskandari S, Amzel LM, Carrasco N, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *44*, 17933-17938
- ²³ Dohán O, Carrasco N, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2003**, *1*, 59-70
- ²⁴ Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr, *Biochim Biophys Acta* **1994**, *2*, 133-166
- ²⁵ Bagchi N, Fawcett DM, *Biochim. Biophys. Acta*, **1973**, *318*, 235-251
- ²⁶ Nakamura Y, Ohtaki S, Yamazaki I, *J. Biochem.* **1988**, *104*, 544-549
- ²⁷ Eskandari S, Loo DDF, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 27230-27238
- ²⁸ Park SM, Chatterjee VKK, *J. Med. Genet.* **2005**, *42*, 379-389
- ²⁹ Michels AW, Eisenbarth GS, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, 226-237
- ³⁰ Dictionnaire Vidal ® **2012**, articles « Cynomel », « Levothyrox » et « Euthyral »
- ³¹ Batcher EL, Tang XC, Singh BN, Singh SN, Reda DJ, Hershman JM, *Am. J. Med.* **2007**, *10*, 880-885
- ³² Dictionnaire Vidal® **2012**, article « Maladie de Basedow »
- ³³ Nikiforov YE, *Cancer* **2010**, *7*, 1626-1628
- ³⁴ Tronko MD, Howe GR, Bogdanova TI, Bouville AC, Epstein OV, Brill AB, Likhtarev IA, Fink DJ, Markov VV, Greenebaum E, Olijnyk VA, Masnyk IJ, Shpak VM, McConnell RJ, Tereshchenko VP, Robbins J, Zvinchuk OV, Zablotska LB, Hatch M, Luckyanov NK, Ron E, Thomas TL, Voillequé PG, Beebe GW, *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, *98*, 897-903
- ³⁵ Ron E, *Health Phys.* **2007**, *5*, 502-511

- ³⁶ Rapport OMS, *Guidelines for iodine prophylaxis following nuclear accidents*, **1999**, WHO/SDE/PHE/99.6
- ³⁷ Dictionnaire Vidal © **2012**, article « Tétrai »
- ³⁸ Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P, *Eur. J. Endocrinol.* **2006**, *155*, 495-512
- ³⁹ Pourcher T, Lindenthal S, Basquin C, Ferhat O, Marsault R, Carrier P, Koulibaly M, Bussière F, Darcourt J, *Médecine Nucléaire* **2005**, *29*, 237-243
- ⁴⁰ Spitzweg C, Dietz AB, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY, Morris JC, *Gene Ther.* **2001**, *8*, 1524-1531
- ⁴¹ Faivre J, Clerc J, Gerolami R, Herve J, Longuet M, Liu B, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 8045-8051
- ⁴² Miller MD, Crofton KM, Rice DC, Zoeller RT, *Environ. Health Perspect.* **2009**, *7*, 1033-1041
- ⁴³ Crofton KM, *Int. J. Androl.* **2008**, *2*, 209-223
- ⁴⁴ Lecat-Guillet N, Ambroise Y, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1211-1216
- ⁴⁵ Lecat-Guillet N, Ambroise Y, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1819-1830
- ⁴⁶ Van Sande J, Massart C, Beauwens R, Schoutens A, Costagliola S, Dumont JE, Wolff J, *Endocrinology* **2003**, *144*, 247-252
- ⁴⁷ Dohán O, Portulano C, Basquin C, Reyna-Neyra A, Amzel LM, Carrasco N, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *51*, 20250-20255
- ⁴⁸ Anbar M, Guttman S, Lewitus Z, *Nature* **1959**, *183*, 1517-1518
- ⁴⁹ Zuckier LS, Dohán O, Li Y, Chang CJ, Carrasco N, Dadachova E, *J. Nucl. Med.* **2004**, *3*, 500-507
- ⁵⁰ Van Sande J, Denebourg F, Beauwens R, Brekman JC, Daloz D, Dumont JE, *Mol. Pharmacol.* **1990**, *37*, 583-589
- ⁵¹ Lecat-Guillet N, "Identification d'inhibiteurs du symporteur iode/sodium par criblage à haut-débit", **2006**, Université Paris-XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, CEA Saclay
- ⁵² Carrasco N, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1154*, 65-82
- ⁵³ Kaminsky SM, Levy O, Garry MT, Carrasco N, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *200*, 203-207
- ⁵⁴ Aronson PS, Bounds SE, *Am. J. Physiol.* **1980**, *238*, F210-F217
- ⁵⁵ Kosuge T, Tsuji K, Wakabayashi K, Okamoto T, Shudo K, Iitaki Y, Itai A, Sugimura T, Kawachi T, Nagao M, Yahagi T, Seino Y, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1978**, *26*, 611-619
- ⁵⁶ Lecat-Guillet N, Merer G, Lopez R, Pourcher T, Rousseau B, Ambroise Y, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 889-895
- ⁵⁷ Waltz F, Pillette L, Verhaege E, Ambroise Y, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1775-1777
- ⁵⁸ Lecat-Guillet N, Ambroise Y, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1207-1209
- ⁵⁹ Tron GC, Minassi A, Appendino G, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *11*, 5541-5550
- ⁶⁰ Biginelli P., *Gazz. Chim. Ital.* **1893**, *23*, 360-413
- ⁶¹ Folkers K, Johnson TB, *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 3784-...
- ⁶² Sweet F, Fissekis JD, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 8741-8749
- ⁶³ Kappe CO, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7201-7204
- ⁶⁴ Hu EH, Sidler DR, Dolling UH, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3454-3457
- ⁶⁵ Kappe CO, Falsone SF, *Synlett* **1998**, 718-720
- ⁶⁶ Litvić M, Večenaj I, Ladišić ZM, Lovrić M, Vinković V, Filipan-Litvić M, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3463-3471
- ⁶⁷ Hu EH, Sidler DR, Dolling UH, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3454-3457
- ⁶⁸ Wipf P, Cunningham A, *Tet. Lett.* **2002**, *43*, 2657-2659
- ⁶⁹ Baruah PP, Gadhwal S, Prajapati D, Sandhu JS, *Chem. Lett.* **2002**, 1038-1039
- ⁷⁰ Ramalinga K, Vijayalakshmi P, Kaimal TNB, *Synlett*, **2001**, 863-865
- ⁷¹ Maiti G, Kundu P, Guin C, *Tet. Lett.* **2003**, *44*, 2757-2758
- ⁷² Jauk B, Pernat T, Kappe CO, *Molecules* **2000**, *5*, 227-239
- ⁷³ Folkers K, Harwood HJ, Johnson TB, *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 3751-3758
- ⁷⁴ Bose DS, Fatima L, Mereyala HB, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 587-590
- ⁷⁵ Peng J, Deng Y, *Tet. Lett.* **2001**, *42*, 5917-5919
- ⁷⁶ Ma Y, Qian C, Wang LM, Yang M, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3864-3868

- ⁷⁷ Ranu BC, Hajra A, Dey SS, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 817-818
- ⁷⁸ Kolosov MA, Orlov VD, Belobodorov DA, Dotsenko VV, *Mol. Divers.* **2009**, *13*, 5-25
- ⁷⁹ Kappe CO, Chap. 4 « Biginelli reaction », in *Multicomponent reactions* by J Zhu & H Bienaymé, **2005**, Wiley-VCH, ISBN: 3-527-30806-7
- ⁸⁰ Lu J, Ma HR, *Synlett* **2000**, 63-64
- ⁸¹ Dondoni A, Massi A, Sabbatini S, *Tet. Lett.* **2002**, *43*, 5913-5916
- ⁸² Xu H, Wang YG, *Chin. J. Chem.* **2003**, *21*, 427-430
- ⁸³ Kumar KA, Kasthuraiah M, Reddy CS, Reddy CD, *Tet. Lett.* **2001**, *42*, 7873-7875
- ⁸⁴ Pisani L, Prokopcova H, Kreamsner JM, Kappe CO, *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 415-421
- ⁸⁵ Matloobi M, Kappe CO, *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 275-284
- ⁸⁶ Desai B, Dallinger D, Kappe CO, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4651-4664
- ⁸⁷ Wang Y, Yang H, Yu J, Miao Z, Chen R, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 3057-3061
- ⁸⁸ Ding D, Zhao CG, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *20*, 3802-3805
- ⁸⁹ Chen XH, Xu XY, Liu H, Cun LF, Gong LZ, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14802-14803
- ⁹⁰ Xu F, Huang D, Lin X, Wang Y, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4467-4470
- ⁹¹ Huang Y, Yang F, Zhu J, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16386-16387
- ⁹² Cai YF, Yang HM, Li L, Jiang KZ, Lai JQ, Jiang JX, Xu LW, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *26*, 4896-4990
- ⁹³ Dondoni A, Massi A, *Mol. Divers.* **2003**, *6*, 261-270
- ⁹⁴ Milcent R, Malanda JC, Barbier G, *J. Heterocycl. Chem.* **1997**, *34*, 329-336
- ⁹⁵ Vanden Eynde JJ, Hecq N, Kataeva O, Kappe C. O. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1785-1791
- ⁹⁶ Nilsson BL, Overman L.E., *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7706-7714
- ⁹⁷ Atwal KS, Rovnyak G. C., O'Reilly B. C., Schwartz J., *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5898-5907
- ⁹⁸ Kappe CO, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 49-51.
- ⁹⁹ O'Reilly BC, Atwal K, *Heterocycles* **1987**, *26*, 1185-1188
- ¹⁰⁰ Acharjee S, Bothara KG, Bhandari SV, Maity TK, *Med. Chem. Res.* **2011**, *6*, 705-713
- ¹⁰¹ Alam O, Khan SA, Siddiqui N, Ahsan W, Verma SP, Gilani SJ, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *11*, 5113-5119
- ¹⁰² Zhu L, Cheng P, Lei N, Yao J, Sheng C, Zhuang C, Guo W, Liu W, Zhang Y, Dong G, Wang S, Miao Z, Zhang W, *Archiv der Pharmazie* **2011**, *11*, 726-734
- ¹⁰³ Akhaja TN, Raval JP, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *11*, 5573-5579
- ¹⁰⁴ Geist JG, Lauw S, Illarionova V, Illarionov B, Fischer M, Gräwert T, Rohdich F, Eisenreich W, Kaiser J, Groll M, Scheurer C, Wittlin S, Alonso-Gomez L, Scwheitzr B, Bacher A, Diederich F, *ChemMedChem* **2010**, *7*, 1092-1101
- ¹⁰⁵ Desai MC, Chhabaria MT, Dodiya A, Bhavsar AM, Baldaniya BB, *Med. Chem. Res.* **2011**, *8*, 1331-1339
- ¹⁰⁶ Chavda DR, Modiya PR, Marvaniya HM, Sen DJ, *Int. J. Drug. Dev. Res.* **2010**, *2*, 348-355
- ¹⁰⁷ Kappe CO, *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *12*, 1043-1052
- ¹⁰⁸ Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ, *Science* **1999**, *286*, 971-974
- ¹⁰⁹ a) Atwal KS, Rovnyak GC, Schwartz J, Moreland S, Hedberg A, Gougoutas JZ, Malley MF, Floyd DM, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1510-1515. b) Atwal KS, Rovnyak GC, Kimball SD, Floyd DM, Moreland S, Swanson BN, Gougoutas JZ, Schwartz J, Smillie KM, Malley MF, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2629-2635. c) Rovnyak GC, Atwal KS, Hedberg A, Kimball SD, Moreland S, Gougoutas JZ, O'Reilly BC, Schwartz J, Malley MF, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3254-3263
- ¹¹⁰ a) Nagarathnam D, Miao SW, Lagu B, Chiu G, Fang J, Murali Dhar TG, Zhang J, Tyagarajan S, Marzabadi MR, Zhang F, Wong WC, Sun W, Tian D, Wetzel JM, Forray C, Chang RSL, Broten TP, Ransom RW, Schorn TW, Chen TB, O'Malley S, Kling P, Schneck K, Bendesky R, Harrell CM, Vyas KP, Gluchowski C, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4764-4777. b) Wetzel JM, Miao SW, Forray C, Borden LA, Branchek TA, Gluchowski C, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1579-1581
- ¹¹¹ Patil AD, Kumar NV, Kokke WC, Bean MF, Freyer AJ, De Brosse C, Mai S, Truneh A, Faulkner DJ, Carte B, Breen AL, Hertzberg RP, Johnson RK, Westley JW, Pottst BCM, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1182-1188
- ¹¹² Pictet A, Spengler T, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1911**, *44*, 2030-2036

- ¹¹³ Tatsui G, *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1928**, *48*, 453-459
- ¹¹⁴ Bailey PD, *J. Chem. Res.* **1987**, 202
- ¹¹⁵ Casnati G, Dossena A, Pochini A, *Tet. Lett.* **1972**, *52*, 5277
- ¹¹⁶ Larghi EL, Kaufman TS, *Synthesis* **2006**, *2*, 187-220
- ¹¹⁷ Danieli B, Lesma G, Passarella D, Silvani A, *Tet. Lett.* **2000**, *41*, 3489-3492
- ¹¹⁸ Yamanaka E, Shibata N, Sakai S, *Heterocycles* **1984**, *22*, 371
- ¹¹⁹ Atta-ur-Rahman, Ghazla M, Sultana N, Bashir M, *Tet. Lett.* **1980**, *21*, 1773
- ¹²⁰ Lögers M, Overman LE, Welmaker GS, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9139
- ¹²¹ Maryanoff BE, Zhang HC, Cohen JH, Turchi IJ, Maryanoff CA, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1431-1628
- ¹²² Yamada H, Kawate T, Matsumizu M, Nishida A, Yamaguchi K, Nakagawa M, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6348-6354
- ¹²³ Seayad J, Seayad AM, List B, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *128*, 1086-1087
- ¹²⁴ Bou-Hamdan FR, Leighton JR, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2403-2406
- ¹²⁵ Gremmen C, Willemsse B, Wanner MJ, Koomen GJ, *Org. Lett.* **2000**, *13*, 1955-1958
- ¹²⁶ Schmidt G, Waldmann H, Henke H, Burkard M, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1566-1571
- ¹²⁷ Cox ED, Cook JM, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1797-1842
- ¹²⁸ Espinoza-Moraga M, Petta T, Vasquez-Vasquez M, Laurie VF, Moraes LAB, Silva Santos L, *Tet. Asym.* **2010**, *16*, 1988-1992
- ¹²⁹ Li C, Xiao J, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *40*, 13028-13209
- ¹³⁰ Enthaler S, Erre G, Junge K, Addis D, Kadyrov R, Beller M, *Chem. Asian J.* **2008**, *7*, 1104-1110
- ¹³¹ Roszkowski P, Czarnocki S, Maurin JK, Siwicka A, Sawadzka A, Szawkalo J, Leniewski A, Czarnocki Z, *Int. Cong. Series* **2007**, *1304*, 46-59
- ¹³² Herraiz T, Galisteo J, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7156-7161
- ¹³³ Idowu TO, Iwalewa OE, Aderogba MA, Akinpelu BA, Ogundaini AO, *J. Biol. Sci.* **2006**, *6*, 1029-1034
- ¹³⁴ Roquebert J, Demichel P, *Eur. J. Pharmacol.* **1984**, *1*, 203-205
- ¹³⁵ Bartholow M, site web *Pharmacy Times*, publié le 16/05/2011
- ¹³⁶ Walsh DP, Chang YT, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2476-2530
- ¹³⁷ Bredel M, Jacoby E, *Nature* **2004**, *5*, 262-275
- ¹³⁸ Rognan D, *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *1*, 1-15
- ¹³⁹ Tochtrop GP, King RW, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2004**, *7*, 677-688
- ¹⁴⁰ Hart CP, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 513-519
- ¹⁴¹ Waltz F, « Etude du transport de l'iode par chémogénomique », **2011**, Université Paris-XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, CEA-Saclay
- ¹⁴² Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL, *Nature* **1989**, *341*, 758-760
- ¹⁴³ Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, Lozach O, Schmitt S, Baratte B, Koken M, Coburn SP, Tang L, Jiang T, Liang DC, Galons H, Dierick JF, Pinna LA, Meggio F, Totzke F, Schächtele C, Lerman AS, Carnero A, Wan Y, Gray N, Meijer L, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31208-31219
- ¹⁴⁴ Sato SI, Kwon Y, Kamisuki S, Srivastava N, Mao Q, Kawasoe Y, Uesugi M, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 873-880
- ¹⁴⁵ Burdine L, Kodadek T, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 593-597
- ¹⁴⁶ Wang G, Shang L, Burgett AW, Harran PG, Wang X, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 2068-2073.
- ¹⁴⁷ Reddy MM, Bachhawat-Sikder K, Kodadek T, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1127-1137
- ¹⁴⁸ Colca JR, Harrigan GG, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2004**, *7*, 699-704
- ¹⁴⁹ Hatanaka Y, Sadakane Y, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 271-288
- ¹⁵⁰ Verhaege E, « Etude des mécanismes d'accumulation de l'iode chez l'algue brune *Laminaria Digitata* et chez les mammifères », **2007**, Université Paris-XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, CEA-Saclay
- ¹⁵¹ Kotzyba-Hibert F, Kapfer I, Goeldner M, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1296-1312
- ¹⁵² Fleming SA, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479-12520

- ¹⁵³ Prestwich GD, Dormán G, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64-77.
- ¹⁵⁴ Hashimoto M, Hatanaka Y, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *15*, 2513-2523
- ¹⁵⁵ Schuster GB, Platz MS, *Adv. Photochem.* **1992**, *17*, 69-143
- ¹⁵⁶ Zhang Y, Burdzinski G, Kubicki J, Platz MS, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16134-16135
- ¹⁵⁷ Toscano JP, Celius TC, *The Photochemistry of Diazirines* in *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2^{ème} édition, Ed. Lenci F & Horspool W, CRC Press, **2003**, ISBN : 978-0-8493-1348-6
- ¹⁵⁸ Leuenroth SJ, Okuhara D, Shotwell JD, Markowitz GS, Yu Z, Somlo S, Crews CM, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 4389-4394
- ¹⁵⁹ Hatanaka Y, Hashimoto M, Kanaoka Y, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 453-454
- ¹⁶⁰ Hatanaka Y, Kempin U, Jong-Jip P, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5639-5643
- ¹⁶¹ Falsey RR, Marron MT, Gunaherath MKB, Shirahatti N, Mahadevan D, Gunatilaka AAL, Whitesell L, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 33-38
- ¹⁶² a) Yokota Y, Bargagna-Mohan P, Ravindranath PP, Kim KB, Mohan R, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2603-2607.
b) Bargagna-Mohan P, Hamza A, Kim YE, Khuan Ho Y, Mor-Vaknin N, Wendschlag N, Liu J, Evans RM, Markovitz DM, Zhan CG, Kim KB, Mohan R, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 623-634
- ¹⁶³ Budin G, Moune-Dimala M, Leriche G, Saliou JM, Papillon J, Sanglier-Cianférani S, Van Dorsselaer A, Lamour V, Brino L, Wagner A, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2359-2361
- ¹⁶⁴ Gartner CA, Elias JE, Bakalarski CE, Gygi SP, *J. Prot. Res.* **2007**, *6*, 1482-1491
- ¹⁶⁵ Fonović M, Verhelst SHL, Sorum MT, Bogyo M, *Mol. Cell. Prot.* **2007**, *6*, 1761-1770

Chapitre II : Objectifs et stratégies envisagées

1. Objectifs

Nous avons vu dans la partie précédente que l'élucidation de mécanismes impliqués dans le transport d'iode couvrait des enjeux majeurs de santé publique. Dans cette optique, le criblage haut-débit effectué en 2005 par le Dr. Lecat-Guillet a permis d'identifier 10 inhibiteurs puissants du transport de l'iode à partir d'une chimiothèque commerciale. Ces « têtes de file » et leurs dérivés représentent des molécules à fort potentiel thérapeutique ainsi que des outils pharmacologiques intéressants pour la caractérisation de protéines impliquées dans le transport de l'iode. Nous avons donc souhaité valoriser ces premiers résultats en effectuant un travail similaire à celui du Dr. Waltz sur le composé **ITB₅**¹. Notre étude portera majoritairement sur **ITB₉**, un inhibiteur à action directe sur lequel aucun travail préliminaire n'a été effectué. Nous étudierons également dans une moindre mesure **ITB₂**, un inhibiteur à action indirecte sur lequel certains travaux antérieurs ont été menés.

2. Stratégies envisagées

Il s'agira d'une part d'étudier les relations structure-activité de ces deux « têtes de file » et d'optimiser leur activité biologique pour trouver des inhibiteurs plus puissants du transport de l'iode. D'autre part, en fonction des résultats obtenus dans cette première partie, une ou plusieurs biosondes dérivées de ces inhibiteurs seront synthétisées et appliquées à la caractérisation de protéines d'intérêt.

a. Relations structure-activité

Afin de réaliser une étude SAR aussi exhaustive que possible, plusieurs séries d'analogues seront synthétisés – éventuellement par synthèse parallèle – afin d'apporter des modifications sur chaque fragment et ainsi d'en étudier l'influence. La conception des analogues sera basée sur une double approche de complexification (*conjunctive approach*) et de similitude (*analogic approach*) par rapport à la tête de file² :

- La cible biologique des inhibiteurs n'étant pas connue, certaines parties seront modifiées assez largement « en aveugle ». Dans la mesure du possible, les variations seront diversifiées au maximum et des séries complètes d'homologues seront réalisées.
- D'autres modifications plus ciblées se baseront sur des considérations d'isostérisme. Il s'agit ici d'essayer d'optimiser l'activité biologique des inhibiteurs tout en conservant une structure chimique très proche de celle de la tête de file. Par exemple, trois isostérismes « classiques » en chimie médicinale^{2,3} seront fréquemment utilisés :
 - o Le remplacement d'un atome d'hydrogène par un atome de fluor
 - o Le remplacement d'un hétéroatome divalent (X = NH, O, S) par ses équivalents
 - o Le remplacement d'un noyau phényle par une pyridine ou un thiophène
- Enfin, d'autres types de modifications seront également réalisés :
 - o Extension/réduction de cycle
 - o Oxydation de cycle, partielle ou totale
 - o Variation de la position des substituants sur un noyau phényle

Par ailleurs, pour des considérations pratiques, les contraintes de disponibilité commerciale des synthons et de voies de synthèse « rapides » (1 à 3 étapes en général) ont pu orienter nos choix synthétiques. Tous les composés ainsi synthétisés seront ensuite évalués pour leur aptitude à bloquer l'incorporation d'iode dans les cellules FRTL-5 (thyrocytes de rat) grâce au test colorimétrique à l'iode froid développé au laboratoire⁴, et dans certains cas à l'iode radioactif.⁵ Nous aurons ainsi développé un ensemble de relations structure-activité vis-à-vis de l'inhibition du transport d'iode.

b. Optimisation de l'activité biologique

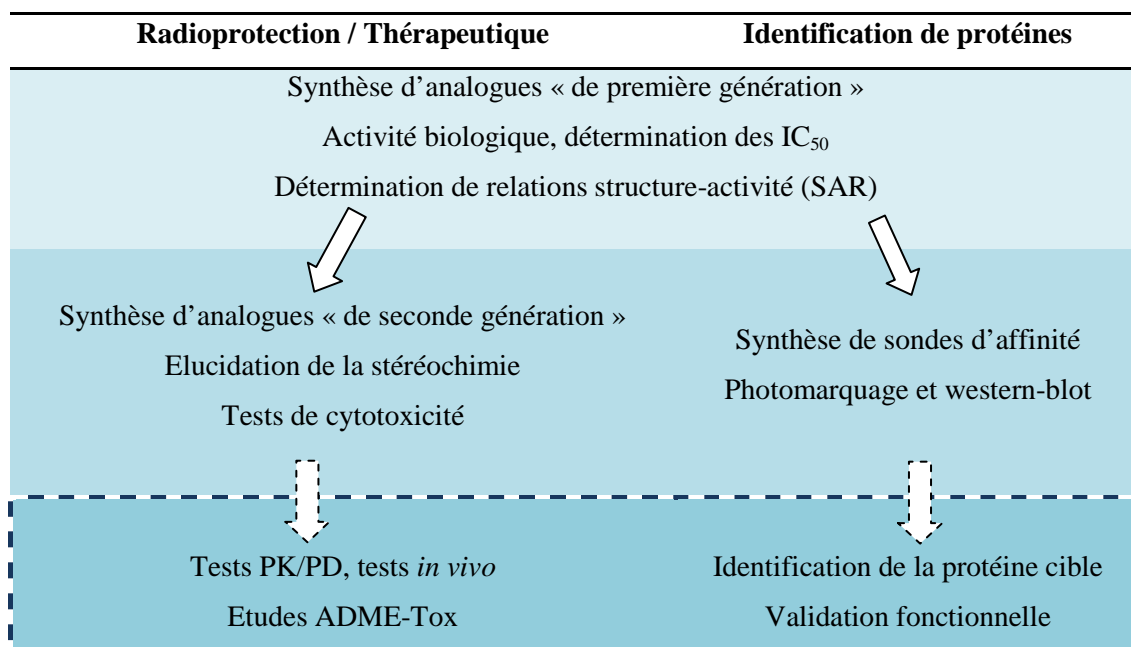
Dans un deuxième temps, des molécules « de seconde génération », comportant plusieurs modifications par rapport à la structure de la tête de file, seront conçues et synthétisées. En se basant sur les premières séries de relations structure-activité, des groupements fonctionnels conférant un gain d'activité seront sélectionnés et combinés pour former des analogues avec une activité potentielle très élevée. Ces molécules représentent des candidats pharmaceutiques intéressants pour la prévention et/ou le traitement de pathologies thyroïdiennes que nous avons développées dans le chapitre précédent. L'activité biologique ainsi que la cytotoxicité de ces nouveaux analogues sera également mesurée. Enfin, l'impact de la stéréochimie sur le pouvoir inhibiteur sera également étudié dans chacune des familles.

c. Recherche de protéines impliquées dans le transport de l'iode

Enfin, les relations structure-activité précédemment déterminées nous permettront de concevoir une ou plusieurs sondes photoactivables dérivées des inhibiteurs les plus actifs. En raison de l'expérience dont nous disposons au laboratoire, le groupe photoactivable choisi sera une trifluorométhyl diazirine. Nous avons vu en partie 5.b.ii) du chapitre I qu'il possède des caractéristiques idéales pour l'identification de protéines par photomarquage d'affinité. De la même façon, les étiquettes choisies pour isoler le complexe [sonde + protéine-cible] seront de type biotine. Plus particulièrement, les travaux d'optimisation effectués par le Dr. Waltz sur des sondes dérivées d'**ITB₅** suggèrent que l'utilisation de desthiobiotine était préférable à la biotine, en raison de la trop forte affinité de cette dernière pour la streptavidine. L'éluion du complexe [sonde + protéine-cible] s'en trouvait ainsi nettement compliquée. Nous emploierons donc une étiquette desthiobiotinylée. Afin de déterminer les protéines-cibles de chacun des inhibiteurs, des sondes de ce type seront synthétisées à partir des meilleurs inhibiteurs et des essais de photomarquage seront effectués.

L'ensemble des stratégies développées dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit sont résumées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Stratégies et intérêts des inhibiteurs du transport de l'iode. Après une démarche commune (établissement de la SAR), les stratégies divergent selon le but poursuivi : recherche de candidats pharmaceutiques ou recherche de protéines impliquées dans le transport de l'iode. Le cadre en pointillés présente les perspectives des travaux à réaliser, qui ne seront donc pas abordées dans ce manuscrit.



Références bibliographiques

¹ Waltz F, « Etude du transport de l'iode par chémogénomique », **2011**, Université Paris-XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, CEA-Saclay

² « Application strategies for primary structure-activity relationships exploration », C.G. Wermuth, Chap. 18 in “The practice of Medicinal Chemistry”, 2nd edition, Wermuth CG, **2003**, Elsevier, ISBN : 0-12-74481-5

³ Patani GA, LaVoie EJ, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 3147-3176

⁴ Waltz F, Pillette L, Ambroise Y, *Anal. Biochem* **2010**, 396, 91-95

⁵ Lecat-Guillet N, Merer G, Lopez R, Pourcher T, Rousseau B, Ambroise Y, *Assay Drug Dev Tech.* **2007**, 4, 535-540

Chapitre III : Etude du composé ITB_9

En se basant sur les résultats du criblage à haut-débit réalisé par le Dr. Lecat-Guillet, nous avons identifié la dihydropyrimidinone ITB_9 comme un inhibiteur particulièrement prometteur de l'incorporation d'iodures dans la thyroïde. En effet, il possède l'un des meilleurs IC_{50} de la série, tant sur les cellules *hNIS*-HEK293 que sur les FRTL-5 (0,4 μ M). Les expériences d'électrophysiologie ont en outre prouvé qu'il était un inhibiteur direct du transport de l'iode, dont on peut raisonnablement penser qu'il cible le NIS.¹ Par ailleurs, la structure d' ITB_9 , constituée d'un squelette de type dihydropyrimidinone, est facilement accessible synthétiquement *via* la réaction multicomposants de Biginelli. Dans ce chapitre, après avoir défini une nomenclature et une stratégie, nous présenterons la synthèse de 111 analogues structuraux d' ITB_9 possédant pour la plupart des modifications *single-point*. Les résultats biologiques nous permettront ensuite de définir un ensemble de relations structure-activité, qui sera utilisé pour concevoir et synthétiser des analogues de seconde génération plus actifs. Enfin, dans une dernière partie, la synthèse de sondes photoactivables dérivées d' ITB_9 ainsi que des essais préliminaires de capture de protéines-cibles seront présentés.

1. Analyses préliminaires

a. Analyse de la structure d' ITB_9 et nomenclature

Avant de commencer la synthèse d'analogues, nous nous proposons d'analyser succinctement la structure d' ITB_9 afin de définir une nomenclature qui sera utilisée tout au long de ce manuscrit.

ITB_9 possède un squelette principal, représenté en bleu sur la Figure 31a, et composé :

- d'un cycle DHPM (*DiHydroPyriMidine*), dont les atomes constitutifs seront numérotés et désignés selon la nomenclature officielle, soit N_1 , C_2 , N_3 , C_4 , C_5 et C_6 .
- d'une fonction carbonylée branchée en C_5 . Le groupe carbonyle est ici considéré comme partie intégrante du « cœur » moléculaire et est donc numéroté C_7 , O_8 .

Autour de ce squelette principal sont greffés divers groupes fonctionnels R_x , éventuellement reliés par des bras espaceurs B_x de longueur variable n_x . Par souci de clarté, nous allons numéroté les groupes R_x et les bras espaceurs B_x en fonction de l'atome du cycle principal auquel ils sont rattachés. Enfin, deux hétéroatomes seront modifiés au cours de cette étude, qui seront respectivement notés X pour l'hétéroatome en C_2 et Y pour l'hétéroatome en C_7 . La quasi-totalité des dérivés d' ITB_9 pourra

donc être schématisée par la structure de Markush présentée en Figure 31b : les groupes R_x sont indiqués en vert, les bras espaceurs B_x en violet et les hétéroatomes X et Y en rouge.

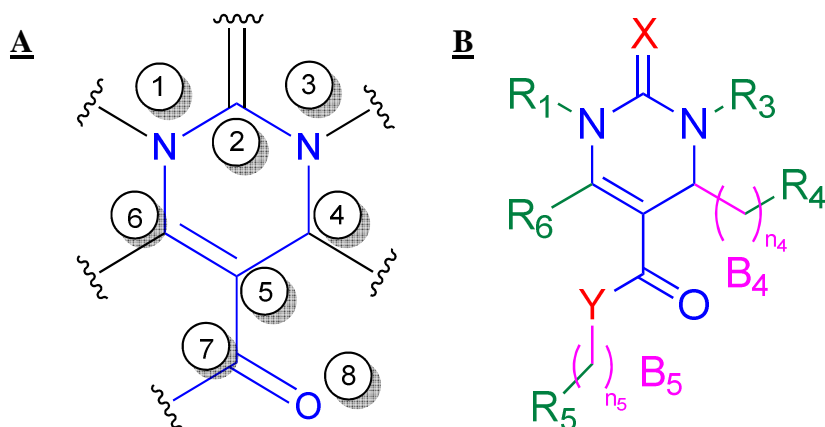


Figure 31 : **A.** Numérotation des atomes du cycle principal ; **B.** Structure de Markush des analogues d'*ITB₉*

b. Stratégies de synthèse d'analogues d'*ITB₉*

Comme nous l'avons détaillé dans le chapitre I, un grand nombre d'analogues est directement accessible par synthèse parallèle grâce à la réaction de Biginelli. Des modifications pourront ainsi être apportées sur la quasi-totalité des groupes fonctionnels d'*ITB₉* en fonction des réactifs de départ choisis (Figure 32). Par ailleurs, quelques uns seront synthétisés indépendamment par d'autres voies. Nous présentons ici succinctement les modifications que nous souhaitons apporter sur les différents fragments d'*ITB₉*, avant de les examiner plus en détail.

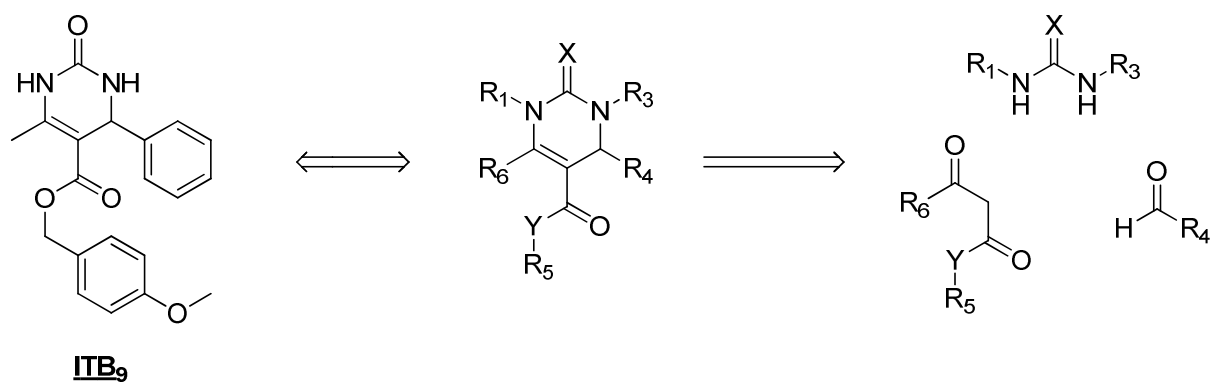


Figure 32 : Rétrosynthèse générale des analogues d'*ITB₉*

- **Partie Nord** (R_1, R_3, X) : ces modifications seront portées par le bloc « urée » de départ. La substitution des azotes N_1 et N_3 permettra de moduler le caractère donneur de liaisons hydrogène de ces deux atomes en branchant des substituants de nature variée. On pourra également déterminer l'effet de l'encombrement stérique sur ces positions. L'atome d'oxygène sera enfin remplacé par un atome de soufre.

- Partie Est (R_4) : ces modifications seront portées par le bloc « aldéhyde ». La substitution du noyau phényle par des groupements diversifiés, ainsi que son remplacement par des alkyles ou des hétérocycles permettra de déterminer l'influence de cette zone sur l'activité. L'insertion de différents bras espaceurs entre le noyau aromatique et le cycle DHPM permettra enfin de déterminer la taille optimale de B_4 .
- Partie Sud (R_5 , Y) : ces modifications seront portées par le bloc « cétoester ». De la même façon, la substitution du noyau benzylique ainsi que son remplacement par divers alkyles ou hétérocycles seront envisagés. Par ailleurs, les analogues d'*ITB₉* avec $n_5 = 0$ et $n_5 = 2$ permettront d'estimer la taille optimale de B_5 . Enfin, la fonction ester sera remplacée par une fonction amide ($Y = NH$).
- Partie Ouest (R_6) : ces modifications seront également portées par le bloc « cétoester ». L'allongement de la chaîne alkyle ou la substitution du carbone C_6 permettra de tester l'importance de cette zone pour l'activité biologique ainsi que l'influence de l'encombrement stérique.
- Modification du cœur DHPM : partant du postulat que ce cycle est essentiel pour l'activité et au vu des difficultés synthétiques pour introduire de petites modifications, seules deux transformations ont été envisagées : l'oxydation totale en 2-hydroxypyrimidine, ainsi que le déplacement de la double liaison C_5-C_6 en C_4-C_5 .

L'ensemble des modifications apportées est résumé dans la Figure 33.

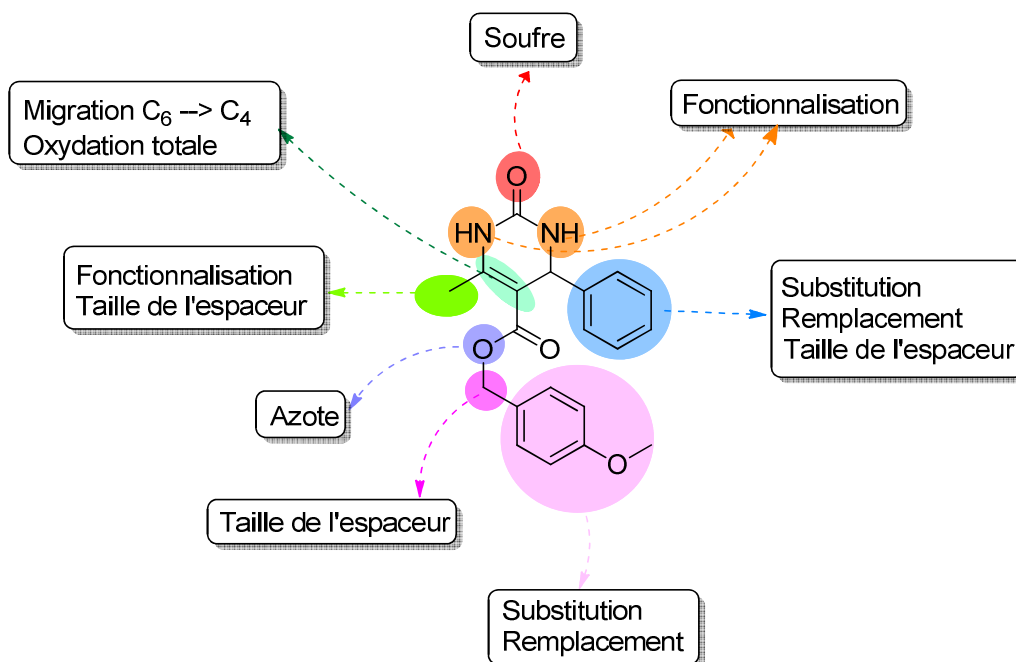


Figure 33 : Modifications envisagées sur *ITB₉*

Après avoir défini une nomenclature de travail et conçu un certain nombre d'analogues « de première génération » ne possédant qu'un seul point de diversification par rapport à la tête de file, la synthèse de ces derniers par synthèse parallèle va être présentée dans la partie suivante.

2. Synthèse d'analogues « de première génération »

Dans cette partie, nous présenterons d'abord succinctement la mise au point des conditions opératoires, puis nous détaillerons les analogues synthétisés en les regroupant en différentes familles. Mentionnons dès à présent que tous les produits synthétisés en vue d'être testés ont été isolés avec une pureté supérieure à 95 %.

a. Détermination des conditions opératoires

La large diversité de catalyseurs décrits dans la littérature pour effectuer la réaction de Biginelli (plus de 200 conditions opératoires décrites)² nous a conduits à effectuer un premier criblage « rapide » afin de déterminer des conditions opératoires satisfaisantes pour les synthèses parallèles que nous souhaitons effectuer. Plusieurs critères ont ainsi été sélectionnés, en s'inspirant de synthèses parallèles déjà décrites :^{3,4,5,6}

- *Réaction en absence de solvant* : la plupart des aldéhydes ou des β-cétoesters étant liquides à température ambiante, ces derniers permettent l'homogénéité du milieu réactionnel.
- *Séparation aisée des produits* : la plupart des analogues d'ITB₉ formés à partir de l'urée sont facilement isolables par précipitation dans l'éthanol.
- *Utilisation d'acides de Lewis* : largement décrits dans la littérature et préférés aux acides de Brønsted en raison de leur stabilité et de leur plus grande tolérance à divers groupes fonctionnels.
- *Choix des réactifs* : nous avons choisi une réaction de Biginelli « modèle » à partir d'urée, d'acétoacétate de benzyle commercial et de 2-furaldéhyde (Figure 34). Chronologiquement, la première série d'analogues a en effet été la variation de R₄. Nous avons donc choisi un aldéhyde « atypique » pour s'assurer que les conditions opératoires permettraient de former des produits de condensation à partir d'aldéhydes originaux. Bien évidemment, cette approche ne permet pas de préjuger d'une réactivité identique pour d'autres blocs, et ce d'autant plus qu'une diversité maximale est recherchée.

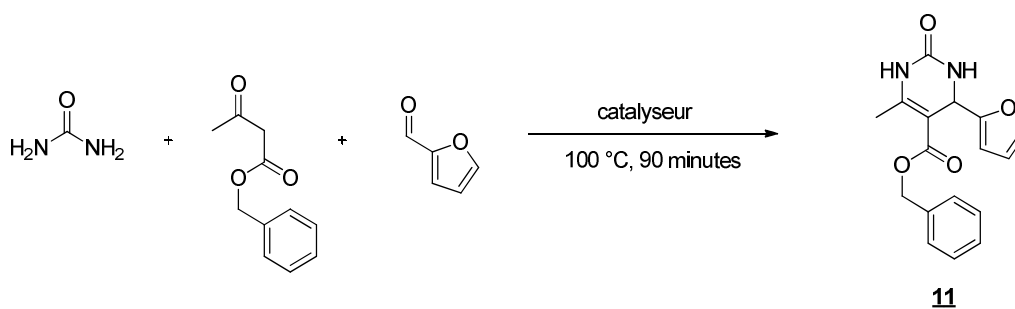


Figure 34 : Réaction "modèle" pour la mise au point des conditions opératoires de synthèse parallèle

Les réactifs sont donc chauffés à 100 °C pendant 90 minutes en présence de 10 mol% de catalyseur. A l'issue, les mélanges réactionnels sont solubilisés dans le DMSO et analysés par LC-MS : la quantité de produit formé est déterminée à partir d'une gamme préparée au préalable, en utilisant le toluène comme étalon afin de normaliser les signaux. Les résultats, exprimés en pourcentage par rapport à la quantité attendue en cas de conversion complète, sont regroupés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Criblage de catalyseurs pour la réaction de Biginelli. La réaction est effectuée à partir de 0,5 mmol de 2-furaldéhyde, 0,5 mmol d'acétoacétate de benzyle et 0,75 mmol d'urée, dans les conditions suivantes : 10 % mol de catalyseur, 100 °C, 90 minutes.

Catalyseur	Proportion de 11 (%)	Catalyseur	Proportion de 11 (%)
AlCl ₃	43	PbCl ₂	21
Al(NO ₃) ₃	27	LiClO ₄	27
BaCl ₂	18	LiBr	26
BaSO ₄	6	MgBr ₂	30
CdCl ₂	23	Mn(ClO ₄) ₂	29
CeCl ₃	34	NaCl	10
CsCl	10	NiCl ₂	14
CoCl ₂	49	NiSO ₄	23
CuCl	33	PdCl ₂	17
CuCl ₂	22	RhCl ₃	9
CuSO ₄	46	RuCl ₃	12
EuCl ₂	28	AgCl	7
Eu(OTf) ₃	70	Ag(OTf)	27
InCl ₃	54	Th(TFA)	18
In(OTf) ₃	76	Yb(OTf) ₃	71
FeCl ₂	49	ZnCl ₂	47
FeCl ₃	43	Zn(OTf) ₂	80
La(OTf) ₃	45	Pas de catalyseur	20

Ce criblage permet de distinguer quatre catalyseurs qui permettent un taux de conversion élevé (> 70 %) : Eu(OTf)₃, In(OTf)₃, Yb(OTf)₃ et Zn(OTf)₂. Nous avons donc choisi dans un premier temps d'utiliser le triflate d'ytterbium, déjà utilisé dans des conditions similaires.⁷ Une rapide optimisation partant des mêmes réactifs nous a permis de diminuer la charge catalytique à 5 mol% et la durée de réaction à 45 minutes, au bout de laquelle un palier de conversion est atteint. Notons cependant que – l'objectif étant de disposer d'un maximum d'analogues pour l'étude SAR – nous avons privilégié les critères de pureté des produits finaux et de mise en œuvre aisée des manipulations plutôt que le rendement. Nous avons ainsi défini une méthode générale de synthèse

parallèle (*Méthode A*) qui sera appliquée à la synthèse d'une grande partie des analogues de première génération :

- 1 équivalent d'aldéhyde, 1 équivalent de β-cétoester et 1,5 équivalent d'urée
- Absence de solvant
- Chauffage à 100 °C pendant 45 minutes
- Isolation par précipitation dans l'éthanol à froid (+ 4°C). Si nécessaire, une purification ultérieure par chromatographie sur gel de silice est réalisée.

b. Modification de B₄ et R₄

La diversification d'ITB₉ en B₄ et R₄ a été aisément réalisée en utilisant la méthode A. En effet, la réaction de Biginelli avec de nombreux aldéhydes commerciaux disponibles au laboratoire a permis d'accéder rapidement à une chimiothèque d'analogues variés. La condensation des divers aldéhydes est effectuée avec l'urée et le cétoester **C1**, synthétisé au préalable (Figure 35)⁸. Nous reviendrons plus en détail sur cette première étape de synthèse dans la partie III.3.c.

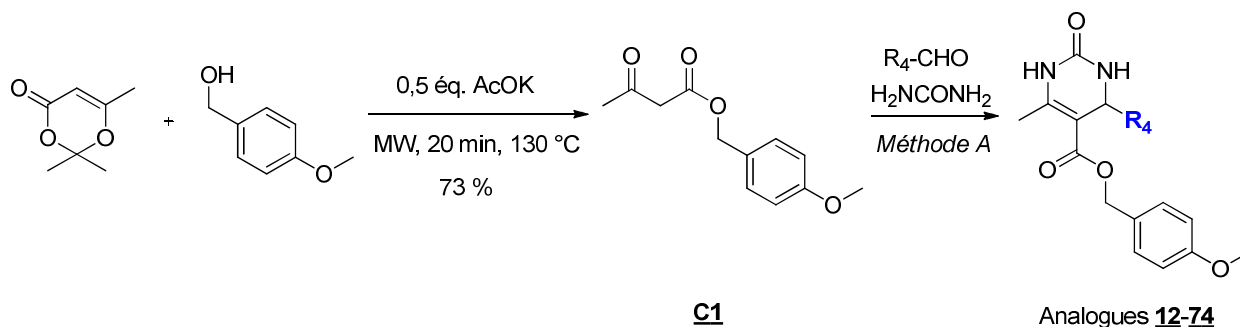


Figure 35 : Synthèse du cétoester **C1** et des analogues **12-74**

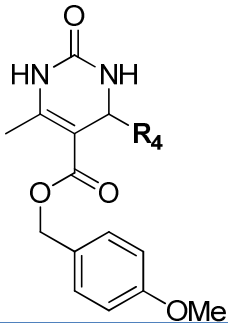
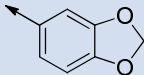
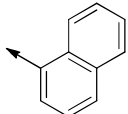
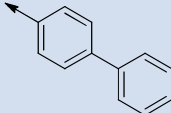
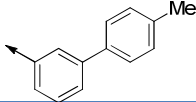
Par souci de clarté, nous présentons ici les analogues **12-74** en fonction de la famille chimique à laquelle appartient R₄.

i) Substitutions du cycle aromatique

La première série d'analogues est basée sur des benzaldéhydes diversement substitués (Tableau 6). ITB₉ est resynthétisé à cette occasion à partir du benzaldéhyde avec un rendement de 55 %. Les substituants sont :

- des halogènes à différentes positions (composés **12-22**)
- des groupes azotés divers (composés **23-26**)
- des groupes oxygénés de type acétoxy-, hydroxy-, méthoxy- ou benzyleoxy- éventuellement combinés (composés **27-42**)
- des combinaisons de substituants divers (composés **43-45**)
- des aromatiques (composés **46-48**)

Tableau 6 : Analogues d'ITB₉ modifiés en R₄, série "phényle substitué" 12-48

					
Code	R ₄	Rendement (%)	Code	R ₄	Rendement (%)
ITB₉	phényle	55	30	2-OMe-phényle	68
12	2-F-phényle	58	31	4-OMe-phényle	61
13	3-F-phényle	49	32	4-OAc-phényle	50
14	4-F-phényle	87	33	3-OBn-phényle	52
15	3-Cl-phényle	56	34	4-OBn-phényle	45
16	4-Cl-phényle	53	35	3,4-diOH-phényle	16
17	2-Br-phényle	38	36	3-OH-4-OMe-phényle	53
18	3-Br-phényle	61	37	3,5-diOMe-4-OH-phényle	47
19	4-Br-phényle	80	38	2,5-diOMe-phényle	56
20	2-I-phényle	45	39^a		63
21	3-Cl-4-F-phényle	69	40	2,4,5-triOMe-phényle	52
22	4-CF ₃ -phényle	38	41	3-OMe-4-OBn-phényle	51
23	4-NO ₂ -phényle	54	42	3,5-diOBn-phényle	36
24	3-CN-phényle	35	43	3-OH-4-NO ₂ -phényle	12
25	4-NHAc-phényle	59	44	2-OH-5-Br-phényle	29
26	4-N(Me) ₂ -phényle	21	45	2-NO ₂ -4,5-diOH-phényle	37
27	2-OH-phényle	38	46^a		48
28	3-OH-phényle	64	47^a		47
29	4-OH-phényle	56	48^a		34

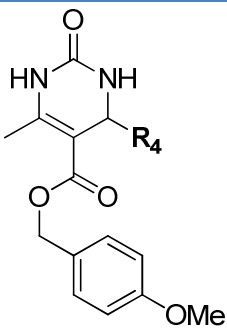
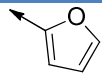
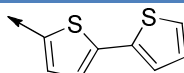
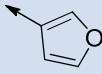
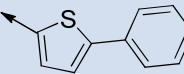
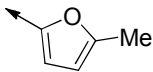
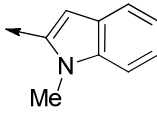
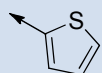
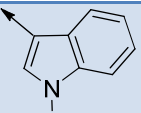
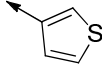
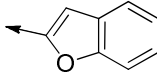
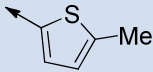

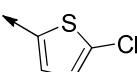
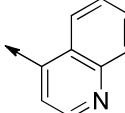
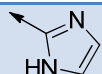
^a La flèche représente le point d'attache sur C₄.

On observe pour ces premiers résultats des rendements variables, qui ne sont pas uniquement dus à la réactivité intrinsèque de l'aldéhyde, mais plutôt par l'efficacité de l'isolement et donc la solubilité du produit final dans l'éthanol. Ce constat peut être reproduit dans toute la suite de ce chapitre.

ii) Remplacement par des hétérocycles

Nous avons ensuite tâché de remplacer le cycle phényle par des hétérocycles simples, à cinq (composés **49-56**) ou six (composé **62**) chaînons, ainsi que des composés bicycliques éventuellement fusionnés (composés **57-61** et **63**). Les analogues **49-63** ainsi synthétisés sont présentés dans le Tableau 7.

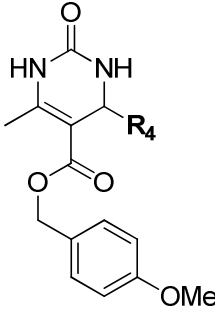
Tableau 7 : Analogues d'ITB₉ modifiés en R₄, série hétérocyclique 49-63. La flèche représente le point d'attache sur C₄.

					
Code	R ₄	Rendement (%)	Code	R ₄	Rendement (%)
49		40	57		18
50		72	58		10
51		52	59		12
52		59	60		20
53		70	61		27
54		56	62		19
55		34	63		20
56		18			

iii) Remplacement par des chaînes aliphatiques

Un certain nombre d'aldéhydes aliphatiques ont enfin permis d'accéder à la série d'analogues **64-69**, comportant des chaînes alkyles ou des cycles saturés de taille variable (Tableau 8). Dans cette série, on remarque que – à l'exception du dérivé cyclopropyle **67** – les rendements en produit isolé sont nettement inférieurs aux analogues aromatiques. Cette observation peut être expliquée par la moindre solubilité de ces derniers dans l'éthanol.

Tableau 8 : Analogues d'ITB₉ modifiés en R₄, **64** et série alkyle, **65-69**. La flèche représente le point d'attache sur C₄.

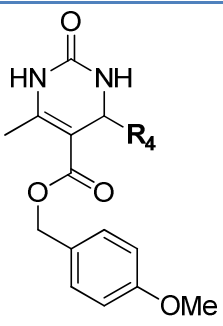
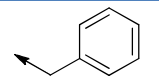
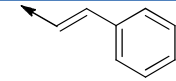
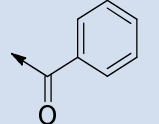
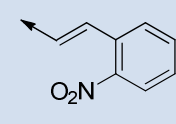
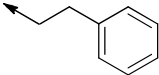
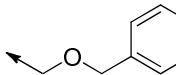
		
Code	R ₄	Rendement (%)
64	H	26
65	éthyle	13
66	<i>n</i> -pentyle	19
67	<i>c</i> -propyle	68
68	<i>c</i> -pentyle	18
69	<i>c</i> -hexyle	22

Notons que le composé **64** pour lequel R₄ = H est accessible en utilisant le paraformaldéhyde ou le 1,3,5-trioxane comme produit de départ. Les rendements obtenus sont toutefois légèrement supérieurs avec le paraformaldéhyde (26 % contre 20 % en moyenne).

iv) Longueur du bras B₄

Dans la tête de file ITB₉, le phényle en R₄ peut-être vu comme attaché en C₄ par un bras espaceur B₄ à 0 chaînon. Il nous a donc semblé pertinent de synthétiser une série permettant d'espacer l'aromatique avec des liens plus ou moins rigides, de 1 à 3 chaînons (Tableau 9).

Tableau 9 : Analogues d'ITB₉ modifiés en R₄, série B₄, 70-75. La flèche représente le point d'attache sur C₄.

					
Code	B ₄ -R ₄	Rendement (%)	Code	B ₄ -R ₄	Rendement (%)
<u>70</u>		22	<u>73</u>		24
<u>71</u>		13	<u>74</u>		14
<u>72</u>		13	<u>75</u>		66

c. Modification de B₅ et R₅

La diversification d'ITB₉ en B₅ et R₅ est accessible par deux méthodes « directes » : une estérification de l'acide DHPM-carboxylique avec divers alcools, ou une réaction de Biginelli avec différents β-cétoesters synthétisés au préalable (Figure 36).

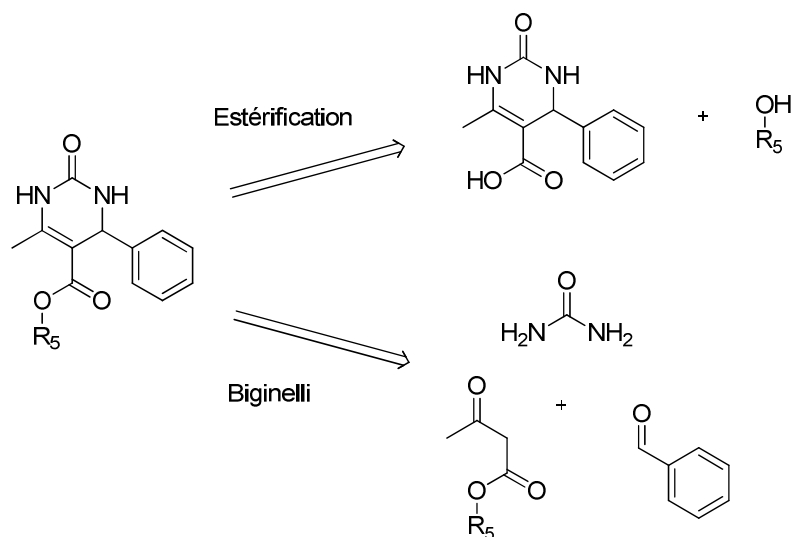


Figure 36 : Voies de rétrosynthèse des analogues d'ITB₉ modifiés en R₅

Dans un premier temps, nous avons donc synthétisé l'ester benzylique **76** selon la méthode A que nous avons mises au point en partie 2.a de ce chapitre, à partir de l'acétoacétate de benzyle

commercial. Le composé **76**, isolé avec un rendement de 88 %, subit ensuite une hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon pour fournir l'acide **77** avec un rendement de 79 % (Figure 37).

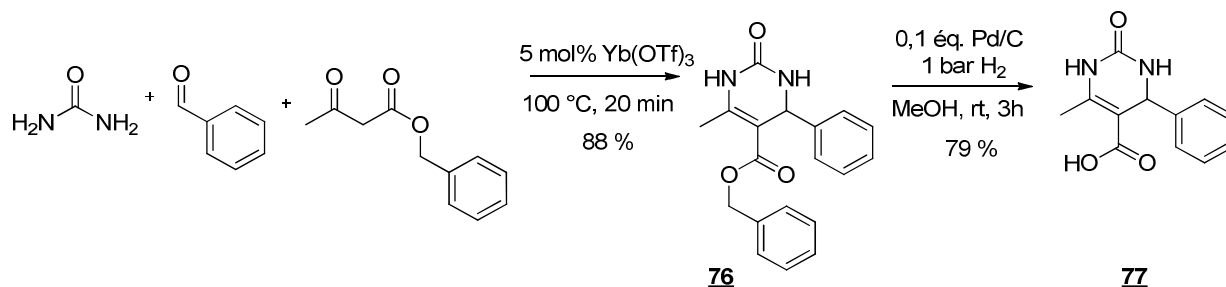


Figure 37 : Synthèse des composés **76** et **77**

Toutefois, si l'estérification nous paraissait une voie séduisante pour la synthèse parallèle, elle se heurte au problème majeur de la réactivité de l'acide **77**. En effet, outre sa faible solubilité dans les solvants organiques « classiques », les premiers essais de couplage avec des amines ou des alcools divers dans des conditions « dures »⁶ (DMA, microondes pendant plusieurs heures) conduisent au mieux à des rendements de l'ordre de 30 à 50 % après purification. Il nous a donc semblé plus judicieux de nous tourner vers la deuxième voie de synthèse, qui nécessite au préalable la synthèse des β -cétoesters intermédiaires. En effet, malgré la multiplication des étapes de synthèse (deux par analogue), les rendements élevés⁸ et les techniques de purification aisées nous ont paru justifier ce choix. En s'inspirant de la méthodologie publiée par Carlos Menendez & coll.⁸, nous avons donc fait réagir divers alcools au microondes, en présence d'un excès (1,3 équivalents) de 2,2,6-triméthyl-4H-1,3-dioxin-4-one - qui joue également le rôle de solvant - et de 0,5 équivalent d'acétate de potassium (Figure 38). Une purification du mélange réactionnel par chromatographie permet d'obtenir les cétoesters **C1-C25** avec des rendements excédant généralement 75 % (Tableau 10).

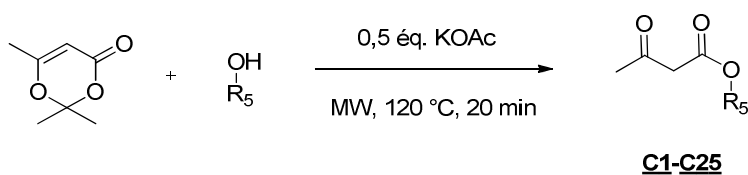


Figure 38 : Synthèse des cétoesters **C1-C25**

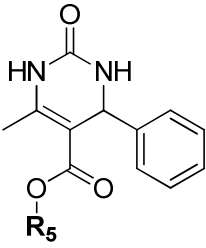
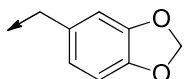
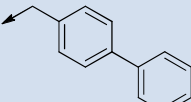
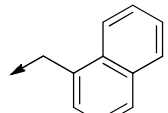
C1-C25 sont ensuite engagés dans une réaction de Biginelli avec l'urée et le benzaldéhyde selon la méthode A. De la même façon que précédemment, nous avons ainsi synthétisé plusieurs familles d'analogues :

i) Substitution du cycle aromatique

La première série a logiquement consisté à diversifier la substitution du cycle aromatique (Tableau 10). Outre l'ester benzylique **76** qui a été présenté auparavant, les analogues **78-90** sont

substitués avec des halogènes à différentes positions (**78-82**), divers groupes oxygénés (**85-88**) ou des aromatiques (**89-90**).

Tableau 10 : Analogues d'ITB₉ modifiés en R₅, série "phényle substitué", 78-90

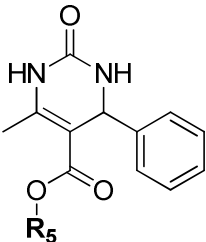
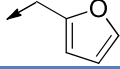
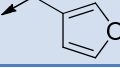
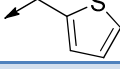
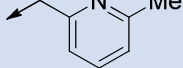
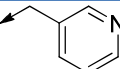
				
Code analogue	R ₅	Rendement en analogue (%)	Code cétoester	Rendement en cétoester (%)
78	4-F-benzyle	61	C2	56
79	2-Cl-benzyle	67	C3	79
80	4-Cl-benzyle	53	C4	81
81	4-Br-benzyle	56	C5	74
82	2-I-benzyle	61	C6	97
83	2-Me-benzyle	48	C7	86
84	2-OMe-benzyle	51	C8	89
85	3-OMe-benzyle	63	C9	87
86	3-OPh-benzyle	58	C10	84
87	3-OBn-benzyle	72	C11	75
88 ^a		54	C12	91
89 ^a		81	C13	93
90 ^a		70	C14	81

^a La flèche représente le point d'attache sur l'atome d'oxygène.

ii) Remplacement par des hétérocycles

Nous avons ensuite souhaité remplacer le noyau phényle par divers hétérocycles simples à 5 ou 6 chaînons. Les analogues **91-95** ont ainsi été synthétisés à partir des cétoesters **C15-C19** correspondants (Tableau 11).

Tableau 11 : Analogues d'ITB₉ modifiés en R₅, série hétérocyclique, 91-95. La flèche représente le point d'attache en Y.

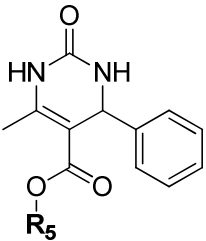

				
Code analogue	R ₅	Rendement en analogue (%)	Code cétoester	Rendement en cétoester (%)
<u>91</u>		51	<u>C15</u>	67
<u>92</u>		58	<u>C16</u>	78
<u>93</u>		29	<u>C17</u>	91
<u>94</u>		43	<u>C18</u>	28
<u>95</u>		56	<u>C19</u>	67

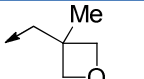
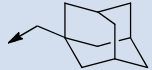
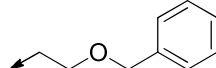
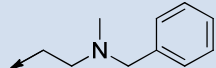
Précisons que la synthèse des cétoesters C15 et C16 a nécessité au préalable la synthèse du 2-furfuryl alcool et du 3-furfuryl alcool par réduction des aldéhydes correspondants en présence de NaBH₄.

iii) Autres analogues

Enfin, divers autres analogues d'ITB₉ ont été synthétisés (Tableau 12), à l'exception du composé 96, déjà synthétisé au préalable au laboratoire par Jan RECHO à partir de l'acétoacétate d'éthyle commercial.

Tableau 12 : Analogues d'ITB₉ modifiés en R₅ 96-101. La flèche représente le point d'attache en Y.

				
Code analogue	R ₅	Rendement en analogue (%)	Code cétoester	Rendement en cétoester (%)
<u>96</u>	éthyle			
<u>97</u>		42	<u>C20</u>	87

98		54	C21	77
99		76	C22	91
100		24	C23	26
101		55	C24	28

iv) Longueur du bras B₅

Par ailleurs, de la même façon que pour B₄, nous avons souhaité évaluer la taille optimale du bras espaceur B₅. Dans ITB₉, B₅ est un espaceur à un chaînon. Nous avons donc synthétisé les homologues à zéro (**102**) et deux (**103**) chaînons par des voies différentes (Figure 39) :

- **102** a été obtenu *via* un des essais d'estérification mentionnés en début de partie sur l'acide **77**. En présence de 2 équivalents de 4-méthoxyphénol, l'estérification de type Steglich avec **77** conduit à **102** avec un rendement isolé de 37 %.
- **103** a quant à lui été synthétisé de la même façon que les analogues **78** à **101**. Le cétoester **C25** est mis en réaction avec l'urée, le benzaldéhyde et 5 mol% de triflate d'ytterbium. Après filtration, **103** est isolé avec un rendement de 85 %.

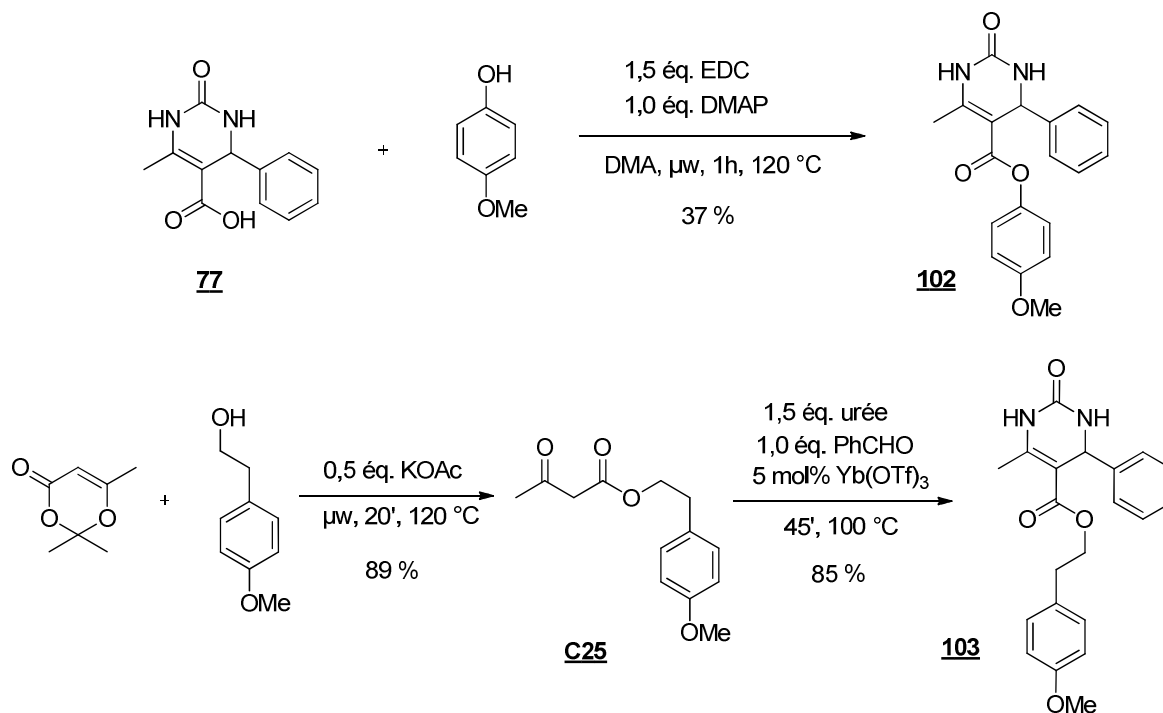


Figure 39 : Synthèse des analogues **102** et **103**

d. Modification de R₆

Afin de réaliser des analogues d'ITB₉ en B₆, nous avons cette fois choisi de synthétiser les cétoesters modifiés **C26-C35**, comme indiqué dans la Figure 40. La préparation de β-cétoesters de ce type est en effet largement documentée et se fait séquentiellement en deux étapes : une étape d'acylation de la 2,2-diméthyl-1,3-dioxane-4,6-dione (acide de Meldrum) par un acide carboxylique⁹, suivie d'une ouverture de l'intermédiaire par l'alcool 4-méthoxybenzylique dans des conditions microondes.¹⁰

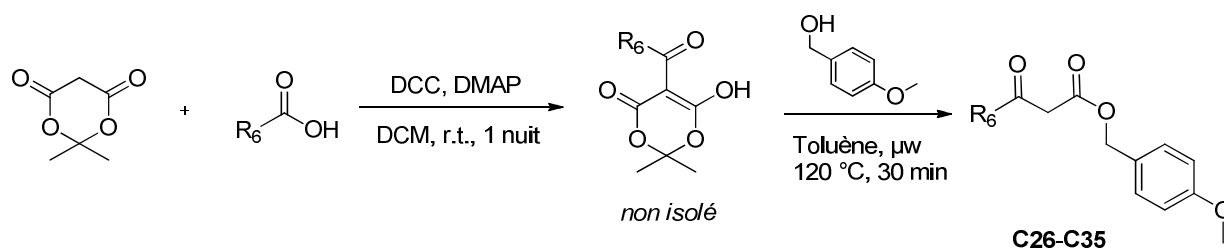
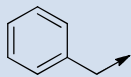
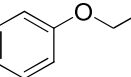
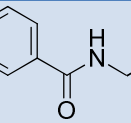
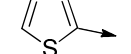
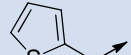


Figure 40 : Synthèse des cétoesters **C26-C35**

La première étape est quantitative dans la plupart des cas : une simple filtration de la DCU formée et un lavage acide permettent d'obtenir des bruts d'une pureté satisfaisante pour être directement engagés dans l'étape suivante : les intermédiaires acylés ne sont donc pas systématiquement isolés et caractérisés. Les β-cétoesters **C26-C35** sont ainsi obtenus avec des rendements satisfaisants en général, de l'ordre de 50 % à 75 % sur deux étapes. Par la suite, la réaction de Biginelli est effectuée dans les conditions optimisées avec l'urée, le benzaldéhyde et les cétoesters **C26-C35**, pour fournir les analogues **104** à **113** modifiés en R₆ (Tableau 13). En termes de diversité moléculaire, nous avons allongé la chaîne alkyle (composés **104-106**) et remplacé le méthyle par des cycles saturés (**107**) ou aromatiques (**108, 112**) éventuellement espacés du cycle DHPM (**109-111, 113**).

Tableau 13: Analogues d'ITB₉ modifiés en R₆ **104-113**

Code	R ₆	Rendement en analogue (%)	Code cétoester	Rendement en cétoester (%)
104	éthyle	66	C26	72
105	<i>i</i> -butyle	23	C27	66
106	<i>n</i> -pentyle	77	C28	70

107	c-hexyle	54	C29	65
108	phényle	44	C30	51
109^a		64	C31	66
110^a		23	C32	75
111^a		42	C33	50
112^a		10	C34	60
113^a		14	C35	62

^a La flèche représente le point d'attache en C₆.

e. Modification de R₁ et R₂

i) Substitution en R₁

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre I, les réactions de Biginelli impliquant une urée monoalkylée engendrent systématiquement une régiosélectivité en N₁. Nous avons donc tiré parti de cette sélectivité pour synthétiser une petite chimiothèque d'analogues diversifiés en R₁. Les urées mono-fonctionnalisées qui n'étaient pas disponibles au laboratoire (**U1-U6**) ont été obtenues au préalable par mono-fonctionnalisation de l'urée dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à reflux, avec des rendements de 38 % à 84 % (Figure 41).¹¹

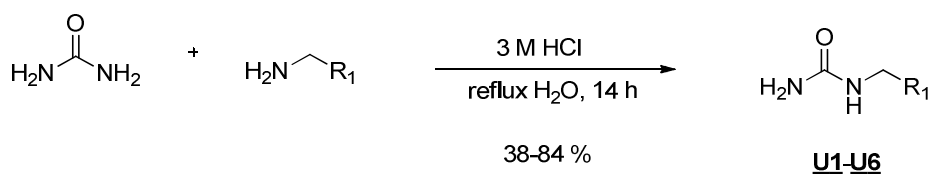
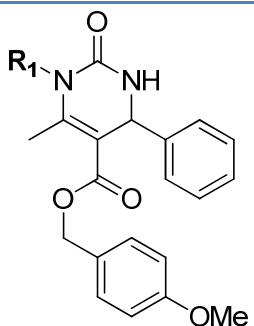
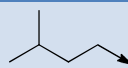
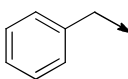
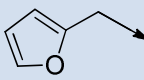
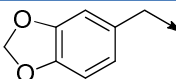
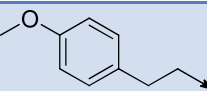
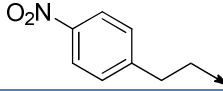
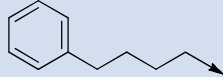


Figure 41 : Synthèse des urées mono-fonctionnalisées **U1-U6**

Ces urées ont ensuite été engagées dans des condensations de Biginelli avec le benzaldéhyde et le cétoester **C1** pour former les analogues **114-120** (Tableau 14). Cependant, nous avons été amenés à modifier les conditions opératoires pour cette série : en effet, les produits formés ne précipitent pas dans l'éthanol et la purification s'effectue alors par chromatographie sur gel de silice. Par ailleurs, les essais d'optimisation effectués avec la monométhylurée nous ont permis de définir une *Méthode B* : en présence de 10 % de triflate de zinc Zn(OTf)₂ et à reflux de l'acétonitrile, **114** est isolé avec un rendement de 71 %. Malgré le faible nombre de molécules synthétisées, nous avons encore une fois tâché de balayer la diversité moléculaire en substituant N₁ avec des chaînes alkyle, des hétérocycles et des aromatiques plus ou moins espacés du cycle DHPM.

Tableau 14 : Analogues d'ITB9, modifiés en R₁ 114-120. La flèche représente le point d'attache sur N₁.

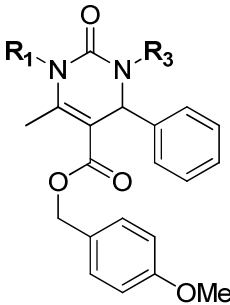
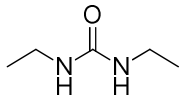
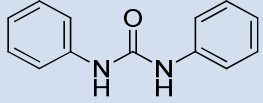
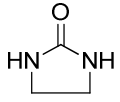
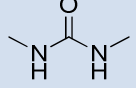
				
Code analogue	R ₁	Rendement en analogue (%)	Code urée	Rendement en urée (%)
<u>114</u>	Me →	71	Commerciale	
<u>115</u>		7	<u>U1</u>	38
<u>116</u>		26	Commerciale	
		Produit non observé	<u>U2</u>	38
<u>117</u>		3	<u>U3</u>	84
<u>118</u>		14	<u>U4</u>	57
<u>119</u>		1	<u>U5</u>	84
<u>120</u>		15	<u>U6</u>	60

Dans le cas des analogues 115-120, les faibles rendements sont dus à la fois à la présence de nombreux produits secondaires ou de dégradation, et des purifications en HPLC. Toutefois, une fois les analogues isolés, nous n'avons pas souhaité poursuivre l'optimisation de ces rendements.

ii) Substitution en R₃

La substitution en R₃ nécessitant au préalable la protection de la position N₁, nous avons dans un premier temps effectué la réaction de Biginelli avec des urées disubstituées symétriques commerciales, afin d'obtenir des analogues modifiés simultanément en R₁ et R₃ (Tableau 15). Cependant, la faible réactivité de ces espèces, à l'exception de la diméthylurée, n'a permis d'isoler qu'un seul analogue 121. La synthèse d'analogues monofonctionnalisés en R₃ n'a en revanche pas été entreprise.

Tableau 15 : Analogues d'**ITB₉** modifiés en R₁ et R₃

		
Code analogue	Urée	Rendement en analogue (%)
		Traces, non isolé
		Produit non observé
		Produit non observé
121		35 %

f. Autres analogues

i) Modifications du cycle DHPM

Les parties précédentes ont permis de modifier les parties « périphériques » d'**ITB₉**. Toujours dans l'optique de réaliser une étude structure-activité aussi complète que possible, sous contraintes d'une accessibilité synthétique, nous avons synthétisé deux analogues supplémentaires (**122**, **123**) en modifiant la configuration du « cœur » moléculaire (Figure 42) :

- Dans **122**, la double liaison C₅-C₆ est déplacée en C₄-C₅. Cet analogue « inversé » est obtenu par réaction de Biginelli entre l'urée, l'acétaldéhyde et le cétoester **C30** déjà synthétisé précédemment. En utilisant la méthode à l'ytterbium, nous avons isolé **122** avec un rendement de 36 %. Cette modification est importante car le déplacement de la double liaison déplace la chiralité de C₄ (portant un phényle dans **ITB₉**) à C₆ (portant un méthyle). La géométrie spatiale de **122** doit donc être assez différente de celle d'**ITB₉**.
- Dans **123**, le cycle dihydropyrimidinone a été totalement oxydé en 2-hydroxypyrimidine grâce à de l'hydroperoxyde de *tert*-butyle en présence de chlorure de cuivre (II) et de carbonate de potassium¹². Obtenu avec un rendement de 54 %, le composé **123** présente

également des modifications structurales importantes par rapport à **ITB9** : l'oxygène porté par C₂ devient donneur de liaisons hydrogène, et la résonance entre le phényle, la pyrimidine et l'ester entraîne une coplanarité de l'ensemble. Par ailleurs, le centre chiral en C₄ est supprimé.

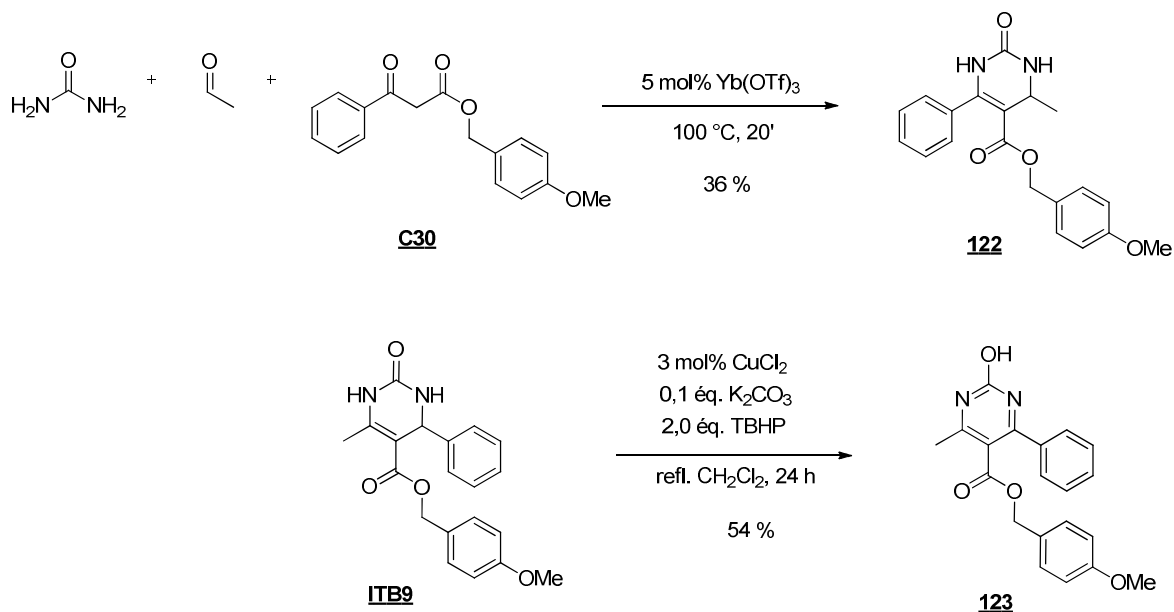


Figure 42 : Synthèse des composés **122** et **123**

ii) Modification des hétéroatomes X et Y

En se basant sur des considérations de bioisostérisme, il nous a paru intéressant d'échanger les hétéroatomes avec leurs équivalents : O \leftrightarrow S \leftrightarrow NH. Nous nous sommes toutefois limités aux deux analogues Y = NH (**124**) et X = S (**125**) qui nous paraissaient dans un premier temps les plus pertinents (Figure 43).

- L'amide **124** a été obtenu par couplage de type peptidique entre l'acide carboxylique **77** – déjà synthétisé au préalable – et la 4-méthoxybenzylamine, en présence d'EDC et de DIEA dans des conditions microondes. **124** est ainsi isolé avec un rendement de 59 %. Notons que ce composé pourrait aussi être synthétisé *via* le β -cétamide correspondant, comme les composés **78-101.8**
- La thiourée **125** a été obtenue en trois étapes : à partir de l'acétoacétate d'allyle commercial, le composé **126** est synthétisé avec un rendement de 52 % dans les conditions opératoires originales de Biginelli (HCl conc./MeOH)¹³ ; puis, une déprotection en présence de palladium 06 permet d'obtenir l'acide **127**, puis **125** par estérification de type Steglich avec l'alcool 4-méthoxybenzylique.

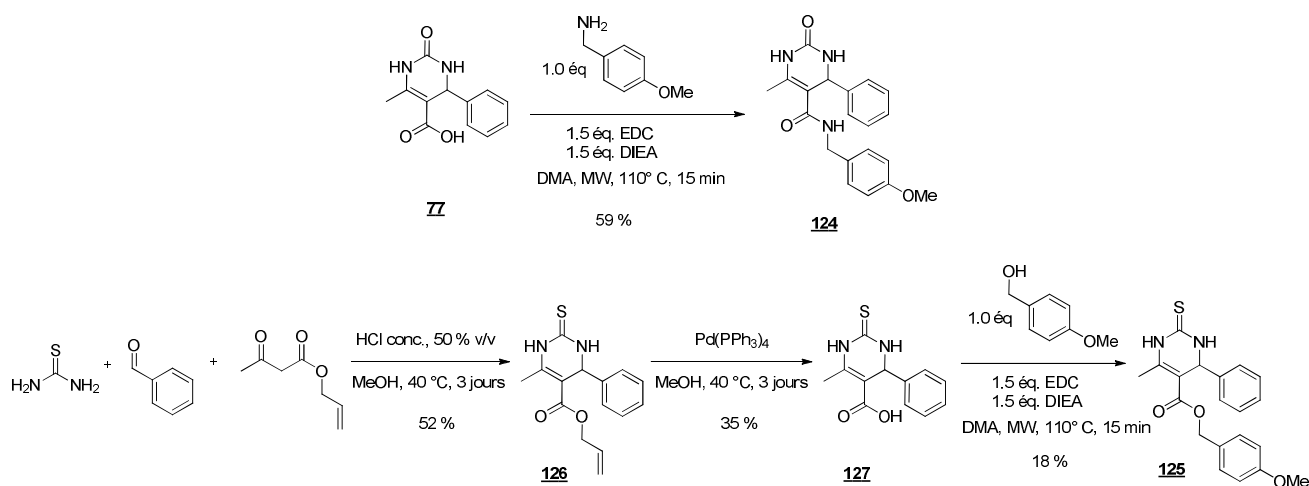


Figure 43 : Synthèse des analogues d'**ITB₉** **124** et **125**

g. Conclusion

Dans cette partie, nous avons donc défini deux méthodes (A et B) qui nous ont permis de synthétiser une petite chimiothèque de 111 analogues d'**ITB₉** « de première génération » possédant chacun un seul point de diversification par rapport à la structure de la tête de file. Notons qu'à l'exception de 5 dérivés parmi les plus simples, aucun d'entre eux n'est décrit dans la littérature à l'heure actuelle. Dans la partie suivante, l'évaluation biologique de ces nouveaux composés permettra de constituer un ensemble de relations structure-activité afin d'optimiser l'activité biologique de cette famille.

3. Détermination des relations structure-activité

Tout au long de cette partie, le pouvoir inhibiteur du transport de l'iode des composés synthétisés dans la partie précédente est évalué dans un test *in cellulo* sur cellules FRTL-5. Les cellules FRTL-5 sont une lignée de thyrocytes de rat Fisher décrites en 1979 par Ambesi-Impiombato & al.¹⁴ Ces cellules folliculaires ont la particularité de ne pas adopter la structure circulaire du follicule thyroïdien mais de former un tapis homogène. Outre les principales caractéristiques physiologiques et fonctionnelles qu'elles partagent avec les thyrocytes « naturels », elles sont sensibles à la TSH et l'accumulation d'iode est dépendante du gradient de sodium et inhibée par le perchlorate¹⁵. Par ailleurs, elles sont dépourvues d'activité d'organification de l'iode par la TPO.

a. Principe du test d'incorporation d'iodures dans les cellules FRTL-5

Le test utilisé - mis au point au laboratoire par le Dr. Waltz¹⁶ - permet de s'affranchir de l'iode ¹²⁵I, qui était utilisé auparavant dans le test RAIU (*Radioactive Iodine Uptake*) et qui a notamment conduit à l'identification des **ITB**.¹⁷ Brièvement, le test à l'iode froid repose sur la quantification de l'iodure incorporé par les cellules au moyen de la réaction de Sandell-Kolthoff¹⁸; cette dernière est une réaction d'oxydo-réduction entre le Ce (IV) et l'As (III), catalysée par les ions iodure et largement utilisée pour le dosage des iodures dans les urines¹⁹. Les ions cériques Ce⁴⁺ absorbant à 420 nm, il a été déterminé que le logarithme de l'absorbance à 420 nm était proportionnel à la concentration d'iodures dans le milieu (Figure 44).

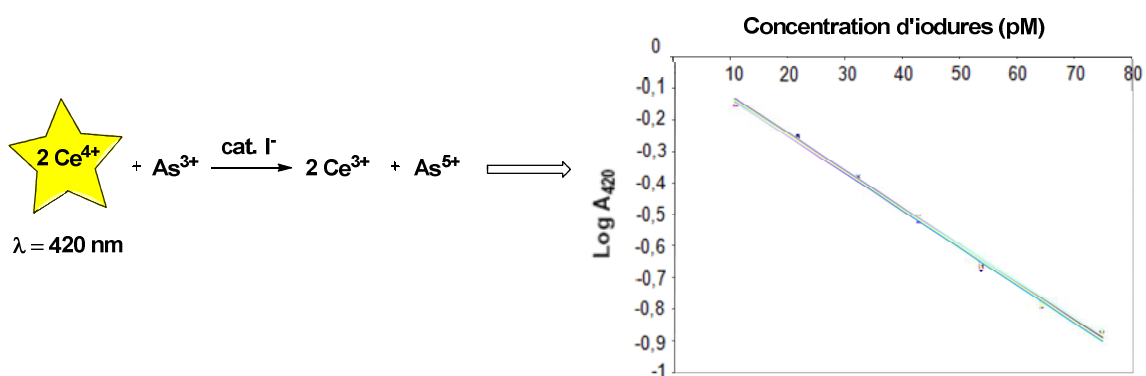


Figure 44 : Principe du test à l'iode froid basé sur la réaction de Sandell-Kolthoff

Le test est effectué sur cellules FRTL-5, en microplaques 96 puits, en utilisant **ITB₉** et le perchlorate de sodium comme contrôles positifs. Après dosage spectrophotométrique, on obtient ainsi pour chaque composé un graphique de la quantité d'iodures incorporé par les cellules en fonction de la concentration de composé inhibiteur (Figure 45). Les demi-concentrations inhibitrices (IC₅₀) sont ainsi déterminées par régression non-linéaire de la courbe expérimentale sur l'équation de Hill. La procédure détaillée du test est rappelée en partie expérimentale à la fin de ce manuscrit.

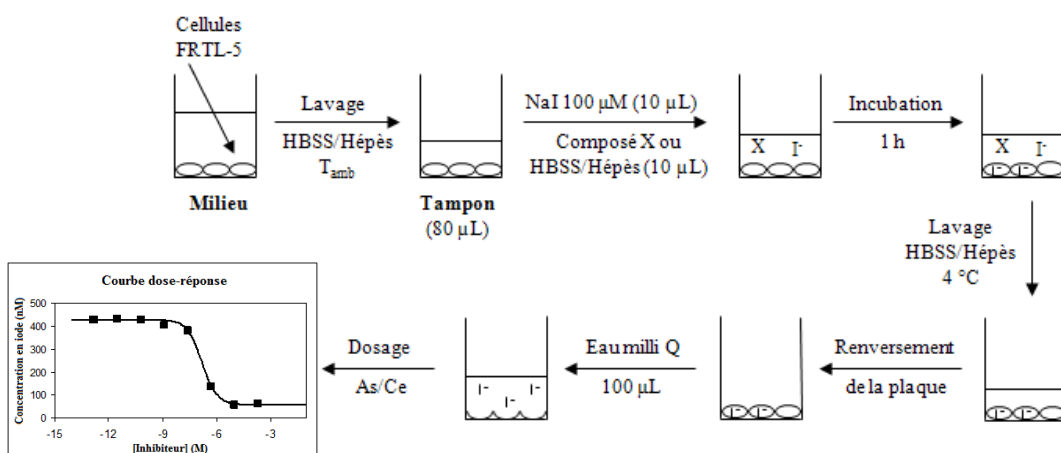


Figure 45 : Principe du test d'incorporation d'iodures par les cellules FRTL-5

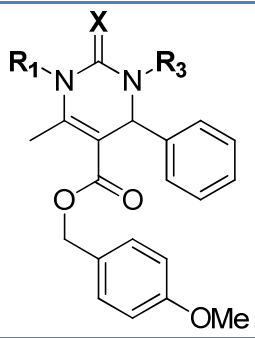
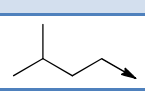
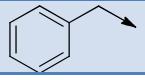
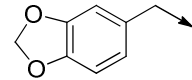
Les composés sont testés au moins en duplicata et les IC₅₀ présentés sont des moyennes des différentes valeurs ; ces dernières ne sont retenues que lorsque l'IC₅₀ des contrôles positifs **ITB₉** et ClO₄⁻ étaient respectivement de 0,08 ± 0,04 μM et 0,05 ± 0,02 μM. Enfin, tous les composés seront testés sous forme de racémique. En effet, il faut souligner que – malgré l'existence de méthodes de synthèse énantiosélective de DHPM exposées dans le chapitre I – cette voie a été repoussée pour deux raisons :

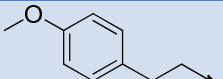
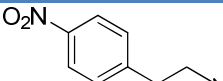
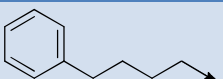
- La complexité de mise en œuvre, qui nécessite l'utilisation de ligands chiraux complexes, peu accessibles et des conditions de synthèse et de purification difficilement transposables à la synthèse parallèle, compte tenu des nombreux points de diversité que nous souhaitons introduire.
- Des excès énantiomériques variables, qui dépendent des substrats utilisés. Dans notre cas, les tests biologiques entre composés doivent pouvoir être comparables. C'est pourquoi la synthèse en série racémique est justifiée *a posteriori*.

b. Partie Nord

Les résultats concernant les analogues d'**ITB₉** comportant des modifications sur la partie Nord (R₁, R₃ et X) ont été évalués et les résultats ont été rassemblés dans le Tableau 16 :

Tableau 16 : IC₅₀ des analogues d'**ITB₉** modifiés sur la partie Nord, [114-121](#) et [125](#)

				
Code	R ₁	R ₃	X	IC ₅₀ (μM)
ITB₉	H	H	O	0,089
114	Me	H	O	0,075
115		H	O	0,55
116		H	O	10
117		H	O	8,7

118		H	O	1,3
119		H	O	1,0
120		H	O	2,0
121	Me	Me	O	0,065
125	H	H	S	0,095

Plusieurs observations peuvent être établies à partir de ces données expérimentales :

- La simple méthylation de N₁ est neutre en termes d'activité (IC₅₀ **[114]** = 0,075 μM). Nous reviendrons plus tard sur ce résultat au regard des analogues « de seconde génération ». L'allongement de la chaîne alkyle diminue l'activité (**115**) et l'on peut raisonnablement supposer que la tendance évolue avec la longueur de la chaîne alkyle.
- La substitution de N₁ avec des groupements aromatiques en position benzylique est délétère. L'activité diminue d'un facteur 100 environ (**116** et **117**). En revanche, l'espacement du groupe aromatique avec un espaceur de 2 à 4 chaînons fait perdre « seulement » un facteur 10, indépendamment de la substitution de celui-ci (**118** à **120**). Nous pouvons donc supposer que – sous réserve d'un espacement suffisant de l'azote N₁ – cette position est peu sensible aux modifications structurales.
- La substitution de l'azote N₃ a été peu étudiée du fait des difficultés d'accès synthétique. Il n'a donc pas été possible dans cette étude d'analyser précisément l'effet de la substitution sur cet atome seul. Toutefois, il apparaît que la méthylation simultanée de N₁ et N₃ confère un léger gain d'activité biologique (IC₅₀ **[121]** = 0,065 μM).
- Enfin, le remplacement de l'atome d'oxygène par un atome de soufre ne modifie pas l'activité (IC₅₀ **[125]** = 0,095 μM).

Toutefois, compte tenu de la nature du test (mesure d'un IC₅₀ *in cellulo*) et du fait que la cible protéique est inconnue, nous ne pouvons pas tirer de conclusions formelles plus poussées à partir de ces observations. En effet, l'activité observée résulte de plusieurs facteurs, dont l'affinité intrinsèque de l'inhibiteur pour sa cible, mais aussi de paramètres pharmacocinétiques du composé (passage des membranes...).

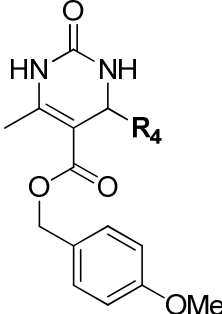
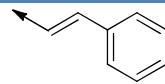
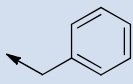
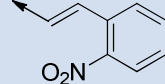
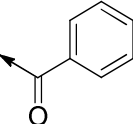
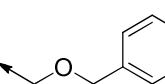
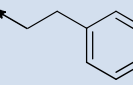
c. Partie Est

De la même façon, les IC₅₀ des analogues d'ITB₉ comportant des modifications sur la partie Est (B₄ / R₄) ont été mesurés. Pour en faciliter l'interprétation, les résultats sont présentés par familles chimiques.

i) Longueur du bras B₄

Les résultats biologiques de la série « variation de B₄ » (Tableau 17) indiquent très clairement que la longueur optimale de B₄ est de 0. On observe également une perte d'activité proportionnelle à l'éloignement du cycle aromatique et du cycle DHPM.

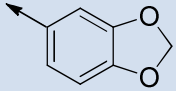
Tableau 17 : IC₅₀ des composés 70 – 75, comportant des variations de B₄.

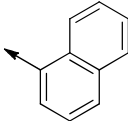
					
Code	B ₄ -R ₄	IC ₅₀ (μM)	Code	B ₄ -R ₄	IC ₅₀ (μM)
ITB ₉	Phényle	0,089	73		55
70		4	74		13,5
71		6	75		75
72		25			

ii) Résultats en série « phényle substitué »

Afin d'examiner l'effet de la substitution sur le cycle phényle, nous avons regroupé dans le Tableau 18 les composés 12 – 48. Dans cette série, R₄ est donc un noyau phényle diversement substitué : seules la nature et la position des substituants sont indiquées afin de comparer les évolutions d'activité dans les séries d'homologues.

Tableau 18 : IC₅₀ des composés 12-48, sur lesquels B₄ = 0 et R₄ est un phényle substitué. La position (1 désignant le point d'attache au cycle DHPM) et la nature du substituant sont alors indiquées.

Code	Position	Substituant	IC ₅₀ (μM)	Code	Position	Substituant	IC ₅₀ (μM)
ITB₉			0,089	30	2	OMe	20
12	2	F	0,065	31	4	OMe	50
13	3	F	0,075	32	4	OAc	2,5
14	4	F	0,15	33	3	OBn	70
15	3	Cl	0,10	34	4	OBn	90
16	4	Cl	13,5	35	3 4	OH OH	65
17	2	Br	8,5	36	3 4	OH OMe	12,5
18	3	Br	0,35	37	3 4 5	OMe OH OMe	20
19	4	Br	35	38	2 5	OMe OMe	40
20	2	I	3,5	39			25
21	3 4	Cl F	20	40	2 4 5	OMe OMe OMe	40
22	4	CF ₃	65	41	3 4	OMe OBn	20
23	4	NO ₂	25	42	3 5	OBn OBn	10
24	3	CN	6,5	43	3 4	OH NO ₂	10
25	4	NHAc	30	44	2 5	OH Br	25
26	4	N(Me) ₂	25	45	2 4 5	NO ₂ OH OH	85

<u>27</u>	2	OH	55	<u>46</u>			5,5
<u>28</u>	3	OH	5	<u>47</u>	4	Ph	> 100
<u>29</u>	4	OH	13	<u>48</u>	3	<i>p</i> -Tol	20

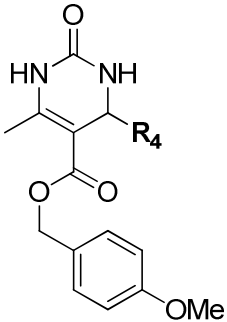

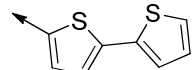

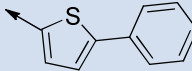
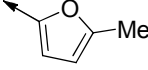
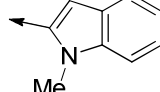

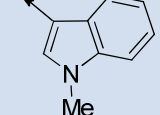

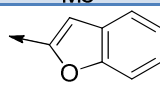
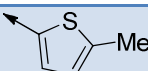

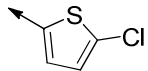
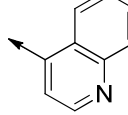

Malgré la riche diversification apportée en ce point, une rapide observation des résultats montre que ce fragment est sans doute essentiel à l'activité biologique ; en effet, la large gamme d'activités biologiques (de 0,065 μ M pour **12** à une totale inactivité pour **47**) en fonction de la substitution du cycle aromatique laisse supposer que cette position est un site-clé de reconnaissance de l'inhibiteur par sa cible. A présent, si l'on observe plus précisément les résultats, on peut dégager les tendances suivantes :

- La substitution par des atomes de fluor ne modifie que peu l'activité (**12-14**) par rapport à **ITB₉**.
- Pour les autres halogènes, seule la substitution en position 3 permet de conserver une activité satisfaisante (**15, 18**). Toutefois, ce résultat manque de cohérence avec le dérivé 3-cyano (**24**) dont l'IC₅₀ a été évalué à 6,5 μ M.
- De manière générale, la substitution en position 4 (**16, 19, 22-24, 25-26** et **47**) ou par des groupements oxygénés divers (**27-42**) entraîne une perte d'activité importante.
- Enfin, divers autres groupements (**43-46** et **48**) n'ont pas permis de restaurer un niveau d'activité satisfaisant.

iii) Résultats en série hétérocyclique

Les résultats de la série hétérocyclique, où le phényle d'**ITB₉** a été remplacé par divers hétérocycles simples ou multiples, sont rassemblés dans le Tableau 19.

Tableau 19 : IC₅₀ des composés 49-63, où R₄ est hétérocyclique

					
Code	R ₄	IC ₅₀ (μM)	Code	R ₄	IC ₅₀ (μM)
<u>49</u>		0,0032	<u>57</u>		25
<u>50</u>		0,02	<u>58</u>		50
<u>51</u>		0,09	<u>59</u>		> 100
<u>52</u>		0,05	<u>60</u>		85
<u>53</u>		0,04	<u>61</u>		27
<u>54</u>		10	<u>62</u>		19
<u>55</u>		1	<u>63</u>		20
<u>56</u>		25			

Ici encore, la large variabilité des activités biologiques confirme la sensibilité de cette position en fonction des groupements introduits. En première approche, on constate que les hétérocycles azotés simples (56, 62) et tous les bicycles – qu'ils soient fusionnés ou non (57-61 et 63) – entraînent une forte chute d'activité par rapport à la tête de file, d'un facteur 300 au minimum. Remarquons que – dans le cas des hétérocycles simples azotés – la protonation de ces espèces en milieu physiologique peut en partie expliquer cette observation.

En ce qui concerne les hétérocycles simples oxygénés (49-51), on observe une activité égale ou améliorée par rapport à la tête de file. De façon assez remarquable, le composé 49 montre même une activité évaluée à 3,2 nM, soit une augmentation d'un facteur 30 environ. De façon similaire, les analogues comportant un thiophène nu (52, 53) ont des IC₅₀ respectifs de 50 nM et 40 nM. En revanche, pour le composé 54, et contrairement à son homologue 51, l'introduction d'un groupe

méthyle en position 3 entraîne une chute d'activité d'un facteur 200. Nous émettons l'hypothèse qu'en raison du volume atomique plus important du soufre par rapport à l'oxygène, l'orientation du groupe méthyle de **54** est différente de **51** et est équivalente à celle d'un groupe *p*-tolyle (Figure 46).^{20,21} Or, nous avons vu dans la partie précédente que l'introduction de substituants en position *para* du noyau phényle était néfaste pour l'activité biologique.

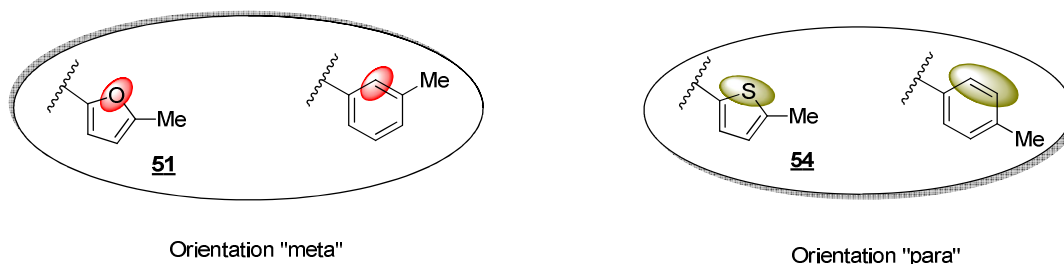
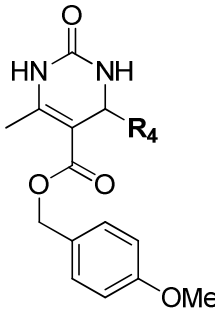


Figure 46 : Comparaison de l'orientation du groupe méthyle dans les composés **51** et **54**. En termes de volume atomique, l'atome d'oxygène est équivalent à un atome de carbone tandis que l'atome de soufre est plus proche d'un groupe éthylène.

iv) Résultats en série aliphatique

En série aliphatique, l'évaluation de l'activité biologique des composés **64** à **69** a été réalisée (Tableau 20). On observe que, dans le cas extrême où $R_4 = H$, le composé **64** est totalement inactif. En revanche, le remplacement du noyau phényle par d'autres chaînes alkyle se traduit par une perte d'activité d'un facteur 30 à 90, à l'exception surprenante du groupe cyclopropyle (**67**) qui confère un IC_{50} de 0,75 μM .

Tableau 20 : IC_{50} des composés **64-69**.

		
Code	R_4	IC_{50} (μM)
64	H	inactif
65	éthyl	8
66	<i>n</i> -pentyl	5
67	<i>c</i> -propyl	0,75
68	<i>c</i> -pentyl	7,5
69	<i>c</i> -hexyl	3

v) Conclusion de la SAR pour la partie Est

La partie Est est donc très sensible à la nature et à l'encombrement des substituants. En particulier, la substitution du noyau aromatique par des halogènes en position *meta* permet de conserver l'activité. Enfin, le remplacement par des hétérocycles à 5 chaînons non substitués, de type furane ou thiophène, permet d'augmenter l'activité jusqu'à un facteur 30 environ.

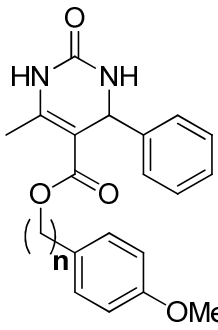
d. Partie Sud

Dans cette partie, nous avons étudié seulement l'influence de la nature de R₅ et B₅. L'importance de l'hétéroatome Y et plus généralement de la fonction ester sur l'activité biologique sera analysée ultérieurement.

i) Longueur du bras B₅

Le Tableau 21 présente les résultats biologiques des analogues permettant de discuter de la taille optimale du bras espaceur B₅. Les résultats biologiques montrent clairement que la taille optimale est de un chaînon carboné.

Tableau 21 : IC₅₀ des analogues d'ITB₉ modifiés en B₅, 102-103



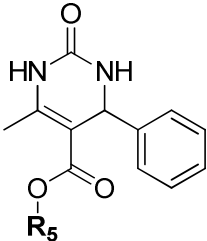
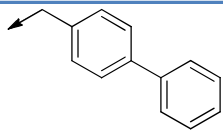
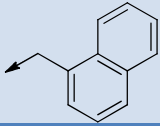
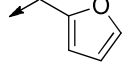
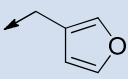
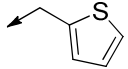
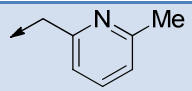
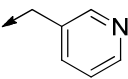
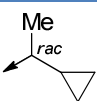

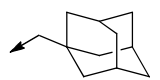
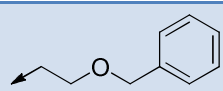
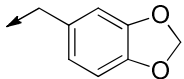
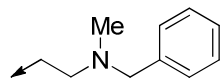
Code	Taille de B ₅	IC ₅₀ (μM)
102	0	> 100
ITB₉	1	0,089
103	2	20

ii) Influence de la nature de R₅

Les mesures d'IC₅₀ des analogues en série R₅ sont rassemblées dans le Tableau 22. Dans un premier temps, la substitution du cycle aromatique a été diversifiée. Les résultats biologiques indiquent que la substitution par des « petits » groupes (hydrogène, halogènes, méthyle) n'entraînent qu'une faible diminution de l'activité (d'un facteur inférieur à 10, composés **78-83**). Ce

phénomène est relativement indépendant de la position sur le cycle et l'analogue benzyle lui-même (**76**) possède un IC₅₀ légèrement supérieur à celui d'ITB₉.

Tableau 22 : IC₅₀ des analogues d'ITB₉ en série R₅, composés **76** et **78** à **101**

					
Code	Substitution en R ₅	IC ₅₀ (μM)	Code	Substitution en R ₄	IC ₅₀ (μM)
ITB₉	4-OMe-benzyle	0,089	89		45
76	benzyle	0,19	90		19
78	4-F-benzyle	0,2	91		0,9
79	2-Cl-benzyle	0,35	92		1
80	4-Cl-benzyle	0,3	93		0,4
81	4-Br-benzyle	0,4	94		5,5
82	2-I-benzyle	0,9	95		13,5
83	2-Me-benzyle	0,25	96	Éthyle	> 100
84	2-OMe-benzyle	0,6	97		2
85	3-OMe-benzyle	0,05	98		35
86	3-OPh-benzyle	7,5	99		> 100
87	3-OBn-benzyle	1,4	100		2,5
88		0,08	101		> 100

L'introduction de substituants oxygénés (**84-88**) a donné des résultats plus variés :

- La série méthoxylée (**ITB₉**, **84**, **85**) montre que les positions *meta* et *para* sont plus favorables à cette substitution. Ceci est confirmé par l'analogue pipéronyle qui conserve également une très bonne activité (**88**). **ITB₉**, **85** et **88** sont d'ailleurs les meilleurs inhibiteurs que nous ayons obtenus dans la série R₅.
- En revanche, la substitution de la position 3 par des groupements oxygénés encombrants (**86** et **87**) se traduit immédiatement par une chute d'activité (respectivement d'un facteur 150 et 28 par rapport au dérivé méthoxy- **85**). On observe également que le passage du phénoxy- au benzyloxy- se traduit par un regain d'activité. Nous supposons donc que la présence d'un atome d'oxygène suivi d'un bras espaceur à plus de 1 chaînon permet d'espacer suffisamment un groupe encombrant comme le noyau phényle. Des analogues de ce type n'ont toutefois pas été synthétisés pour confirmer cette hypothèse.
- Le remplacement par des aryles (composés **89-90**) ou des alkyles divers (composés **96-101**) se traduit dans tous les cas par une diminution marquée de l'activité. On remarque notamment que le fragment éthyle – fréquemment rencontré dans les dérivés décrits dans la littérature, y compris le monastrol – entraîne une perte totale d'activité (IC₅₀ **96** > 100 μM). Notons que le monastrol avait été testé en RAIU par le Dr. Lecat-Guillet et s'était révélé inactif.
- Enfin, le remplacement par des hétérocycles aromatiques divers, à 5 ou 6 chaînons n'a pas permis d'améliorer l'activité (composés **91-95**). En particulier, l'introduction d'un noyau pyridine possédant des propriétés acido-basiques se traduit par une chute notable de l'activité (**94** et **95**).

En résumé, le fragment portant l'activité en R₅ est de préférence un noyau benzylique substitué en positions 3 ou 4 par un groupe méthoxy, ou en positions 3 et 4 par un groupe méthylènedioxy-.

e. Partie Ouest

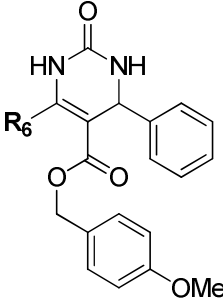
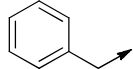
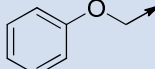
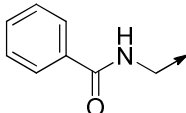
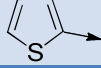
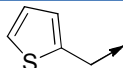
Les résultats des tests d'incorporation d'iode pour les analogues modifiés en R₆ (composés **104-113**) sont regroupés dans le Tableau 23. On peut en tirer les conclusions suivantes :

- La substitution par des petites chaînes de type alkyle reste nécessaire à cette position. Le composé **104** (R₆ = Et) possède une activité équivalente à celle d'**ITB₉** (R₆ = Me), et tous deux restent les produits les plus actifs de cette série. En revanche, l'augmentation de la longueur de la chaîne (**105** et **106**) entraîne une baisse modérée de l'activité biologique, d'un facteur 4 à 15.
- De la même façon, lorsque le groupement méthyle est remplacé par un groupement cyclohexyle (**107**), l'activité diminue dans des proportions similaires. Il est toutefois surprenant de constater que les analogues **107** et **108** ont une activité sensiblement

identique. En effet, même si la position R₆ se révèle peu sensible à l'encombrement stérique, le passage à l'analogue aromatique (**108**) devrait modifier les propriétés électroniques et géométriques du cycle principal – et influencer ainsi indirectement l'activité. Nous constatons qu'il n'en est rien. De même, le remplacement du phényle par un noyau thiophène, son bioisostère le plus direct, n'influence pas sensiblement l'activité (**112**).

- Enfin, nous avons tenté d'espacer le cycle aromatique par divers bras espaceurs à 1 (**109**, **113**), 2 (**110**) ou 3 (**111**) chaînons. Toutefois, aucune tendance nette ne se dégage, les activités biologiques des différents composés restant très proches les unes des autres. On peut en déduire que cette position est peu sensible et ne doit pas jouer un rôle important pour l'activité inhibitrice.

Tableau 23 : IC₅₀ des analogues d'ITB₉ modifiés en R₆, composés 104-113

					
Code	Substitution en R ₆	IC ₅₀ (μM)	Code	Substitution en	IC ₅₀ (μM)
ITB₉	méthyle	0.089	109		0.25
104	éthyle	0.07	110		0.5
105	<i>i</i> -butyle	0.55	111		1.20
106	<i>n</i> -pentyle	0.35	112		0.55
107	<i>c</i> -hexyle	0.85	113		0.15
108	phényle	0.95			

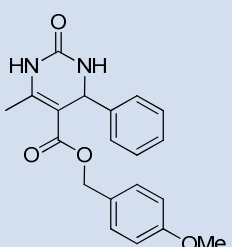
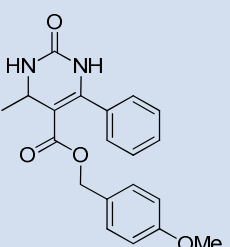
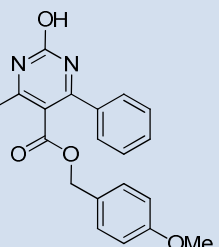
La position C₆ tolère donc une grande variabilité de substituants sans que l'activité biologique n'en soit trop affectée. Des chaînes alkyles courtes apparaissent comme groupes préférentiels à cette position (composés **ITB₉** et **104**). Au vu de la différence d'accessibilité synthétique d'analogues R₆ = Me ou R₆ = Et, seule la substitution R₆ = Me sera conservée par la suite. Il est par ailleurs intéressant de constater que cette région d'**ITB₉** est peu sensible à la substitution. En effet, elle peut

permettre la construction d'une sonde photoactivable dérivée d'**ITB₉** en espérant ne pas trop affecter l'affinité pour la cible biologique.

f. Coeur DHPM

Enfin, en ce qui concerne les modifications du cycle DHPM, les IC₅₀ des analogues **122** et **123** sont présentés dans le Tableau 24.

Tableau 24 : IC₅₀ des analogues d'**ITB₉**, **122** et **123**

Code	ITB₉	122	123
Structure			
IC ₅₀ (μM)	0,089	7,5	20

On observe dans les deux cas une diminution d'activité d'un facteur au moins 80. Comme nous l'avons expliqué dans la partie 2.f, les larges modifications structurales apportées à ces deux analogues en termes de géométrie et de propriétés électroniques expliquent sans doute ces observations.

g. La question de l'ester

La présence d'une fonction ester dans **ITB₉** pose la question du devenir de cette fonction en milieu physiologique. En effet, les activités biologiques sont mesurées lors d'un test *in cellulo*. Les composés sont donc potentiellement exposés à de nombreuses enzymes de métabolisme, dont des estérases. Les esters sont d'ailleurs utilisés fréquemment comme prodrogues pour protéger une fonction acide ou alcool. Par exemple, l'héroïne, la lisexamfetamine et l'aspirine sont déacétylées *in vivo* pour former respectivement la morphine, la D-amphétamine ou l'acide salicylique. Parmi les prodrogues contenant des fonctions esters variées qui sont clivées pour former les acides carboxyliques correspondants (Figure 47), on compte notamment la bacampicilline (Spectrobid®/Penglobe®, antibiotique), l'enalapril (Enaladex®, hypertension) ou le racécadotril (Tiorphan®, antidiarrhéique).²² Par ailleurs, des articles mettent en évidence les intérêts biologiques et pharmacocinétiques des esters benzyliques de molécules actives déjà connues, comme l'ibuprofène²³ ou la carnitine.²⁴

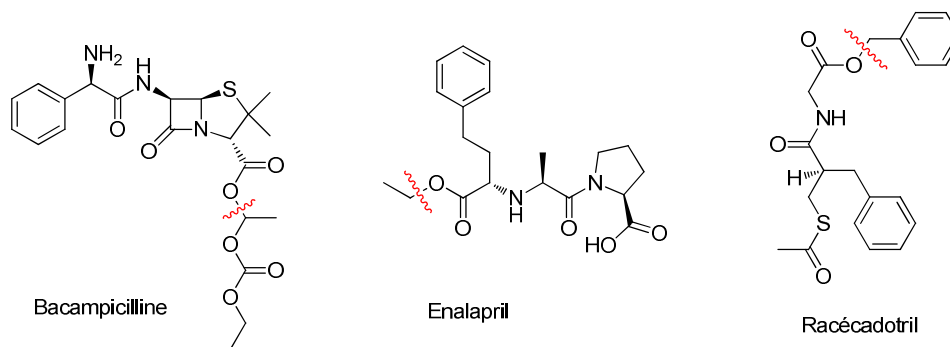


Figure 47 : Quelques prodrogues contenant des fonctions esters. Le site de clivage par des estérases est indiqué en rouge

Les résultats obtenus en série R₅ dans la partie 3.c. de ce chapitre montrent que la substitution de l'ester benzyle a peu d'influence, bien qu'il existe des substituants préférentiels de type méthoxy-. Nous ne pouvons pas nous assurer que cette sélectivité n'est pas due à un clivage spécifique par une estérase dont le substrat préférentiel est un ester benzyle. Nous avons donc comparé dans le Tableau 25 les activités biologiques de l'ester *ITB*₉, de l'acide **77** et de l'amide **124**, et nous rappelons également les activités des analogues **102** et **103**, dans lesquels la taille de l'espaceur B₅ est réduite ou augmentée d'une unité.

Tableau 25 : IC₅₀ des composés **77**, **102**, **103** et **124**

Code	Y	R ₅	IC ₅₀ (μM)
<u>ITB</u> ₉	O		0,089
77	O	H	5
103	O		20
102	O		inactif
123	NH		16,5

Tous ces analogues sont nettement moins actifs que la tête de file, *ITB*₉.

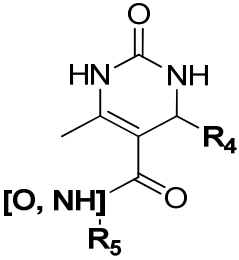
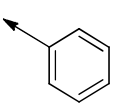
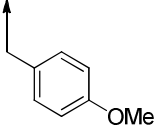
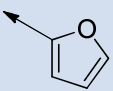
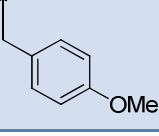
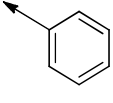
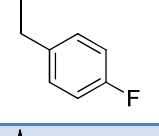
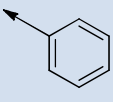
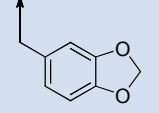
- Comportant une variation minimale de R₅ (R₅ = H), **77** possède des propriétés acido-basiques qui perturbent très probablement le passage des membranes et peuvent

expliquer sa faible activité. Nous ne pouvons donc pas conclure qu'il s'agit du « principe actif » issu du clivage de l'ester.

- Les analogues **102** et **103** sont tous les deux très peu actifs. Ils possèdent pourtant des structures proches d'ITB₉. Malgré les modifications structurales engendrées par la variation de B₅, ces résultats constituent également un argument en faveur d'un clivage enzymatique de l'ester benzylique *in vivo* ; ce processus devient impossible pour les homologues **102** et **103**.
- Enfin, l'amide **123** - qui est l'analogue le plus direct et un isostère d'ITB₉ - peut être considéré comme quasiment inactif. Ici encore, bien que cette modification puisse entraîner des perturbations du réseau de liaisons hydrogène (remplacement d'un groupe accepteur par un groupe mixte accepteur/donneur) et une rigidification de la liaison C₇-Y, ce résultat peut indiquer également que le clivage enzymatique de la fonction ester - impossible dans ce cas - est nécessaire à l'activité.

Afin d'approfondir cette hypothèse, nous avons synthétisé et testé trois autres amides **N-49**, **N-78** et **N-88**, analogues respectifs des composés actifs **49**, **78** et **88**. Les activités comparées des esters et des amides sont rassemblées dans le Tableau 26.

Tableau 26 : Activités comparées d'esters et d'amides analogues d'ITB₉

					
Code ester	Code amide	R ₄	R ₅	IC ₅₀ [ester] (μM)	IC ₅₀ [amide] (μM)
ITB₉	123			0,089	16,5
49	N-49			0,0032	30
78	N-78			0,2	0,9
88	N-88			0,08	0,078

On observe donc que le motif 4-méthoxybenzyle en R₅ diminue drastiquement l'activité des amides correspondants (**123** et **N-49**), alors que les deux autres substitutions testées paraissent relativement neutres vis-à-vis de l'isostérisme O/NH sur l'hétéroatome Y. Devant ces résultats contradictoires, il est alors difficile de conclure quant au clivage potentiel de la fonction ester *in vivo*.

h. Mesures de cytotoxicité

Les activités biologiques de 111 composés ont été évaluées dans cette partie, afin de déterminer les relations structure-activité. Cependant, les résultats de ce test sont basés sur une détection spectrophotométrique de l'iodure absorbé par les cellules, et dépendent donc directement de la quantité de cellules vivantes effectivement présentes dans la microplaque. Nous avons donc évalué la cytotoxicité de tous les composés testés sur cellules FRTL-5, au moyen du test MTT, qui mesure l'activité mitochondriale des cellules vivantes par colorimétrie²⁵ (le protocole détaillé est exposé dans la Partie expérimentale). La cytotoxicité des composés est évaluée au moins en duplicata, après 24 h d'incubation à une concentration de 1 μM, c'est-à-dire à une concentration située dans le haut de la gamme de concentrations utilisées pour déterminer l'IC₅₀ (200 μM à 0,15 pM). Les résultats sont présentés en Figure 48 :

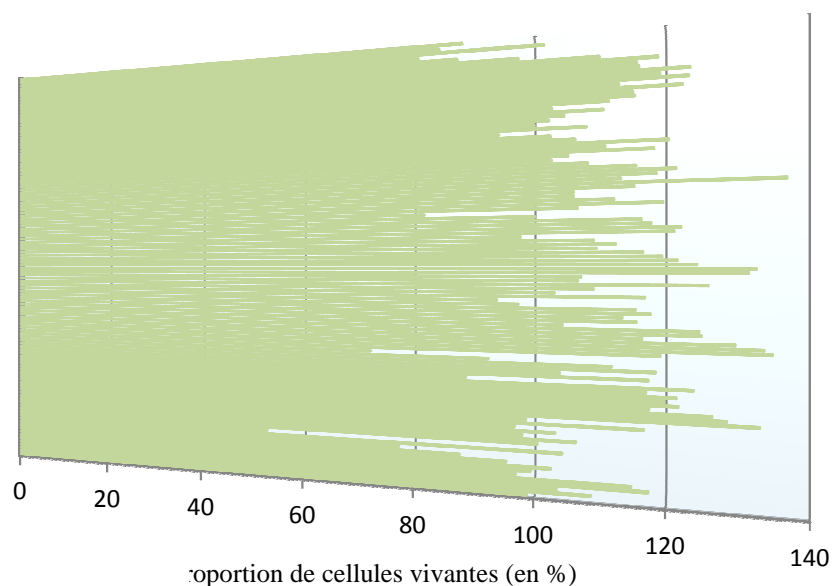
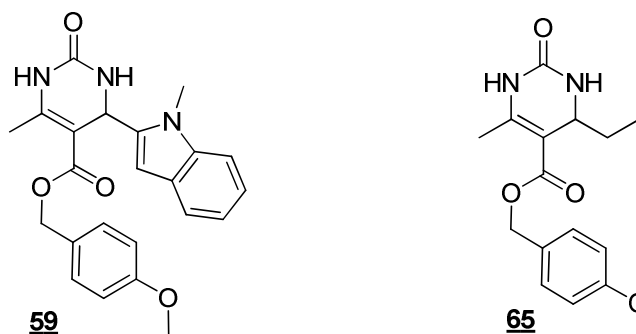


Figure 48 : Evaluation de la cytotoxicité des analogues d'ITB₉ "de première génération". Chaque bâtonnet horizontal représente un composé ; en abscisse est figurée la proportion de cellules vivantes après 24 h d'incubation en présence de composé, par rapport à un témoin négatif (100 %)

Dans chaque plaque 96 puits, des témoins négatifs (puits sans composés) permettent de normaliser les résultats : les absorbances de ces puits sont moyennées et la valeur d'absorbance ainsi obtenue sert de référence (100 % de cellules vivantes) pour les puits de toute la plaque. Toutefois, les disparités observées au niveau des résultats sont caractéristique d'un test cellulaire ; nous

estimons donc qu'une quantité de cellules comprise entre 80 % et 120 % de la référence est acceptable et le composé correspondant sera en conséquence considéré comme non toxique. Il ressort donc des résultats que deux composés ont un pouvoir cytotoxique important, qui peut conduire à une surestimation de l'IC₅₀. Il s'agit de **59** et **65**, qui sont tous deux peu actifs (Figure 49).



IC ₅₀ (μM)	> 100	8
Cytotoxicité (% cellules vivantes)	53	72

Figure 49 : Analogues cytotoxiques d'ITB₉, **59** et **65**

Ces deux composés peu actifs présentent donc un intérêt modeste pour la suite de l'étude et leur cytotoxicité relative après 24 h ne perturbe sans doute pas de manière significative le test spectrophotométrique, pendant lequel la durée d'incubation n'est que de 1 h.

i. Conclusion

Dans cette partie, nous avons donc mesuré les IC₅₀ de 119 analogues « de première génération » dérivés d'ITB₉. Nous avons ainsi pu établir un ensemble de relations structure-activité, résumé en Figure 50 et dont nous rappelons les principales caractéristiques :

- Si R₁ = Me et R₃ = H ou Me, l'activité biologique est conservée ; de même, l'isostérisme O/S sur l'hétéroatome X ne modifie pas significativement l'activité.
- En R₄, un groupe aromatique de type furane ou thiophène est souhaitable pour gagner en activité par rapport à la tête de file, avec une préférence nette pour le 2-furane ; notons que ce groupe ne doit pas être espacé du cycle DHPM et que cette position est de manière générale assez sensible.
- En R₅, un bras espaceur B₅ à un seul chaînon est nécessaire. L'hétéroatome Y doit être un oxygène, les activités biologiques des analogues de type Y = NH étant trop variables. Enfin, le groupe R₅ lui-même est préférentiellement un noyau phényle substitué par des groupes 3-méthoxy-, 4-méthoxy ou 3,4-méthylènedioxy-.

- R₆ est une position tolérant une large gamme de substituants sans perte drastique d'activité. Toutefois, les chaînes alkyles courtes favorisent le pouvoir inhibiteur.
- Enfin, le cœur moléculaire (cycle DHPM) doit rester inchangé.

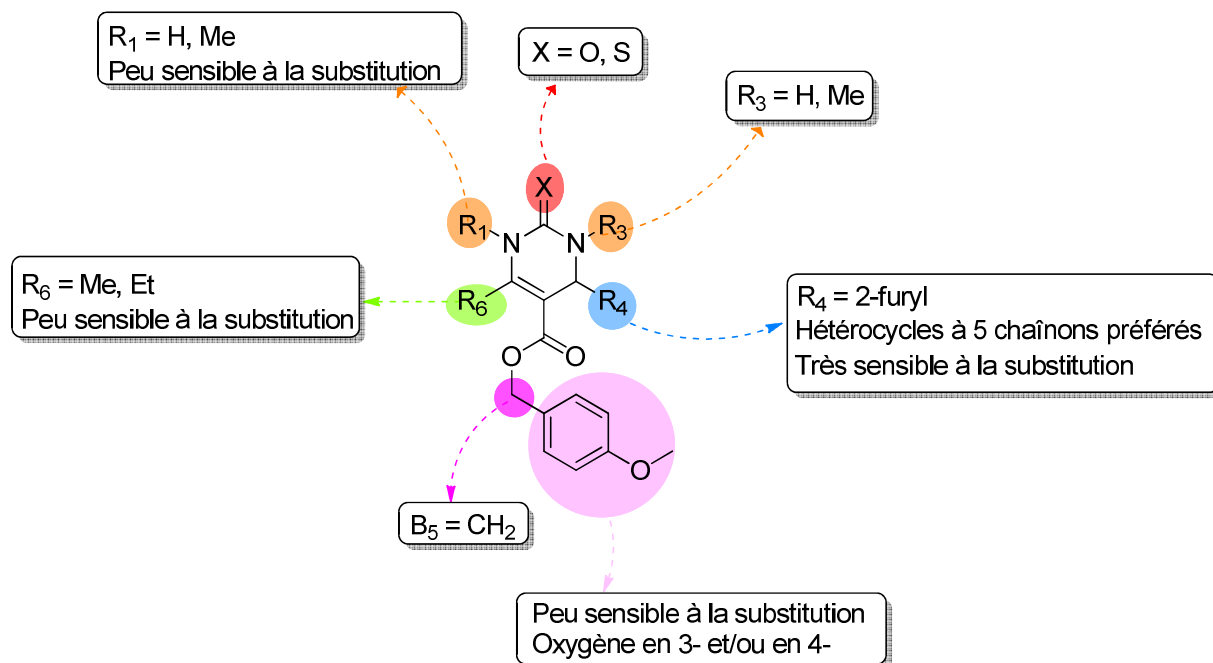


Figure 50 : Relations structure-activité d'ITB₉ sur l'incorporation d'iodures dans les cellules FRTL-5

Ces informations vont nous permettre dans la partie suivante de concevoir de nouveaux analogues « de seconde génération » dont l'activité potentielle serait plus élevée.

4. Vers des médicaments dérivés d'ITB₉ ?

L'évaluation biologique des analogues de première génération a permis de définir un certain nombre de relations structure-activité et un analogue particulièrement puissant a été découvert (**49**, IC₅₀ = 3,2 nM). Nous avons dans un second temps souhaité aller plus loin dans l'optimisation de cette famille ; pour cela, de nouveaux analogues « de seconde génération », combinant plusieurs modifications porteuses d'activité, seront synthétisés et évalués. Puis, l'influence de la stéréochimie du carbone C₄, qui n'a pas été étudiée jusqu'à présent, sera analysée. Enfin, nous verrons en quoi les meilleurs inhibiteurs de cette famille représentent des candidats pharmaceutiques particulièrement prometteurs.

a. Synthèse d'analogues « de seconde génération »

La conception des analogues « de seconde génération » s'est appuyée sur les relations structure-activité déterminées en partie 3 de ce chapitre, et vise à combiner plusieurs groupes porteurs d'activité afin d'améliorer l'activité biologique. Les combinaisons structurales sont donc les suivantes (Figure 51) :

- Pour la partie Nord, nous utiliserons les trois meilleures combinaisons $R_1/R_3 = H/H$, Me/H et Me/Me , issues respectivement des composés **ITB₉**, **113** et **120**.
- Pour la partie Est, nous choisissons le 2-furane, qui apporte un gain d'activité substantiel (composé **49**).
- Pour la partie Sud, nous avons vu qu'il était préférable d'avoir un groupe pipéronyle, 3-méthoxybenzyle ou 4-méthoxybenzyle (meilleurs composés **88**, **86** et **ITB₉**). Nous avons de plus émis l'hypothèse que le dérivé 3,4-diméthoxybenzyle devait également comporter une activité biologique intéressante. Ce fragment a donc été inclus dans notre série, après avoir synthétisé le β -cétoester **C36** correspondant, isolé avec un rendement de 70 %.
- Nous conservons en revanche le méthyle en C₆, les hétéroatomes $X = Y = O$ et le cœur DHPM.

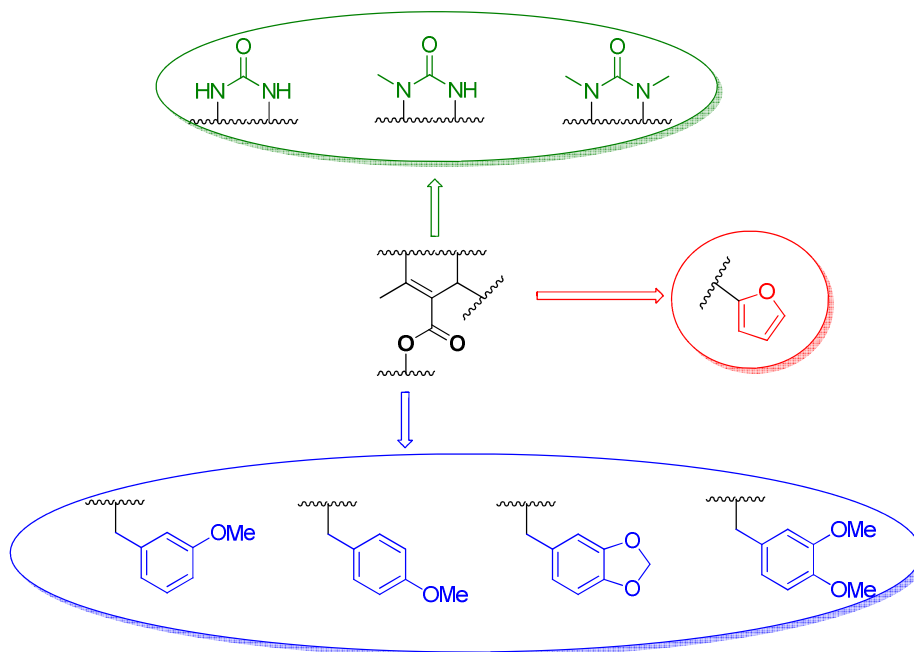
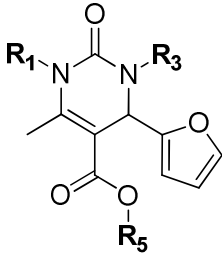
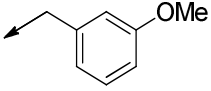
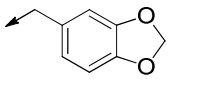
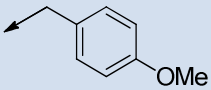
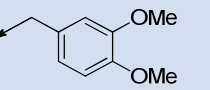
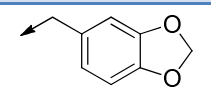
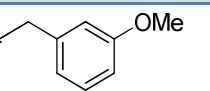
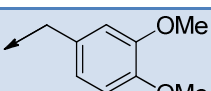
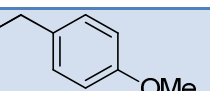
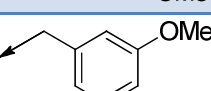
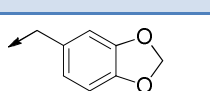
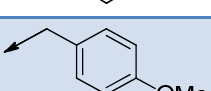
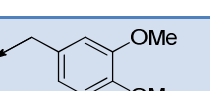


Figure 51 : Conception d'analogues d'ITB₉ "de seconde génération"

Les nouvelles structures ainsi conçues ont été synthétisées en parallèle en utilisant la méthode B définie en partie 2.e.i). Les rendements après chromatographie sur gel de silice sont

indiqués dans le Tableau 27. Rappelons que le composé **49** ($R_1 = R_3 = H$, $R_5 = 4\text{-OMe-benzyle}$) a déjà été présenté et fait partie des analogues « de première génération ».

Tableau 27: Synthèse des analogues d'ITB₉ "de seconde génération" 128-138

									
Code	R ₁	R ₃	R ₅	Rdt (%)	Code	R ₁	R ₃	R ₅	Rdt (%)
128	H	H		70	133	Me	H		30
49	H	H			134	Me	H		48
129	H	H		63	135	Me	Me		43
130	H	H		73	136	Me	Me		46
131	Me	H		51	137	Me	Me		70 ^a
132	Me	H		49	138	Me	Me		44

^a Conditions « poussées » à 0,25 éq Zn(OTf)₂, 24 h

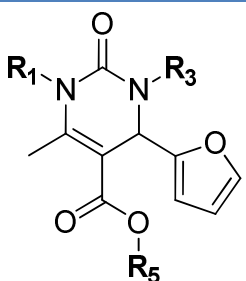
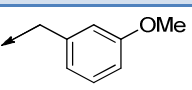
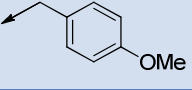
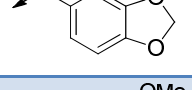
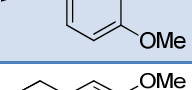
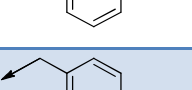
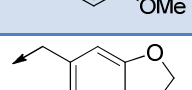
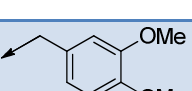
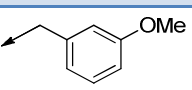
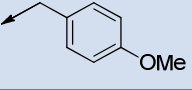
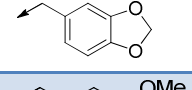
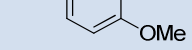

Nous remarquons que – dans l'ensemble – les rendements de synthèse sont plus élevés dans le cas où $R_1 = R_3 = H$. Ces résultats sont conformes au mécanisme proposé par Kappé²⁶ et présenté dans le chapitre I – la formation de la base de Schiff initiale ainsi que la cyclisation finale étant plus difficiles avec des urées substituées. Cependant, l'augmentation de la charge catalytique et du temps de réaction permettent d'augmenter substantiellement le rendement en produit attendu (composé **137**).²⁷

b. Activités biologiques

Ces analogues ont ensuite été testés contre l'incorporation d'iodures dans les cellules FRTL-5. Dans certains cas, les IC₅₀ extrêmement faibles entraînent des difficultés à lisser les données expérimentales selon l'équation de Hill. L'activité biologique de ces analogues a alors été confirmée

par RAIU par le Dr. Ambroise. La grande sensibilité de la détection d'iode radioactif lors de ce test permet en effet d'obtenir des courbes expérimentales plus satisfaisantes. Les résultats et les méthodes de mesure des IC₅₀ sont indiqués dans le Tableau 28.

Tableau 28 : IC₅₀ des analogues d'ITB₉ "de seconde génération" 128-138. Pour les analogues plus actifs qu'ITB₉, le rapport des IC₅₀ est indiqué.

						
Code	R ₁	R ₃	R ₅	IC ₅₀ iode froid (μM)	IC ₅₀ [ITB ₉] / IC ₅₀ [analogue]	IC ₅₀ RAIU (μM)
128	H	H		0,00057	156	0,00050
49	H	H		0,0032	28	/
129	H	H		0,004	22	/
130	H	H		0,40		/
131	Me	H		0,075		/
132	Me	H		0,09		/
133	Me	H		0,073		/
134	Me	H		1,0		/
135	Me	Me		0,000065	1 370	0,000056
136	Me	Me		0,0016	56	/
137	Me	Me		0,00085	105	0,00071
138	Me	Me		0,065		/

L'ensemble de ces résultats appelle plusieurs commentaires :

- Contrairement à l'observation qui avait été faite pour les analogues de première génération, les composés monométhylés en N₁ sont nettement moins actifs que leurs homologues dihydrogénés ou diméthylés (composés **131** à **134**). Rappelons que **114**, **121** et **ITB₉** possédaient en effet des IC₅₀ respectifs de 0,075 μM, 0,065 μM et 0,089 μM. Le remplacement du phényle par un 2-furyle en R₄ ne permet donc pas de transposer les relations structure-activité observées dans un premier temps sur les autres groupes.
- De la même façon, le groupe 3,4-diméthoxybenzyle en R₅ semble nuire à l'activité biologique dans cette série. Rappelons que ce groupe avait été choisi d'après les bons résultats des analogues 3-méthoxy- (**85**), 4-méthoxy- (**ITB₉**) et pipéronyle (**88**) en série R₅. Ce choix s'avère donc insatisfaisant, l'activité de ces dérivés par rapport à leurs homologues respectifs diminuant d'un facteur 10 (**132** / **134**) à 1 000 (**135** / **138**).
- Enfin, les autres combinaisons ont fourni six composés dont les IC₅₀ sont inférieurs à 5 nM (**49**, **128-129** et **135-137**). L'activité biologique par rapport à la tête de file se retrouve multipliée par un facteur 20 à 1 400. Notons particulièrement le composé **135**, dont l'IC₅₀ a été évalué à 65 pM, et qui est à ce jour notre meilleur inhibiteur du transport de l'iode dans la thyroïde.

Dans cette partie, nous avons donc découvert six molécules particulièrement actives, possédant des IC₅₀ inférieurs à 5 nM sur le transport de l'iode. Ces composés sont les meilleurs inhibiteurs décrits à ce jour et ont fait l'objet d'une publication²⁸ et d'un brevet²⁹.

c. Etude de la stéréochimie en C₄

Dans cette partie, nous présentons les travaux qui ont été effectués pour déterminer la configuration biologiquement active de la famille **ITB₉**. En effet, jusqu'ici, toutes les synthèses et les résultats biologiques ont été effectués sur des mélanges racémiques, sans se préoccuper de l'importance de la configuration du carbone asymétrique C₄. Afin d'étudier l'impact précis de la stéréochimie en C₄ sur l'activité, nous avons choisi trois composés : la tête de file (**ITB₉**), le meilleur analogue de première génération (**49**) et un analogue encore plus actif de seconde génération (**137**). Les trois racémiques ont été séparées sur colonne chirale³⁰ (Chiralcel OD ou Chiralpak AD) et les énantiomères ainsi obtenus ont été nommés E1 et E2 en fonction de leur ordre de sortie en tête de colonne. Les excès énantiomériques sont tous supérieurs à 99 %. Notons qu'aucune épimérisation n'a été observée après 6 mois de conservation dans le DMSO (20 mM) à - 20 °C. La configuration relative des différents énantiomères a ensuite été déterminée par dichroïsme circulaire, en s'appuyant sur les mesures effectuées par Kappe & coll.³¹ : les auteurs ont enregistré les spectres de

dichroïsme circulaire de deux énantiomères d'une DHPM de configurations absolues déterminées au préalable. Les spectres obtenus ainsi que ceux d'*ITB*₉, de **49** et de **137** sont présentés en Figure 52 :

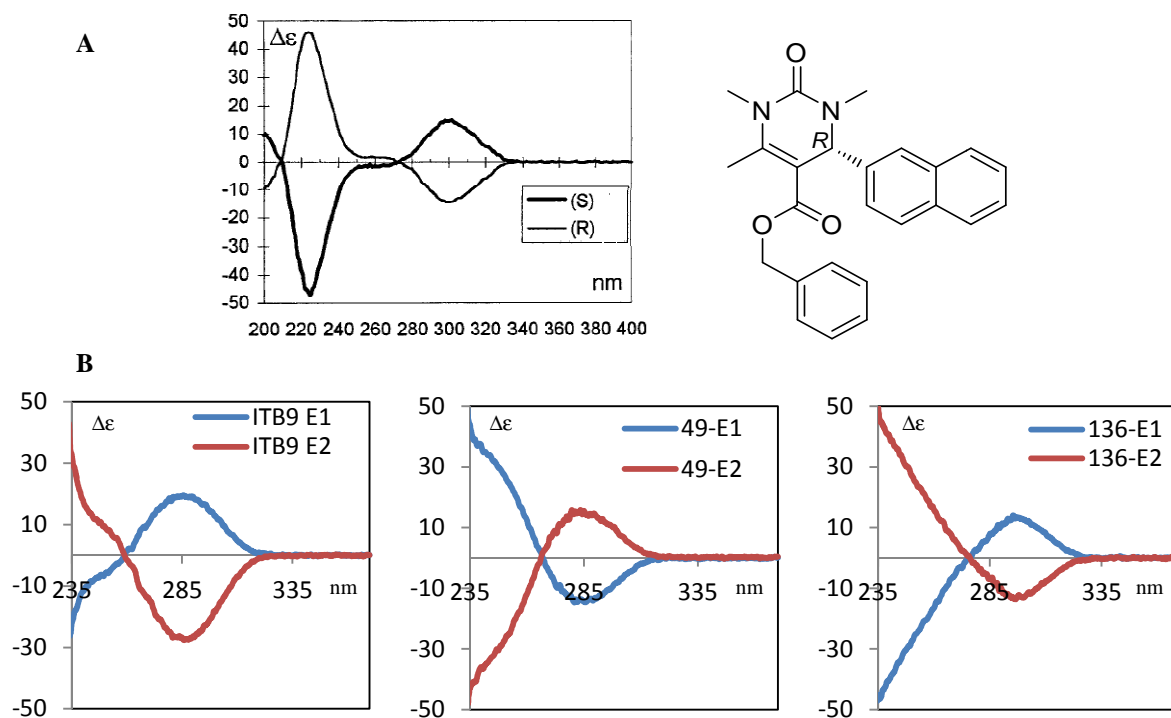


Figure 52 : Spectres de dichroïsme circulaire de la DHPM de référence (A) et des énantiomères d'*ITB*₉, de **49** et de **137** (B)

On remarque dans le spectre de référence (Figure 52A) un effet Cotton négatif vers 300 nm pour l'énantiomère de configuration absolue R, caractéristique du motif énamide des DHPM.^{32,33} La comparaison avec nos spectres expérimentaux permet de déduire que les énantiomères ***ITB*₉-E2**, **49-E1** et **137-E2** sont de même configuration. Cependant, pour ces deux derniers, le remplacement du noyau phényle par un 2-furyle en R₄ conduit à une inversion des priorités selon les règles Cahn-Ingold-Prelog, et donc de la configuration absolue du carbone C₄ (Figure 53).

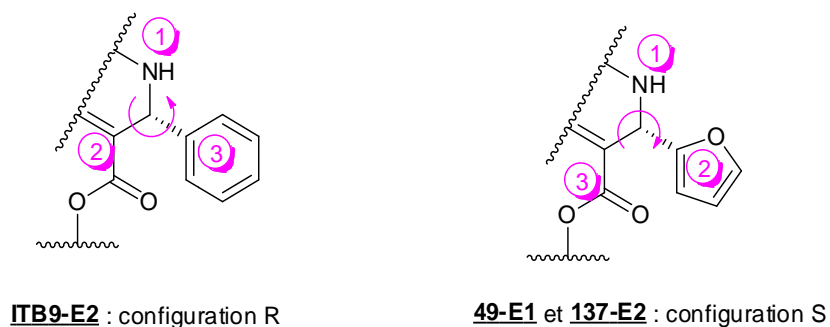
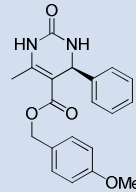
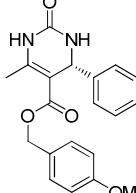
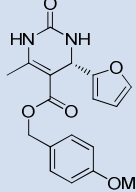
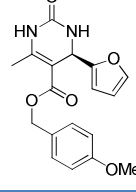
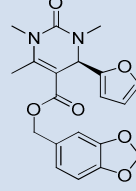
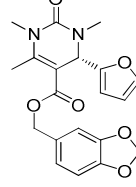


Figure 53 : Configuration absolue du carbone C₄ d'*ITB*₉, **49** et **136**. L'ordre des substituants selon les règles CIP est indiqué.

***ITB*₉-E2**, **49-E1** et **137-E2** sont donc homochiraux et possèdent la même stéréochimie relative, le cycle branché en C₄ étant positionné en arrière du cycle DHPM. Les configurations absolues sont donc respectivement R pour ***ITB*₉-E2**, et S pour **49-E1** et **137-E2**. Enfin, les activités biologiques des

énantiomères ont été évaluées grâce au test à l'iode froid. Les IC₅₀ ainsi déterminés sont rassemblés dans le Tableau 29, de même que les configurations absolues déterminées par dichroïsme circulaire et les rapports eudismiques (rapport des IC₅₀ des deux énantiomères).

Tableau 29 : Configuration absolue et IC₅₀ des énantiomères d'ITB₉, de 49 et de 137.

Code	Configuration absolue de C ₄	Formule	IC ₅₀ (μM)	IC50 racémique (μM)	Rapport eudismique
<u>ITB₉-E1</u>	S		1,5	0,089	21
<u>ITB₉-E2</u>	R		0,070		
<u>49-E1</u>	S		0,001	0,0032	14 000
<u>49-E2</u>	R		14		
<u>137-E1</u>	R		0,63	0,00085	900
<u>137-E2</u>	S		0,0007		

Pour chacun des trois composés de la série, il existe un énantiomère actif (eutomère) possédant un IC₅₀ similaire à celui du mélange racémique, et un énantiomère de moindre activité (distomère). Il n'est pas possible de déterminer précisément si l'activité résiduelle observée pour ces derniers est due à la présence de traces d'eutomère, même très faibles. En tout état de cause, il

existe bien une stéréochimie préférentielle en C₄ pour l'activité biologique : R pour **ITB₉**, S pour **49** et **137**. Nous pouvons donc raisonnablement penser que cette configuration est responsable de l'activité biologique pour toute la famille de dérivés d'**ITB₉** que nous avons présentée auparavant, ce qui nous permet ainsi de compléter les relations structure-activité.

d. Des candidats pharmaceutiques prometteurs

Les analogues « de seconde génération » conçus de façon semi-rationnelle en début de partie ont permis d'obtenir 6 composés dérivés d'**ITB₉** dont l'activité biologique est particulièrement élevée (IC₅₀ < 5 nM). Structuralement très proches, ces molécules constituent des candidats pharmaceutiques potentiels dont les indications pourraient être étendues tant en radioprotection qu'en thérapeutique. Bien que la cible biologique de ces inhibiteurs soit inconnue et qu'aucune propriété pharmacocinétique (PK) ou pharmacodynamique (PD) n'ait été déterminée à l'heure actuelle, les propriétés physico-chimiques peuvent déjà être examinées pour affirmer le potentiel « *drug-like* » de ces molécules. Un certain nombre de critères ont en effet été développés dans l'industrie pharmaceutique pour éliminer au plus tôt les molécules ne possédant pas les « bonnes » propriétés physico-chimiques pour constituer un médicament (biodisponibilité, passage des barrières et des membranes...); l'ensemble de règles le plus connu est sans doute la « règle de 5 » (ROF pour *Rule of Five*), développée par Christopher Lipinski au sein des laboratoires Pfizer, qui prend en compte le poids moléculaire (MW < 500), les accepteurs de liaisons hydrogène (HBA < 10), les donneurs de liaisons hydrogène (HBD < 5) et le coefficient de partition eau/octanol calculé (cLogP < 5).³⁴ Un candidat médicament destiné à l'absorption orale ne doit pas violer plus d'un critère. Précisons que cette règle n'a pas un caractère absolu et peut souffrir des exceptions (deux molécules actuellement sur le marché violent les quatre critères!³⁵). En conséquence, de nombreux autres auteurs ont tâché de compléter ou de redéfinir de nouveaux critères pour filtrer au plus tôt les molécules indésirables en recherche pharmaceutique.^{36,37,38,39} De plus en plus, ces filtres sont basés sur l'analyse *in silico* de bibliothèques de molécules ayant passé les phases II ou III. Cependant, malgré leur simplicité, les règles de Lipinski restent très populaires et efficaces.

Nous présentons dans le Tableau 30 les six meilleurs analogues d'**ITB₉**, leur activité biologique (pour rappel) ainsi que leur conformité avec les règles de Lipinski et de Veber³⁷. Ces dernières évaluent deux critères supplémentaires de flexibilité (nombre de liaisons à libre rotation RB < 5) et de perméabilité (surface polaire PSA < 140 Å) pour un candidat médicament destiné à être absorbé oralement. Enfin, la cytotoxicité de ces composés sur les cellules FRTL-5 a été mesurée grâce au test MTT déjà utilisé en partie 3.h.

Tableau 30 : Respect des règles de Lipinski (ROF) et de Veber pour les six meilleurs analogues d'ITB₉. Sont indiqués pour chaque composé le poids moléculaire (MW, en g.mol⁻¹), le nombre d'atomes donneurs de liaisons hydrogène (HBD) et d'atomes accepteurs (HBA), ainsi que le coefficient de partition calculé (cLogP), le nombre de liaisons à libre rotation (RB) et la surface polaire (PSA, en Å²).

Code	IC ₅₀ (nM)	Règles de Lipinski				Règles de Veber		Cytotoxicité % > 80
		MW < 500	HBD < 5	HBA < 10	cLogP ¹ < 5	RB < 5	PSA ² < 140	
<u>128</u>	0,57	342	2	7	1,81	3	89,8	87
<u>49</u>	3,2	342	2	7	1,81	3	89,8	93
<u>129</u>	4,0	356	0	8	2,01	2	99,03	88
<u>135</u>	0,065	370	0	7	2,38	5	72,22	96
<u>136</u>	1,6	370	0	7	2,38	5	72,22	81
<u>137</u>	0,85	384	0	8	2,58	4	81,45	82

Ces six critères constituent un premier filtre satisfaisant pour évaluer le caractère *drug-like* des molécules étudiées, et sont présentés comme tels par Rishton.⁴⁰ Ce dernier recense également un ensemble de fonctions « interdites » particulièrement réactives, qui sont la source de nombreuses réactions non-spécifiques avec les fonctions biologiques et doivent donc être évitées autant que possible (accepteurs de Michael, thioesters, imines, époxydes...). Remarquons que les analogues présentés dans le Tableau 30 n'en comportent aucune. Ce tableau constitue ainsi une estimation qualitative satisfaisante du caractère *drug-like* des six composés sélectionnés.

e. Conclusion

Dans cette partie, nous avons donc essayé d'améliorer le pouvoir inhibiteur dans la famille d'ITB₉ en s'appuyant sur les résultats de la partie précédente. Ainsi, nous avons synthétisé et évalué 12 analogues « de seconde génération », dont 6 se sont révélés particulièrement actifs, avec des IC₅₀ inférieurs à 5 nM. Le meilleur d'entre eux (**135**) possède une activité évaluée à 65 pM. Il s'agit des plus puissants inhibiteurs décrits à ce jour. Par ailleurs, ces 6 composés sont non toxiques à 1 µM et possèdent des propriétés physico-chimiques adéquates pour un développement ultérieur *in vivo* à des fins thérapeutiques. De nombreux tests PK/PD complémentaires sont toutefois nécessaires afin d'optimiser encore la structure chimique de ces inhibiteurs pour des tests *in vivo*. Enfin, la stéréochimie active de cette famille a pu être déterminée par dichroïsme circulaire. D'autre part, ces inhibiteurs représentent des outils pharmacologiques intéressants pour la caractérisation des processus impliqués dans le transport de l'iode, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre I. Dans

¹ Les Log P ont été calculés en utilisant la plateforme OSIRIS Property Explorer, développée à Actelion Pharmaceuticals par T. Sander. Les contributions de 369 fragments ont été déterminées à partir de 5 147 composés dont le Log P est compris entre -2 et 8.

² La méthode de calcul des PSA par combinaison de fragments est détaillée en Annexe I

la partie suivante, nous allons donc présenter la synthèse de sondes photoactivables dérivées d'**ITB₉**, ainsi que les essais de photomarquage qui ont été réalisés.

5. Sondes photoactivables dérivées d'ITB₉

Outre la découverte d'inhibiteurs puissants constituant des candidats pharmaceutiques, l'optimisation d'**ITB₉** réalisée en parties III.3 et III.4 a permis de découvrir un squelette très actif pouvant être dérivé en sonde photoactivable. L'objectif de cette partie consiste donc à concevoir des sondes dérivées d'un inhibiteur de seconde génération, puis à tenter d'identifier la protéine cible d'**ITB₉** par photomarquage d'affinité.

a. Conception des sondes

Comme nous l'avons exposé dans le chapitre II, nous souhaitons synthétiser des sondes comportant trois éléments constitutifs : le squelette d'un inhibiteur actif, un groupe photoactivable de type trifluorométhyl diazirine et une étiquette de type desthiobiotine. Au moment de démarrer la synthèse, les inhibiteurs les plus actifs dont nous disposions étaient les composés de seconde génération **136** et **137** (1,6 nM et 0,85 nM) ; c'est donc eux qui ont été choisis, malgré la découverte ultérieure d'inhibiteurs plus actifs (**128**, **135**). L'agencement des différents groupes sera effectué de façon similaire à celle du Dr. Waltz : un court bras espaceur sera greffé sur le squelette de l'inhibiteur, en tenant compte des relations structure-activité déterminées précédemment. A l'extrémité de ce bras, une fonction amine primaire permettra de brancher d'une part le groupement photoactivable et d'autre part le bras desthiobiotinylé.

Concernant les points d'ancrage de ces fonctionnalités sur le squelette de **136** et **137**, les considérations suivantes ont été établies sur la base de la SAR résumée en Figure 50 :

- Nous disposions de trop peu d'informations sur les effets de la substitution en N₃.
- Les substitutions en N₁ et en C₄ paraissaient trop sensibles à l'encombrement stérique et nous préférons conserver autant que possible la combinaison de motifs [diméthylurée + 2-furane] responsable d'une activité élevée (composés **135-137**).
- En R₅, la présence d'un oxygène en position 3- ou 4- du cycle aromatique nous semblait également impérative.

Nous nous sommes donc orientés sur la synthèse de deux sondes **139** et **140**, substituées respectivement en position 4- du groupe benzyle et en C₆ (Figure 54).

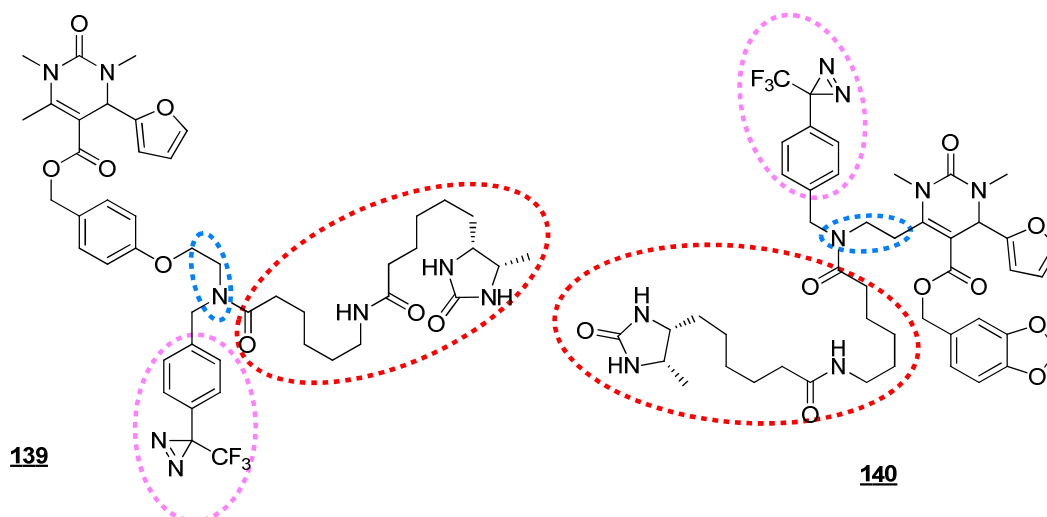


Figure 54 : Sondes dérivées d'ITB₉ 138 et 139. Sur le squelette de l'inhibiteur sont greffés un court bras espaceur (en bleu) sur lequel sont branchés le groupe photoactif (en rose) et le bras desthiobiotinylé (en rouge)

Dans les parties suivantes, nous présentons succinctement la synthèse de l'étiquette desthiobiotinylée et du groupe photoactif, avant de détailler la synthèse des deux sondes.

b. Synthèse des groupements 141 et 142

i) Synthèse du bras desthiobiotinylé 141

Pour s'assurer d'une meilleure reconnaissance de la desthiobiotine par l'avidine, un bras espaceur a été greffé sur cette dernière. La synthèse de 141 a donc été effectuée en deux étapes : une activation quantitative de la D-desthiobiotine en ester-NHS, suivie d'un couplage de type peptidique avec l'acide 6-aminocaproïque a permis d'obtenir le bras desthiobiotinylé 141 avec un rendement global de 44 % sur deux étapes (Figure 55).

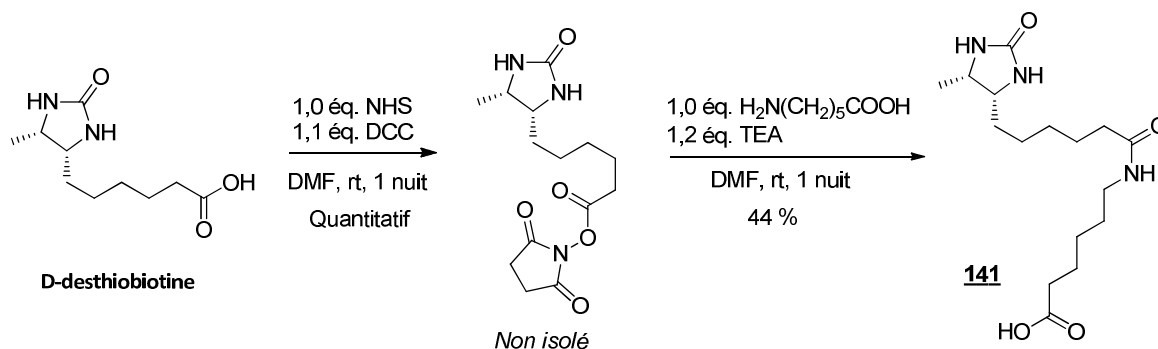
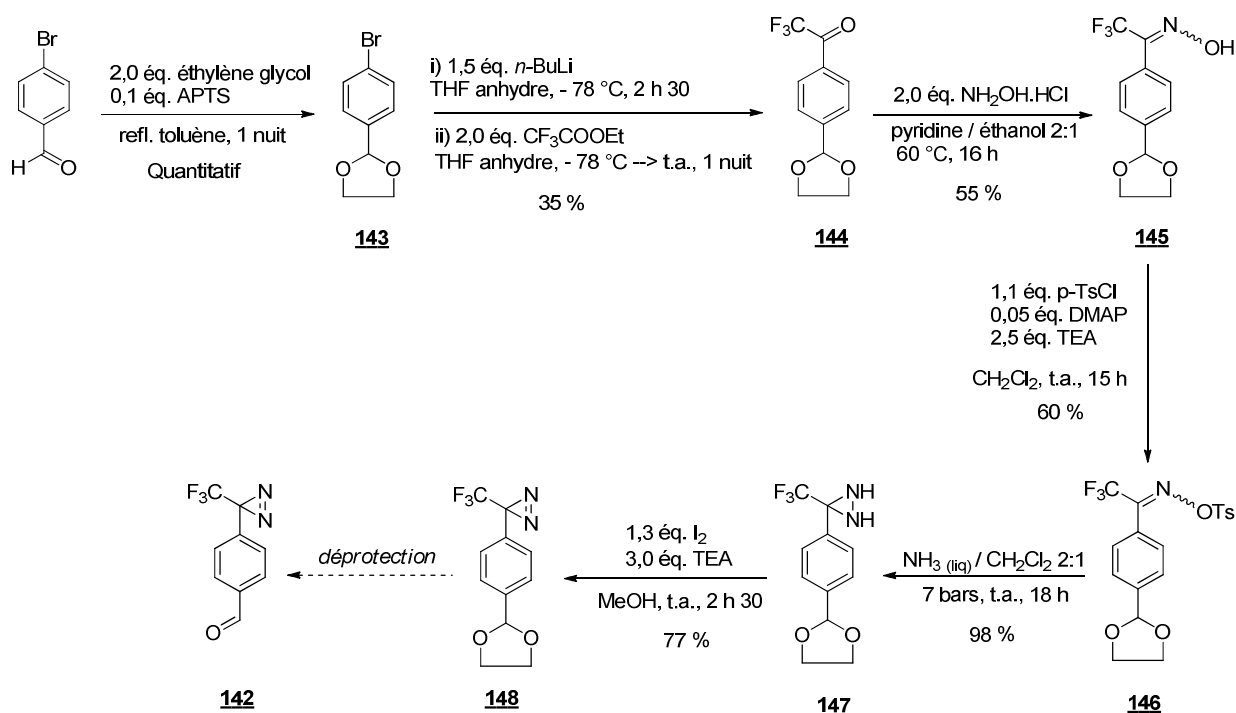


Figure 55 : Synthèse du bras desthiobiotinylé 141

ii) Synthèse du groupement photoactivable **142**

Le groupe photoactivable avait déjà été synthétisé au laboratoire à partir d'un protocole adapté de Delfino & *al.*⁴¹ en protégeant la fonction aldéhyde sous forme de 1,3-dioxane. Pour des raisons que nous développerons ultérieurement, nous avons reproduit cette synthèse avec une protection de type 1,3-dioxolane (Figure 56). La synthèse commence par une protection du *para*-bromobenzaldéhyde, en présence d'un excès d'éthylène glycol et d'APTS en quantité catalytique, dans le toluène à reflux sous un montage de type Dean-Starck (Figure 54). Cette protection est quantitative. L'acétal **143** ainsi formé est engagé dans une lithiation au *n*-BuLi, suivie de l'addition de trifluoroacétate d'éthyle pour obtenir la cétone **144**. Les rendements de cette étape ne dépassent pas 40 % mais sont constamment reproduits. Par la suite, la cétone **144** est convertie en oxime **145** en présence de deux équivalents d'hydroxylamine ; la tosylation de cette oxime par le chlorure de tosyloxy en présence de DMAP permet d'obtenir le dérivé **146** ; le rendement de chacune de ces deux étapes est de l'ordre de 60 %. Le composé tosylé est alors traité par l'ammoniac liquide sous pression (7 bars) pour former quantitativement la diaziridine **147**. La réaction s'effectue sous pression d'ammoniac en tube scellé. Enfin, l'accès à la diazirine finale **148** s'effectue *via* une oxydation par le diiode dans le méthanol, en présence d'un excès de triéthylamine. Cette dernière étape conclut la synthèse de **148**, obtenu avec un rendement global de 9 % sur 6 étapes.

Figure 56 : Synthèse de l'acétal **148**

La dernière étape consiste en la déprotection de l'acétal **148** pour former l'aldéhyde **142**. Dans la thèse du Dr. Waltz, la déprotection de l'homologue de **148** à 6 chaînons (1,3-dioxane) posait

des problèmes récurrents et conduisait à des mélanges finaux aldéhyde/dioxane de proportions variables comprises entre 50/50 et 30/70. C'est pourquoi nous avons effectué cette synthèse avec la fonction aldéhyde protégée sous forme de 1,3-dioxolane ; en effet, de manière générale, ces derniers se clivent plus facilement que leurs analogues à 6 chaînons sur les aldéhydes.⁴² Avec les mêmes conditions que le Dr. Waltz (catalyse à l'Amberlyst 15), la conversion atteignait 95 % en une nuit ; cependant, après traitement, le ratio **142/148** était encore variable, bien que supérieur à 70/30. En fait, la réversibilité de cette étape due à la présence d'éthylène glycol libre expliquait cette observation. Dans un deuxième temps, nous avons donc tâché de piéger l'éthylène glycol résiduel en changeant le solvant de réaction : au THF a été substituée l'acétone, qui permettrait une transacétalisation plus favorable.^{43,44} L'absence d'éthylène glycol libre a pu être vérifiée par RMN après conversion complète. Par ailleurs, nous avons optimisé les conditions d'évaporation qui doivent rester douces, à savoir une élimination de l'acétone à température ambiante, puis du 2,2-diméthyl-1,3-dioxolane ($T_{\text{éb}} = 91-93 \text{ }^{\circ}\text{C}^{45}$) à l'évaporateur rotatif. Dans ces conditions, nous obtenons des proportions **142/148** comprises entre 85/15 et 100/0, ce qui représente une amélioration substantielle de cette dernière étape.

c. Synthèse de la sonde **139**

La première sonde, **139**, pouvait être obtenue en trois étapes à partir du dérivé protégé **149**. Deux voies de rétrosynthèse de ce composé ont donc été envisagées (Figure 57) : l'alkylation directe du phénol **150** ou le couplage de l'acide **151** et de l'alcool **152**, les composés **150** et **151** étant formés au préalable par réaction de Biginelli.

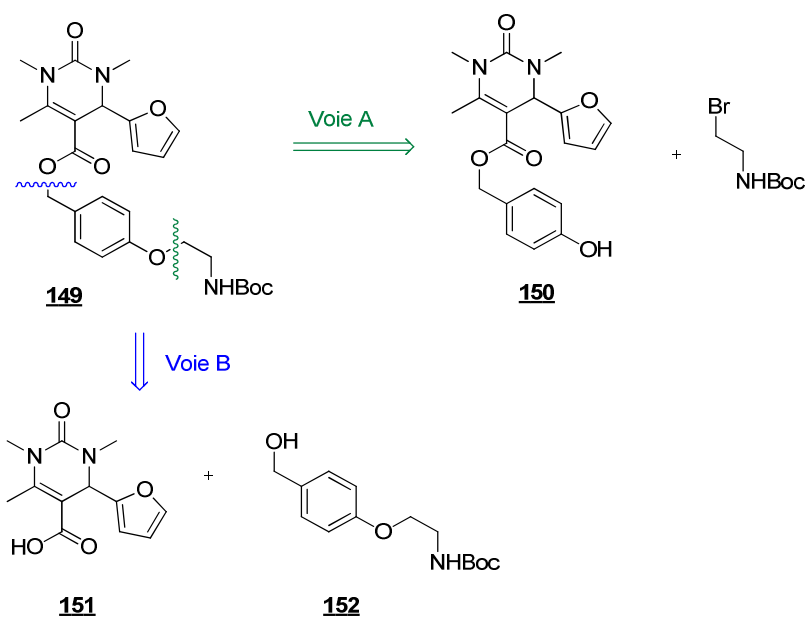


Figure 57 : Voies de rétrosynthèse possibles du composé **149**

La voie A, par laquelle nous avons commencée, s'est retrouvée limitée par les difficultés d'accès au phénol **150**. En effet, malgré la diversité des méthodes utilisées, aucune n'a conduit de façon satisfaisante à l'obtention de ce dérivé. Nous avons donc choisi la voie B comme alternative : brièvement, l'alcool **152** a été synthétisé par alkylation de l'alcool 4-hydroxybenzylique en présence d'un excès (2,5 équivalents) de N-Boc-2-bromoéthylamine avec un rendement de 60 %. D'autre part, la réaction de Biginelli entre la diméthylurée, le 2-furaldéhyde et l'acétoacétate de benzyle conduit au dérivé **153**, obtenu avec un rendement de 55 %. La déprotection en présence d'un excès de formiate d'ammonium et de palladium sur charbon permet alors de former l'acide **151** avec un rendement satisfaisant de 86 % (Figure 58).

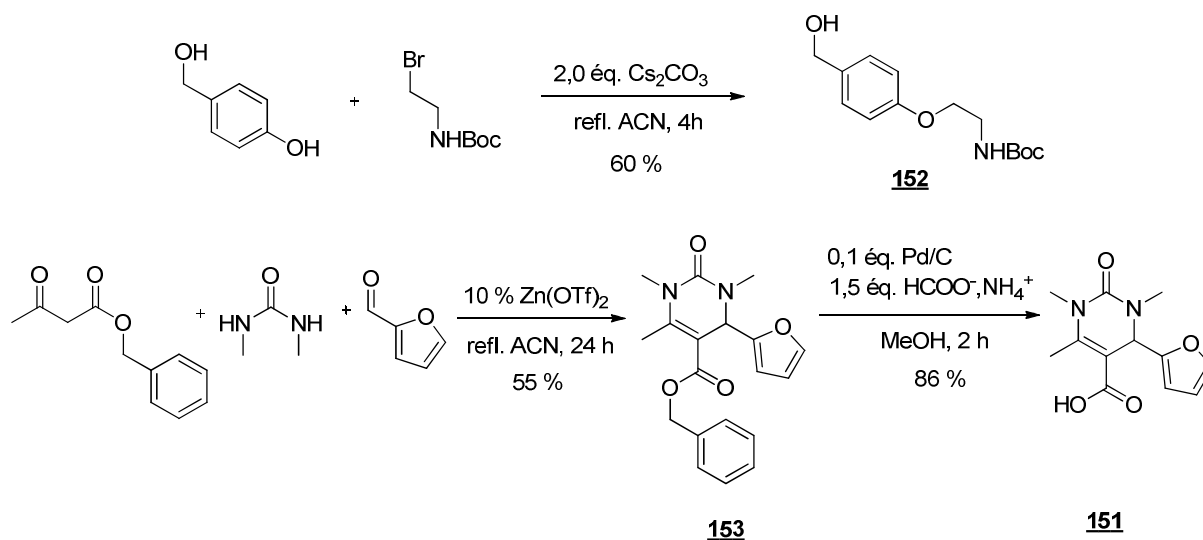


Figure 58 : Synthèse des composés **151** et **152**

Finalement, nous avons tenté de coupler les deux composés ainsi synthétisés pour obtenir **149**. Cependant, malgré la diversité des agents de couplage utilisés, l'approche par estérification (chlorures d'acyle, estérification de Steglich⁴⁶, couplages peptidiques...) s'est révélée infructueuse (Tableau 31).

Tableau 31 : Essais de couplage de **150** et **151**

Agent de couplage	Solvant	Température	Produit
Chlorure d'oxalyle	DMF	t.a.	Traces
PyBOP	DMF	t.a.	/
PS-PPh ₂ / DIAD	THF	t.a.	/

SOCl ₂	DMF	70 °C	/
EDC / DMAP	DMF	65 °C	10 %
HATU	DMF	t.a.	/
EDC / DMAP	DMF	120 °C (μw)	/
(EtO) ₂ POCN	DMF	t.a.	10 %
DCC / DMAP	DMF	t.a.	75 % de N-acylurée

Finalement, nous avons eu recours à une réaction de Mitsunobu, déjà utilisée pour ce type de couplage en version fluorée par Kappe & *al.*⁶. Du point de vue technique, la purification est compliquée par la présence d'alcool **152** non converti, qui s'avère impossible à séparer de **149**. Une oxydation du mélange avec du PCC est alors requise et permet alors une purification aisée de **149**, finalement obtenu avec un rendement de 38 %. La fin de la synthèse est accessible en trois étapes (Figure 59) :

- Une déprotection du groupement BOC en conditions acides à froid. Le contrôle de cette réaction est compliqué et l'on observe une dégradation immédiate en utilisant le TFA. Finalement, en utilisant l'acide chlorhydrique (3 M dans le dioxane), l'amine **154** est obtenue sans purification avec un rendement de 45 %.
- Ensuite, une amination réductrice sur un équivalent d'aldéhyde **142** en présence de 3 équivalents de triacétoxyborohydrure de sodium permet d'introduire la fonction photoactivable. L'amine secondaire **155** est ainsi formée avec un rendement de 35 % après chromatographie en phase normale.
- Enfin, un couplage de type peptidique avec l'acide desthiobiotinylé **141** en présence de HATU et de DIEA permet d'obtenir la sonde finale **139** avec un rendement de 55 %.

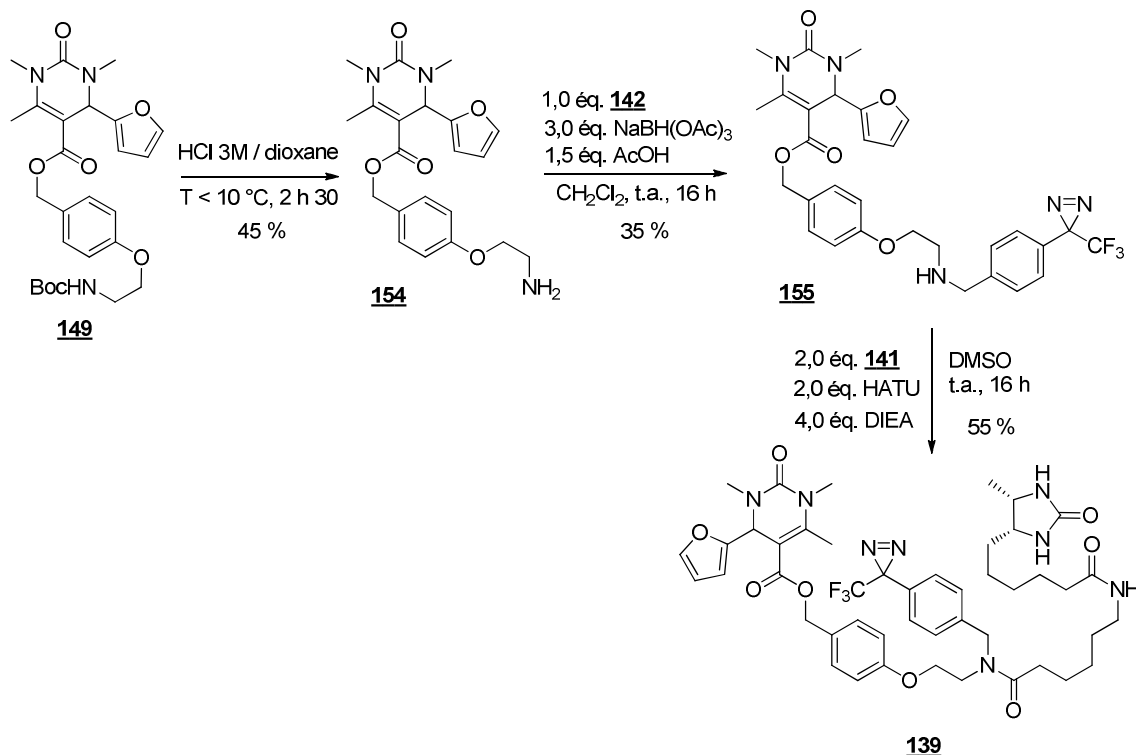


Figure 59 : Dernières étapes de synthèse de 139

Le pouvoir inhibiteur de cette sonde doit ensuite être testée pour nous assurer qu'elle reste active sur la cible d'*ITB₉*. Les mesures d'*IC₅₀* ont donc été réalisées sur les intermédiaires de synthèse ainsi que la sonde finale et sont présentées dans le Tableau 32.

Tableau 32 : *IC₅₀* de la sonde 139 et des intermédiaires de synthèse. Les *IC₅₀* d'*ITB₉* et du composé 136, sur lequel la sonde sont rappelés à titre indicatif.

Composé	<i>ITB₉</i>	<u>136</u>	<u>149</u>	<u>154</u>	<u>155</u>	<u>139</u>
<i>IC₅₀</i> (μM)	0,089	0,0016	67	40	6,3	0,20

On observe que les deux premiers intermédiaires 149 et 154 sont très peu actifs, particulièrement vis-à-vis de l'analogue de départ, 136. Cependant, nous ne disposons pas de beaucoup d'informations concernant la position 4 du groupe benzyle en *R₅*, et il n'est donc pas surprenant que ces deux analogues soient peu actifs : 149 possède un groupe encombrant et 154 une amine primaire, nucléophile et protonable en milieu biologique. En revanche, l'*IC₅₀* de 155 est diminué d'un facteur 6 par rapport à 154, et celui de 139 d'un facteur 30 par rapport à 155. La sonde dérivée d'*ITB₉* possède donc un *IC₅₀* de 0,20 μM, soit une activité similaire à celle d'*ITB₉*. Elle peut donc être utilisée pour réaliser des expériences de photomarquage, qui seront présentées en partie 5.e de ce chapitre.

d. Synthèse de la sonde **140**

De la même façon, la deuxième sonde **140** nous a paru accessible en trois étapes à partir de l'intermédiaire **156**, lui-même obtenu par réaction de Biginelli à partir du cétoester **C37** (Figure 60).

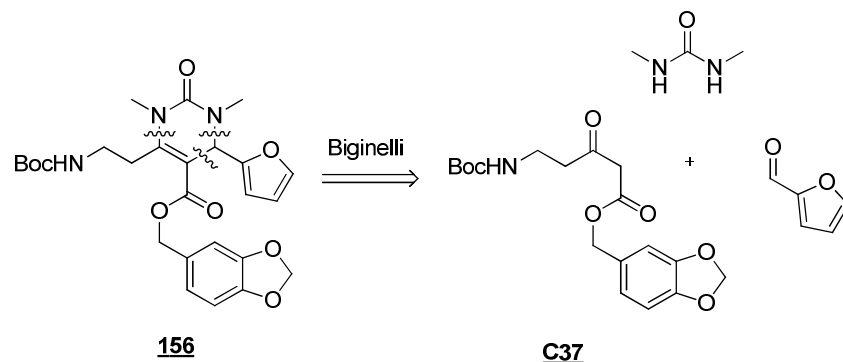


Figure 60 : Rétrosynthèse de l'intermédiaire **156**

Dans un premier temps, le cétoester **C37** est donc synthétisé comme indiqué sur la Figure 61 : l'acylation de l'acide de Meldrum avec la *N*-Boc- β -alanine⁹ permet de fournir l'intermédiaire acylé, dont l'ouverture en présence d'un excès de pipéronyl alcool à reflux du toluène¹⁰ conduit au cétoester **C37** avec un rendement global de 52 % sur deux étapes après chromatographie.

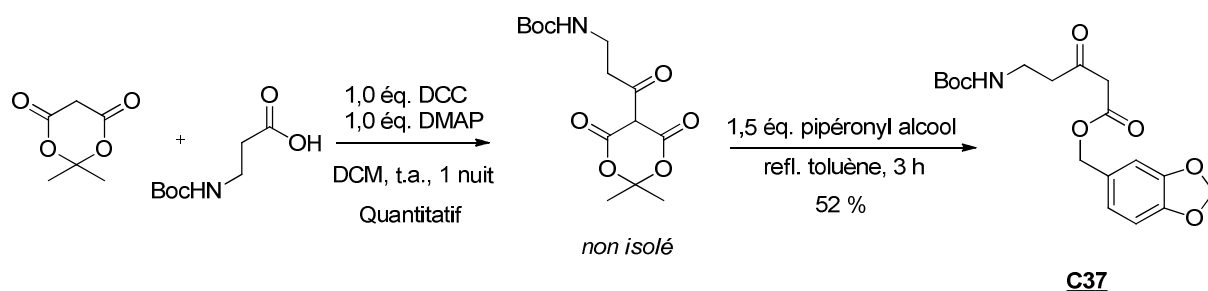


Figure 61 : Synthèse de **C37**

C37 est ensuite engagé dans une condensation de Biginelli avec la diméthylurée et le 2-furaldéhyde : toutefois, malgré la diversité des conditions utilisées (température, charge catalytique, nature du catalyseur...), nous n'avons jamais observé le produit attendu **156**. Des proportions variables pouvant aller jusqu'à 50 % de produits de condensation de type Knoevenagel **157** sont en revanche observées. La condensation de **157** avec la diméthylurée ne s'effectue toutefois pas non plus dans les conditions testées (Figure 62). Nous avons émis l'hypothèse du clivage du groupement BOC par le catalyseur acide de Lewis dans les conditions utilisées, mais celle-ci semble infirmée par l'absence de produits issus de la déprotection de **156** ou **157**.

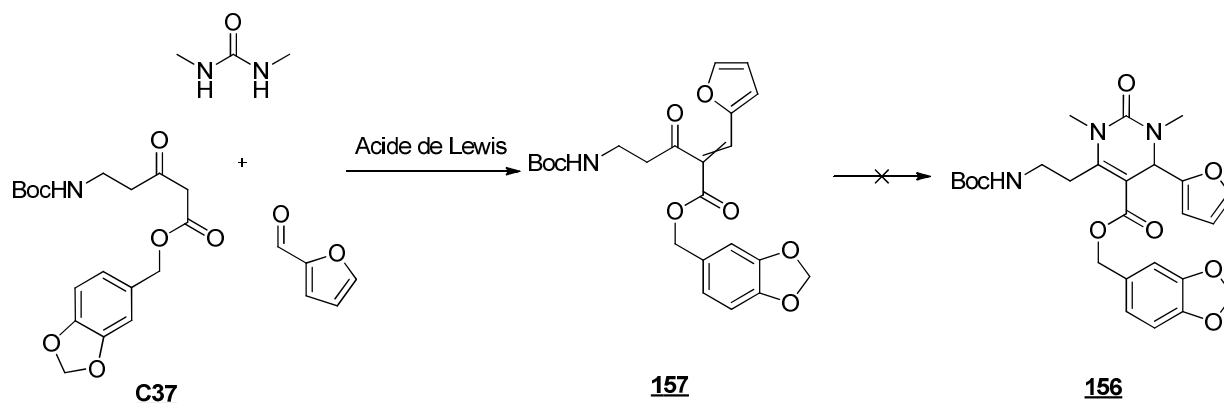


Figure 62 : Tentatives de synthèse de **155**

Nous avons donc écarté cette voie de synthèse pour nous consacrer à une seconde voie présentée en Figure 63 : il s'agit cette fois de réduire l'espaceur en C₆ à un seul chaînon carboné et de former directement l'amine primaire **158** pour y brancher les groupes **141** et **142**. **158** est accessible *via* une réaction de Staudinger sur l'azoture **159**, lui-même formé par substitution nucléophile sur le dérivé bromé **160**.⁴⁷

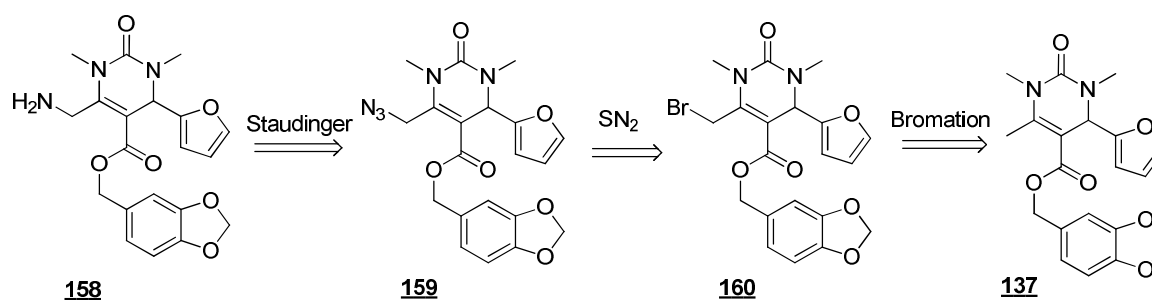


Figure 63 : Rétrosynthèse du composé **158**

Le composé **160** a donc été dans un premier temps formé par bromation quantitative de **137** en position vinylique, en présence de NBS et d'un initiateur radicalaire (peroxyde de benzoyle, Figure 64). Une substitution nucléophile par l'azoture de sodium dans le diméthylformamide permet alors d'obtenir l'azoture **159** avec un rendement de 55 %. Ce dernier est engagé dans une réaction de Staudinger⁴⁸ : en présence de triphénylphosphine et d'eau⁴⁹, l'iminophosphorane **159a** est formé en quelques heures mais semble extrêmement stable ; en effet, nous ne sommes pas parvenus à trouver des conditions de clivage, même en conditions acides et en augmentant la température. Nous avons également tenté des essais en utilisant le triéthylphosphite comme réducteur ; dans ces conditions, l'iminophosphorane **159b** est effectivement clivé en **158**, mais ce dernier se cyclise spontanément en amide **161**, à température ambiante et à pH neutre.

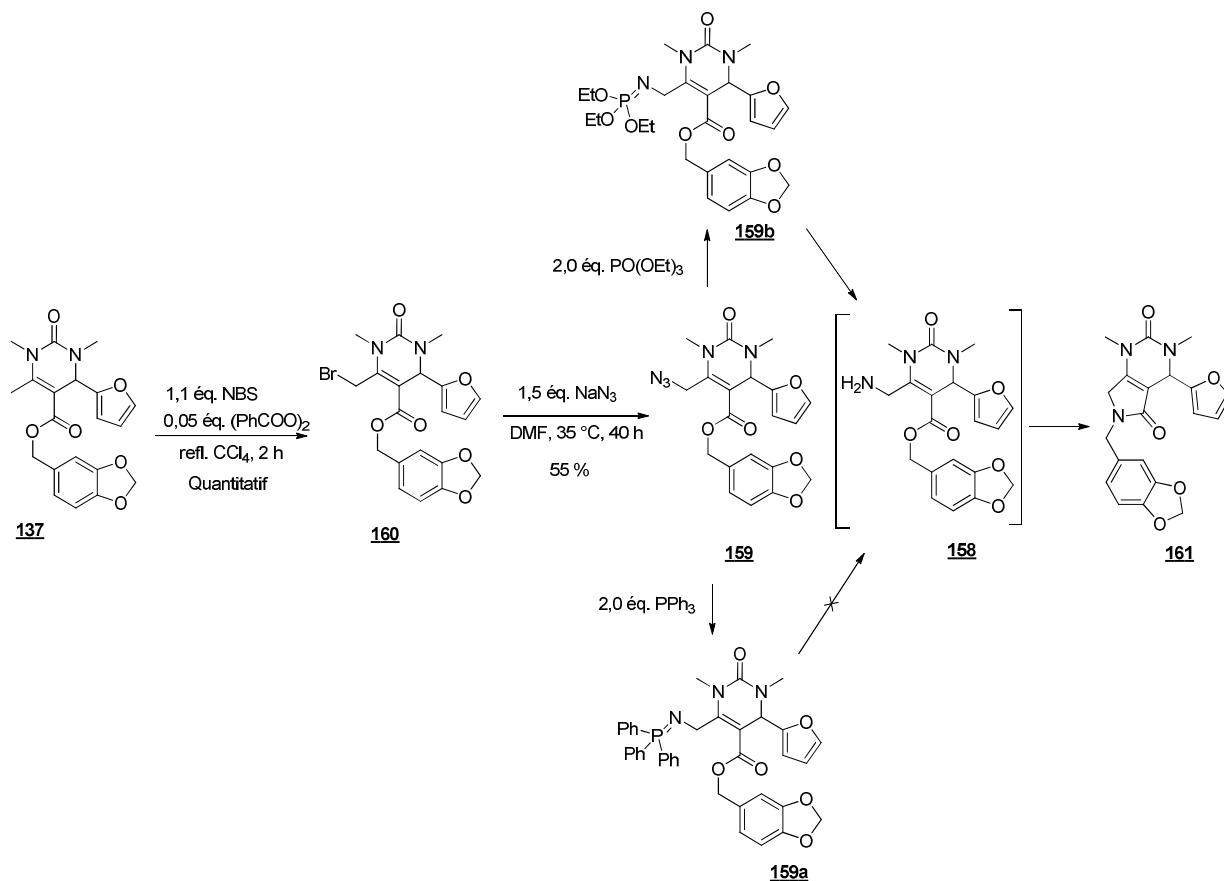


Figure 64 : Synthèse de **159** et tentatives de réaction de Staudinger

Devant ces difficultés synthétiques et par manque de temps, la synthèse d'une sonde de type **139** a donc été interrompue. Notons toutefois que le composé **159** constitue un point de départ intéressant pour une sonde photoactivable de ce type : il possède en effet une fonction azote terminale sur laquelle peuvent être greffées des fonctionnalités par réaction de type *click*. Afin de valoriser ce composé, il a été testé sur l'incorporation d'iode, et l'IC₅₀ déterminé est de 0,03 μM : cette valeur est tout à fait satisfaisante et permet d'envisager *a priori* l'emploi de ce type de sonde pour du photomarquage d'affinité lors de travaux ultérieurs.

e. Photomarquage d'affinité

i) Principe et conditions

La synthèse de **140** ayant été abandonnée, nous ne disposons que d'une sonde dérivée d'ITB₉ pour tenter d'identifier la protéine-cible de cet inhibiteur, le composé **139** (IC₅₀ = 0,20 μM). Un ensemble de conditions optimales mises au point par le Dr. Waltz pendant sa thèse⁵⁰ a mené à l'identification de protéines-cibles d'ITB₅. Nous avons donc dans un premier temps adopté un protocole similaire, détaillé en partie expérimentale (Figure 65) :

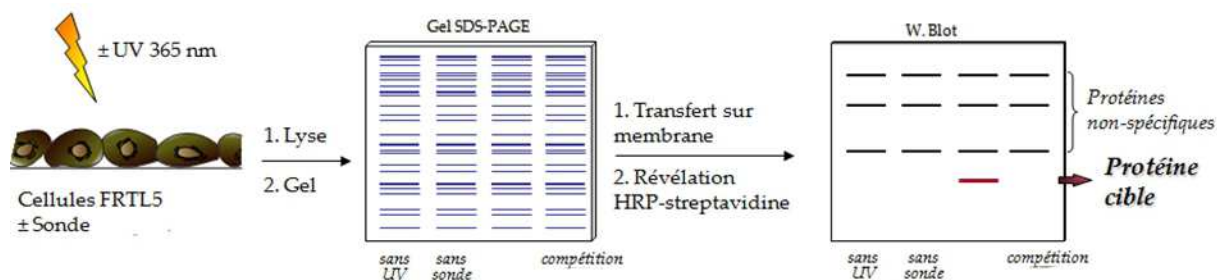


Figure 65 : Schéma général des expériences de photomarquage

- Des cellules FRTL-5 en boîtes de Pétri sont incubées pendant 10 minutes en présence de sonde, puis irradiées pendant 4 minutes pour former le complexe covalent [sonde + protéine]. Cette manipulation revient à marquer de manière irréversible la (ou les) protéine(s)-cible(s) avec une étiquette desthiobiotine.
- Les cellules sont ensuite lysées et la quantité de protéines totales de chaque échantillon est déterminée par dosage à l'acide bicinchoninique.
- 40 µg de protéines de chaque échantillon sont déposés sur gel SDS-PAGE (5 % - 12 %) et, après électrophorèse, transférés sur membrane PVDF (western-blot).
- La membrane est incubée avec une solution de streptavidine couplée à l'enzyme HRP (250 ng/mL) ; ce complexe protéique va se fixer uniquement sur les protéines biotinylées (dont les protéines-cibles) via la forte interaction biotine / avidine.
- L'activité de la HRP est détectée par chimioluminescence et l'impression sur film photographique permet d'obtenir un cliché des bandes ainsi révélées.

Dans notre cas, si une protéine est marquée par la sonde **139**, une bande supplémentaire devrait apparaître par rapport à une expérience contrôle sans photomarquage. Par ailleurs, afin de s'assurer de la spécificité du marquage, des expériences de compétition sont également réalisées : une pré-incubation des cellules pendant dix minutes avec une concentration plus élevée (d'un facteur 10 à 100) de l'inhibiteur **137** doit conduire à la saturation des poches de fixation de la protéine-cible. Ainsi, on doit en théorie observer lors de ces expériences l'extinction de la bande supplémentaire.

ii) Résultats

Compte tenu de l' IC_{50} de la sonde **139** (IC_{50} [**139**] = 0,2 µM), les premiers tests ont été réalisés avec trois concentrations de sonde différentes : 0,1 µM, 1 µM et 10 µM. La variation de ce paramètre nous permet de sélectionner la concentration donnant une intensité de signal correct ; en effet, l' IC_{50} mesuré lors du test cellulaire n'est pas une évaluation stricte de l'affinité pour la cible protéique, mais est également modulé par les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques du composé. Par ailleurs, la faible abondance éventuelle de la protéine-cible peut en compliquer la détection, d'où la nécessité de travailler avec des concentrations relativement élevées. En conséquence, les concentrations en compétiteur **137** adaptées pour chacune des concentrations en **139** sont les

suivantes : 10 μ M, 100 μ M et 100 μ M. Dans chacun des cas, l'excès de compétiteur libre est d'un facteur au moins 10, l'accès aux hautes concentrations étant limité par la solubilité du composé **137** dans les tampons aqueux. Sur le film présenté en Figure 66 ne figure que l'expérience à 10 μ M, la seule donnant une intensité de signal correcte.

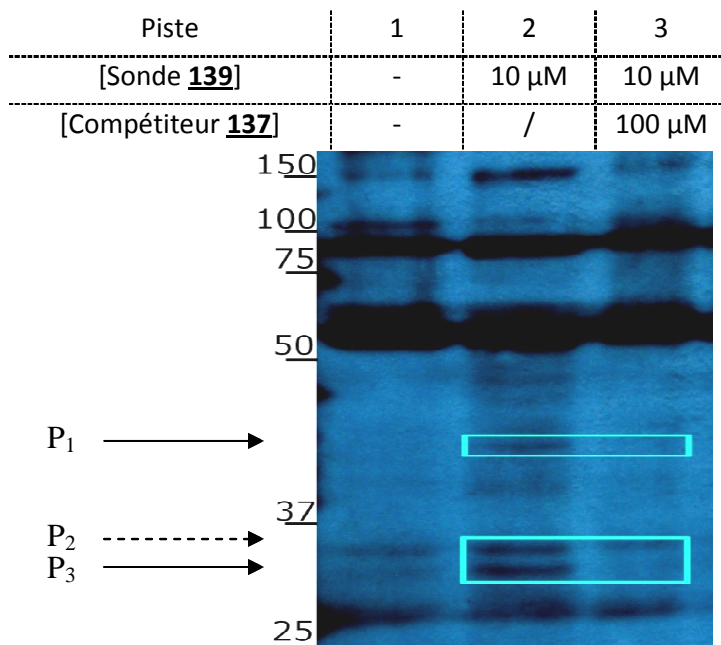


Figure 66 : Film photo obtenu après 4 minutes d'irradiation, à 10 μ M de sonde, en présence ou en absence de compétiteur. En piste 1, un contrôle sans sonde ; en piste 2 et 3, les protéines marquées respectivement en absence et en présence de compétiteur.

Outre quelques bandes d'intensité importantes correspondant à des protéines naturellement biotinyllées, on observe qu'au moins deux bandes semblent marquées par la sonde **139**. Leurs positions respectives sur la membrane sont indiquées par des flèches et elles seront désignées P₁ et P₃ : en effet, elles sont absentes de la piste 1 où la concentration de sonde est nulle. D'autre part, leur intensité diminue fortement jusqu'à quasi-extinction lorsqu'une pré-incubation est réalisée avec un excès de compétiteur (piste 3) : on peut donc raisonnablement penser que ces bandes correspondent à deux protéines marquées spécifiquement par la sonde **139** et qu'elles sont également des cibles des inhibiteurs dérivés d'ITB₉. Notons par ailleurs que leur poids moléculaire est respectivement d'environ 30 kDa et 40 kDa. En revanche, l'interprétation est moins évidente pour la protéine P₂ : cette bande semble en effet présente dans la piste 1 – quoique en moindre intensité – et l'extinction sur la piste 3 n'est pas aussi marquée que pour P₁ et P₃. Afin de pouvoir s'assurer de la spécificité du marquage sur cette protéine, il apparaît nécessaire d'augmenter le rapport signal sur bruit. Dans cette optique, nous avons tenté de photomarquer directement des lysats cellulaires et non des cellules entières. En effet, bien que la protéine-cible puisse être membranaire, l'utilisation de lysats offrait toutefois la possibilité de travailler avec des échantillons plus concentrés en protéines et d'utiliser une quantité moins importante de sonde, ce qui permettait d'augmenter la spécificité du marquage. Le film correspondant à cette expérience complémentaire est présenté en Figure 67.

Piste	1	2
[Sonde 139]	10 μ M	10 μ M
[Compétiteur 137]	/	100 μ M
Matériel cellulaire	Lysats	

Figure 67 : Film photo de l'expérience effectuée sur lysats cellulaires.
En pistes 1 et 2, les expériences sur lysats cellulaires avec [**139**] = 10 μ M.

La comparaison de ce film avec celui obtenu dans la figure précédente montre que l'efficacité du marquage sur lysats est nettement moindre que celle obtenue sur cellules entières. En effet, les bandes P₁ et P₃ sont presque absentes de la piste 1. Il est donc souhaitable de travailler sur cellules entières et nous adopterons donc par la suite ces conditions opératoires. Cependant, cette observation est intéressante dans la mesure où elle permet d'émettre l'hypothèse de cibles protéiques membranaires ; en effet, si la protéine est moins accessible à la sonde après l'étape de lyse, elle a sûrement été altérée ou éliminée lors de ce processus. Or, cette situation est fréquemment rencontrée dans le cas de protéines membranaires. Toutefois, en l'absence d'expériences de localisation et d'identification plus poussées, nous ne pouvons pas approfondir cette hypothèse.

f. Conclusion

Dans cette partie, nous avons donc conçu deux sondes photoactivables grâce aux résultats de l'étude SAR réalisée sur la famille d'ITB₉. Après synthèse du groupement trifluorométhyl-diazirine et de l'étiquette desthiobiotinylée, nous avons tenté de synthétiser ces deux sondes ; seule une synthèse a cependant pu être menée à terme. La sonde ainsi obtenue conserve une activité suffisante pour effectuer des expériences de photomarquage d'affinité (IC₅₀ [**139**] = 0,2 μ M). Ces dernières ont donc été effectuées et ont mené au marquage spécifique d'au moins deux protéines appelées P₁ et P₃, de poids moléculaire 30 kDa et 40 kDa, qui constituent *a priori* des cibles de la famille ITB₉, mais dont l'implication éventuelle dans les mécanismes de transport d'iode reste à

préciser. Par ailleurs, une troisième protéine P₂ pourrait également être marquée mais de manière plus discrète. Les expériences sur lysats s'étant révélées infructueuses, il serait intéressant de reproduire ces résultats avec des concentrations de sonde plus élevées – en veillant toutefois à ne pas trop augmenter l'intensité des bandes correspondant à des protéines marquées de manière non spécifique.

6. Conclusion générale et perspectives

Tout au long de ce chapitre, nous avons exposé l'ensemble des travaux réalisés sur le composé *ITB*₉. A partir de cette tête de file - dont l'activité a été évaluée à 0,089 µM contre le transport de l'iode dans les cellules FRTL-5 – nous avons conçu et synthétisé 111 analogues « de première génération » par chimie parallèle, en utilisant la réaction multicomposants de Biginelli. Ces derniers comportent chacun un point de diversification par rapport à *ITB*₉ et leur évaluation biologique a permis d'accéder à un ensemble de relations structure-activité approfondi :

- La partie Nord est assez variable, avec X = O ou S, R₁ = H ou Me, R₃ = H ou Me. Des substituants plus encombrés en R1 diminuent l'activité.
- La partie Est est très sensible à la nature du substituant : les hétérocycles oxygénés ou soufrés à cinq chaînons permettent en particulier d'améliorer l'activité jusqu'à un facteur 30 (IC₅₀ [49] = 3,2 nM).
- La partie Sud est assez variable sous réserve de conserver le motif benzyle. Les substituants préférentiels sur ce cycle sont un méthoxy- en position 3 ou 4, ou un pont 3,4-méthylènedioxy-. L'influence du lien ester en C₇ n'est cependant pas claire.
- La partie Ouest est assez peu sensible à la nature du substituant, bien que les petites chaînes alkyles soient préférées.

Cette étude SAR n'est bien sûr pas exhaustive et mériterait d'être approfondie, particulièrement au niveau de la partie Nord – l'atome d'azote N₃ n'ayant pas été exploré seul - et de la partie Ouest. Au vu des résultats obtenus sur la partie Est, il serait également souhaitable d'étudier l'impact d'autres hétérocycles à 5 chaînons en R₄ sur l'activité biologique (isoxazole, thiazole...).

Nous avons également déterminé la stéréochimie préférentielle du carbone asymétrique C₄ par dichroïsme circulaire : celle-ci est (S) dans *ITB*₉. A partir de ces informations, nous avons alors conçu et synthétisé une dizaine d'analogues « de seconde génération », comportant plusieurs modifications par rapport à la structure initiale, et dont l'activité biologique a également été évaluée. Six d'entre eux se sont révélés particulièrement actifs, avec un IC₅₀ inférieur à 5 nM (IC₅₀ [135] = 65 pM) ; en outre, ces composés possèdent en première approche un profil pharmacologique satisfaisant, permettant d'envisager leur utilisation à des fins thérapeutiques. Outre la synthèse d'autres analogues mixtes qui pourraient se révéler également actifs (en série X = S et/ou R₆ = Et notamment), cette étude reste à compléter par l'acquisition de données pharmacologiques

expérimentales. Des informations de type pharmacocinétique ou pharmacodynamique sur un modèle *in vivo* permettraient en effet de confirmer le potentiel thérapeutique de cette famille.

Enfin, à partir de ces analogues, une sonde comportant un groupe photoactivable de type trifluorométhyl diazirine et une étiquette desthiobiotine a été synthétisée afin de réaliser des expériences de photomarquage d'affinité. Celles-ci ont conduit au marquage spécifique d'au moins deux protéines P₁ et P₃, de poids moléculaire respectifs 30 kDa et 40 kDa environ ; par ailleurs, une troisième protéine P₂ - dont la spécificité du marquage reste à confirmer - peut aussi être distinguée, bien que de manière moins formelle. Ces protéines représentent en première approche des cibles thérapeutiques potentielles, qu'il faudrait toutefois isoler puis identifier par spectrométrie de masse. L'implication dans le transport de l'iode devrait ensuite être confirmée par des tests fonctionnels. Pour cela, des expériences similaires à celles qui ont conduit à l'identification des cibles d'ITB₉ par le Dr. Waltz sont en cours de réalisation : il s'agit de purifier au maximum l'échantillon en bandes P₁ et P₃ (et éventuellement P₂) en éliminant les bandes non-spécifiques par une série de lavages et d'élutions sur billes d'avidine; ensuite, une digestion trypsique suivie de l'identification en spectrométrie de masse des peptides ainsi obtenus permet une comparaison avec les bases de données. Une fois les protéines ainsi identifiées, des expériences de validation fonctionnelle (inhibiteurs spécifiques, siRNAs...) peuvent être envisagées pour confirmer que ces protéines interviennent dans les mécanismes d'incorporation d'iodures dans les thyrocytes.

Références bibliographiques

- ¹ Lecat-Guillet N, Merer G, Lopez R, Pourcher T, Rousseau B, Ambroise Y, *ChemBioChem* **2008**, 9, 889-895
- ² Kolosov MA, Orlov VD, Beloborodovet DA, Dotsenko VV, *Mol. Divers.* **2009**, 1, 5-25
- ³ Pisani L, Prokopcova H, Kreamsner JM, Kappe CO, *J. Comb. Chem.* **2007**, 9, 415-421
- ⁴ Ranu BC, Hajra A, Jana U, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 6270-6272
- ⁵ Hu EH, Sidler DR, Dolling UH, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3454-3457
- ⁶ Desai B, Dallinger D, Kappe CO, *Tetrahedron* **2006**, 62, 4651
- ⁷ Ma Y, Qian C, Wang L, Yang M, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 3864-3868
- ⁸ Sridharan V, Ruiz M, Carlos Menéndez JC, *Synthesis* **2010**, 6, 1053-1057
- ⁹ Kai K, Tani A, Hayashi H, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 3776-3782
- ¹⁰ Dollé F, Hinnen F, Valette H, Fuseau C, Duval R, Pégliion JL, Crouzel C, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 4, 749-764
- ¹¹ Shamshin VP, Aleshina VA, Sukhanova SA, Kabanova TI, *Pharm. Chem. J* **2001**, 35(7), 3-6
- ¹² Yamamoto K, Chen YG, Buono FG, *Org. Lett.* **2005**, 21, 4673-4676
- ¹³ Biginelli P, *Gazz. Chim. Ital.* **1893**
- ¹⁴ Ambesi-Impimbato FS, Parks LAM, Coon HG, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 3455-3459
- ¹⁵ Dai G, Levy O, Amzel LM, Carrasco N, *Chap. 15 : "The Mediator of Thyroidal Iodide Accumulation : The Sodium/Iodide symporter"* in *Handbook of Biological Physics, Vol. 2*, ed. by WN Konings, HR Kaback, JS Lolkema, Elsevier Science, **1996**
- ¹⁶ Waltz F, Pillette L, Ambroise Y, *Anal. Biochem.* **2010**, 396, 91-95
- ¹⁷ Lecat-Guillet N, Merer G, Lopez R, Pourcher T, Rousseau B, Ambroise Y, *Assay Drug Dev. Tech.* **2007**, 5 (4), 535-540
- ¹⁸ Sandell EB, Kolthoff IM, *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, 56, 1426-1426
- ¹⁹ Bilek R, Bednar J, Zamrazil V, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2005**, 43 (6), 573-580
- ²⁰ p. 191, "Molecular variation based on isosteric replacement" in *The Practice of Medicinal Chemistry*, Wermuth GC, **2003**, Elsevier, ISBN : 0-12-744481-5
- ²¹ Moreira Lima L, Barreiro EJ, *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 23-49
- ²² Stella VJ, Borchardt RT, Hageman MJ, Oliyai R, Maag H, Tilley JW, *Prodrugs : Challenges and Rewards*, **2007**, Springer, ISBN : 0-387-49782-X
- ²³ Bansal AK, Khar RK, Dubey R, Sharma AK, *Boll. Chim. Farm.* **2001**, 140 (2), 79-82
- ²⁴ Gong XW, Li JP, Wu JF, Li X, Zhai HM, Feng B, Xu WF, Tang W, *J. Chem. Res.* **2008**, 6, 327-330
- ²⁵ Mosmann T, *J. Immunol. Meth.* **1983**, 1-2, 55-63
- ²⁶ Kappe CO, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7201-7204
- ²⁷ Folkers K, Johnson TB, *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, 55, 3781-3791
- ²⁸ Lacotte P, Puente C, Ambroise Y, *ChemMedChem*, sous presse
- ²⁹ Ambroise Y, Lacotte P, demande déposée le 02/07/2012 à l'OEB sous le numéro EP12305793.7
- ³⁰ Kleidernigg OP, Kappe CO, *Tet. Asym.* **1997**, 12, 2057-2067
- ³¹ Krenn W, Verdino P, Uray G, Faber K, Kappe CO, *Chirality* **1999**, 11, 659-662
- ³² Kappe CO, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 879-888
- ³³ Uray G, Verdino P, Belaj F, Kappe CO, Fabian WMF, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 6685-6694
- ³⁴ Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ, *Adv. Drug. Del. Rev.* **1997**, 23, 3-25
- ³⁵ Lajiness MS, Vieth M, Erickson J, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **2004**, 7, 470-477
- ³⁶ Walters WP, Murcko MA, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2002**, 54, 255-271
- ³⁷ Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2615-2623
- ³⁸ Oprea TI, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2000**, 14, 251-264
- ³⁹ Ghose AK, Viswanadham VN, Wendoloski JJ, *J. Comb. Chem.* **1999**, 1, 55-68
- ⁴⁰ a) Rishton GM, *Drug. Discov. Today* **2003**, 2, 86-96 ; b) Rishton GM, *Drug. Discov. Today* **1997**, 2, 382-384
- ⁴¹ Delfino JM, Schreiber SL, Richards FM, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3458-3474

- ⁴² Greene TW, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, **1999**, Wiley & Sons, ISBN : 0-471-16019-9
- ⁴³ Deslongchamps P, Dory YL, Li S, *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 3533-3537
- ⁴⁴ Kouklowski C, "Products Class 8 : 1,3-dioxanes, 1,3-dioxepanes and larger-ring O/O acetals" in *Science of Synthesis*, Vol. 29, **2007**, Thieme editions.
- ⁴⁵ Cirkva V, Boehm S, Oldrich P, *J. Fluor. Chem.* **2000**, *102*, 159-168
- ⁴⁶ Neises B, Steglich W, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *7*, 522-524
- ⁴⁷ Khanetsky B, Dallinger D, Kappe CO, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 884-892
- ⁴⁸ Staudinger H, Meyer J, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *1*, 635-646
- ⁴⁹ Sulake RS, Chen C, Lin HR, Lua AC, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5719-5721
- ⁵⁰ Waltz F, « Etude du transport de l'iode par chémozénomique », **2011**, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, Université Paris-Sud

Chapitre IV : Etude du composé ITB_2

En parallèle des travaux entrepris sur le composé ITB_9 , nous avons également poursuivi ceux initiés sur ITB_2 . Rappelons qu' ITB_2 est, quant à lui, un inhibiteur indirect et réversible du transport d'iodures, dont la cible biologique est *a priori* différente de celle d' ITB_9 .¹ Son IC_{50} a été évalué à 0,3 μ M et il comporte un squelette de type tétrahydro- β -carboline. Dans cette partie, après l'établissement d'une nomenclature de travail et la description des travaux antérieurs réalisés sur ce composé, nous présenterons la synthèse d'analogues « de première génération » ; par la suite, l'établissement des relations structure-activité nous permettra de concevoir des analogues « de seconde génération » ainsi qu'une sonde photoactivable dérivée d'un analogue particulièrement actif.

1. Travaux préliminaires

a. Analyse de la structure d' ITB_2 et nomenclature

ITB_2 est une 1,2,3,4-tétrahydro- β -carboline substituée par un groupement 3-nitrophényle (Tableau 2). Le squelette principal est indiqué en bleu dans la Figure 68 et est constitué de 4 cycles que nous nommerons A, B, C et D. La numérotation des atomes choisie ne respecte pas complètement la nomenclature IUPAC. Ainsi, C_1 désignera le carbone asymétrique du cycle C, sur lequel est branché le cycle D. Les deux atomes d'azote seront appelés N_2 et N_{12} , tandis que les atomes de carbone du cycle D seront numérotés C_1' à C_6' . Pour des raisons de clarté, tous les numéros ne sont pas indiqués sur la figure.

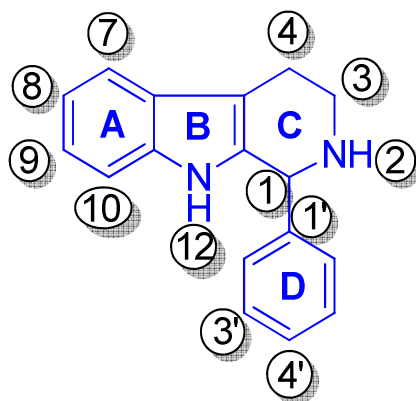


Figure 68 : Numérotation du squelette d' ITB_2

b. Stratégies de synthèse d'analogues d' ITB_2

De manière générale, le squelette des β -carbolines se prête moins facilement à la synthèse parallèle que les dihydropyrimidinones ; de nombreux analogues ont donc été synthétisés de façon individuelle. De la même façon que pour ITB_9 , nous avons souhaité introduire un maximum de diversité sur plusieurs points, en tenant compte des contraintes de coût des synthons et d'accessibilité synthétique des produits (nombre d'étapes < 5). La plupart des analogues d' ITB_2 synthétisés sont définis par la structure de Markush présentée en Figure 69.

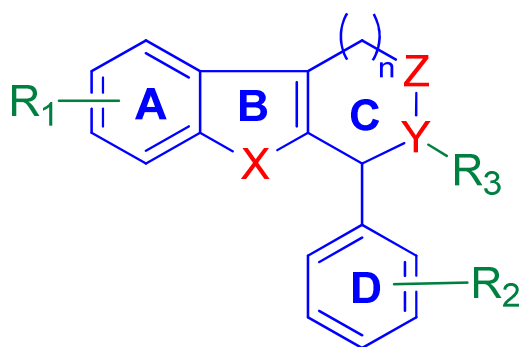


Figure 69 : Structure de Markush des analogues d' ITB_2

- Modification du cycle A : il a été envisagé de substituer ce cycle par des groupements R_1 sans *a priori* sur la position, ainsi que de le remplacer par un cycle aromatique azoté.
- Modification du cycle B : la substitution de l'azote par diverses chaînes permettra de vérifier si une sonde peut être dérivée d' ITB_2 à partir de cette position. Le remplacement de l'hétéroatome X a également été effectué. Enfin, nous avons supprimé le cycle B pour générer des analogues de type isoquinoline.
- Modification du cycle C : ce cycle est le plus « variable » de la série car il est systématiquement le dernier à être formé dans la séquence réactionnelle. Les études de stéréochimie en C_1 seront réalisées ; les atomes Y et Z seront modifiés et Y servira de point d'ancrage au groupe R_3 . Enfin, le degré de saturation du cycle ainsi que la modification de sa taille font également partie des modifications envisagées.
- Modification du cycle D : plus faciles à réaliser du point de vue synthétique, elles sont accessibles en condensant la tryptamine avec des molécules carbonylées diverses par réaction de Pictet-Spengler. La substitution du noyau aromatique D par un ou plusieurs groupes R_2 , ainsi que le remplacement par des alkyles ou des hétérocycles ont ainsi été effectués.

L'ensemble de ces transformations est résumé sur la Figure 70.

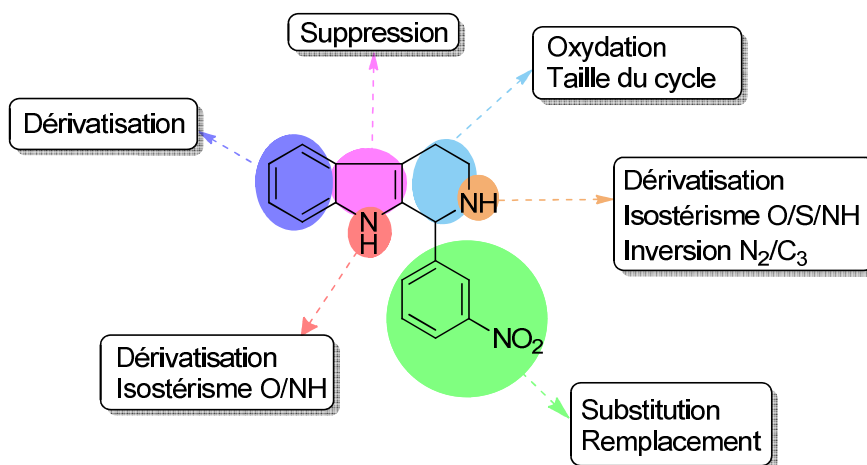


Figure 70 : Transformations envisagées sur ITB_2

c. Travaux antérieurs

ITB_2 a déjà fait l'objet de plusieurs études au laboratoire. Nous présentons ici succinctement ces travaux, sur lesquels nous reviendrons en détail dans chacune des parties où ils seront prolongés.

i) Travaux effectués par le Dr. Verhaeghe²

Au cours de sa thèse, le Dr. Verhaeghe s'est intéressée à la stéréochimie du carbone C_1 et à la synthèse d'une sonde photoactivable. D'une part, l'impact de la stéréochimie sur l'activité biologique a été étudié : les deux énantiomères ITB_2-E_1 et ITB_2-E_2 ont été purifiés par HPLC chirale (Chiralcel OD, hexane/éthanol 9:1) et ont ainsi été obtenus avec une pureté stéréochimique supérieure à 99 %. Ils ont ensuite été testés pour leur activité inhibitrice sur cellules FRTL-5 : l'énantiomère ITB_2-E_1 possède un IC_{50} égal à 0,3 μM , tandis que celui de l'énantiomère ITB_2-E_2 est de 35 μM (rapport eudismique = 116). Une stéréochimie préférentielle en C_1 semble donc nécessaire à l'activité biologique. Cependant, en raison des trop faibles quantités de matériel énantiopur isolé (2-3 mg), la configuration absolue de chacun des énantiomères n'a pas pu être déterminée.

D'autre part, le Dr. Verhaeghe a tenté de synthétiser une sonde photoactivable à partir d' ITB_2 . Pour cela, l'azoture **162** a été conçu par deux voies parallèles indiquées dans la Figure 71. Ce dernier devait être marqué au tritium sur le cycle D, mais la synthèse a été suspendue par manque de temps. Nous retenons pour notre étude SAR la synthèse de deux analogues, l'aniline **163** et l'azoture **162** dont les activités biologiques ont été mesurées respectivement à 10 μM et 0,03 μM . Par ailleurs, nous réutiliserons en cours de synthèse le dérivé protégé **164**.

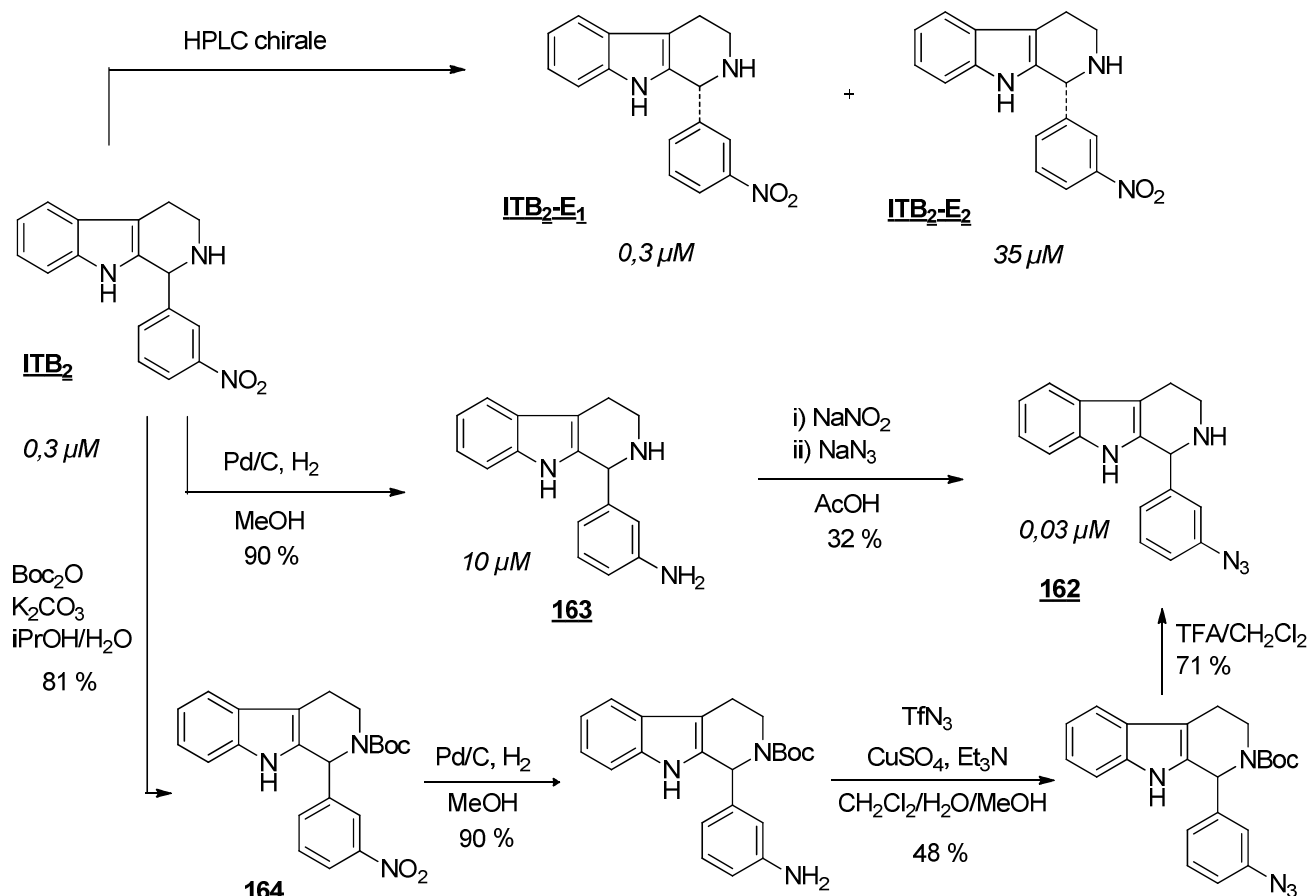


Figure 71 : Travaux réalisés par le Dr. Verhaeghe sur le composé *ITB*₂

ii) Travaux effectués par le Dr. Waltz³

Un des objectifs du Dr. Waltz était de synthétiser une sonde photoactivable dérivée d'*ITB*₂, comportant une trifluorométhyl-diazirine et une étiquette biotinyllée. La sonde a été conçue rapidement sans effectuer d'analyse SAR extensive. L'atome d'azote N₂ constituant un point d'attache particulièrement attractif pour la synthèse, l'analogue acylé **165** a été synthétisé et son activité a été évaluée à 2 μM. Cet IC₅₀ a paru suffisant pour effectuer la synthèse de la sonde **166** que nous ne détaillons pas ici. Cette première sonde possédait une bonne activité biologique (IC₅₀ = 0,2 μM) ; cependant, le photomarquage sur cellules n'a pas permis d'identifier une cible protéique de façon formelle, même en éluant sur billes d'avidine pour éliminer les protéines non spécifiques (Figure 72).

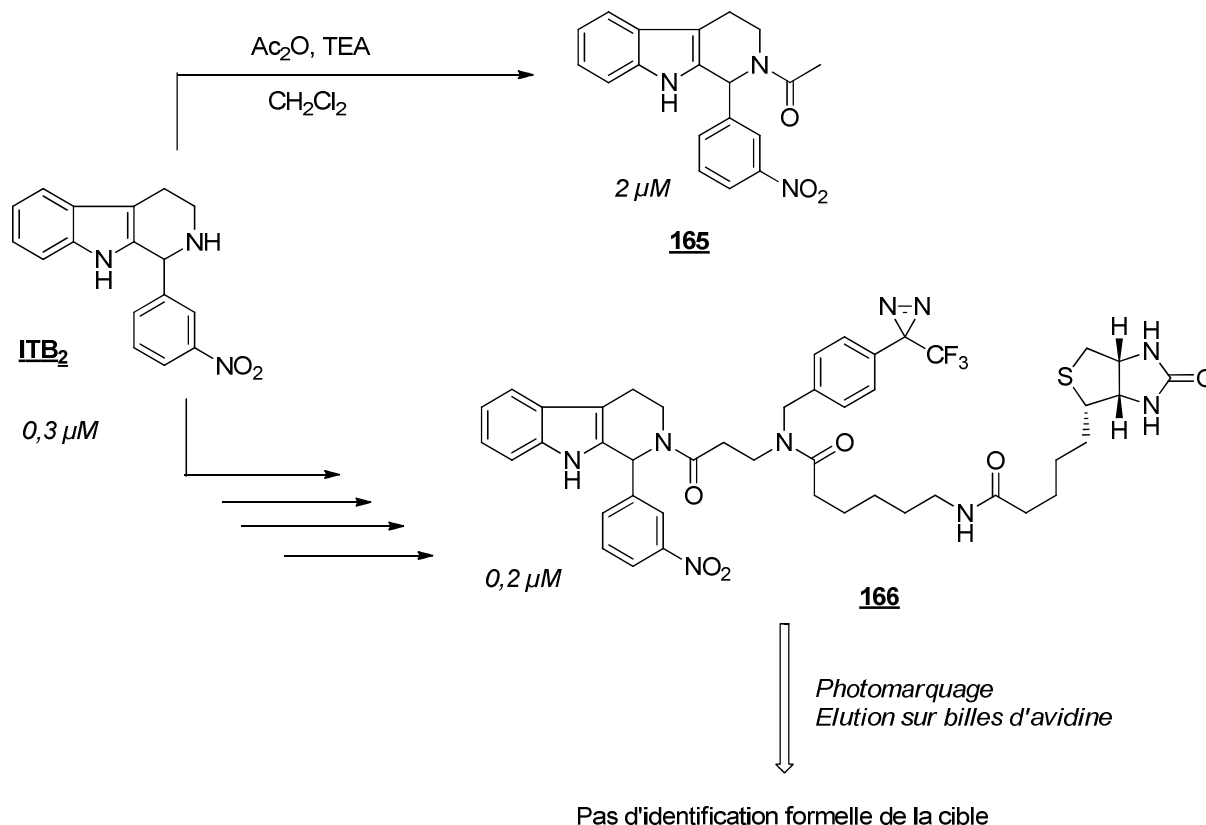


Figure 72 : Travaux réalisés par le Dr. Waltz sur le composé ITB_2

iii) Travaux effectués par le Dr. Y. AMBROISE

Les travaux effectués par le Dr. Ambroise ont consisté à synthétiser ITB_2 par une méthode alternative, la réaction de Bischler-Napieralski (Figure 73, **A**). A partir de l'amide préformé, l'imine **167** est obtenue par cyclisation intramoléculaire en présence de POCl₃. Cet analogue d' ITB_2 doit ensuite être réduit pour accéder à ce dernier.

Par ailleurs, afin d'identifier l'énantiomère actif d' ITB_2 , plusieurs essais de résolution chirale ont été tentés sans succès :

- Le couplage peptidique avec des acides chiraux ((S)-mandélique ou (-)-menthyloxyacétique) n'a pas permis de séparer les diastéréoisomères par chromatographie (Figure 73, **B**).
- L'utilisation de L-tryptophane comme source de chiralité n'a pas non plus permis d'aboutir à la séparation des énantiomères d' ITB_2 (Figure 73, **C**).

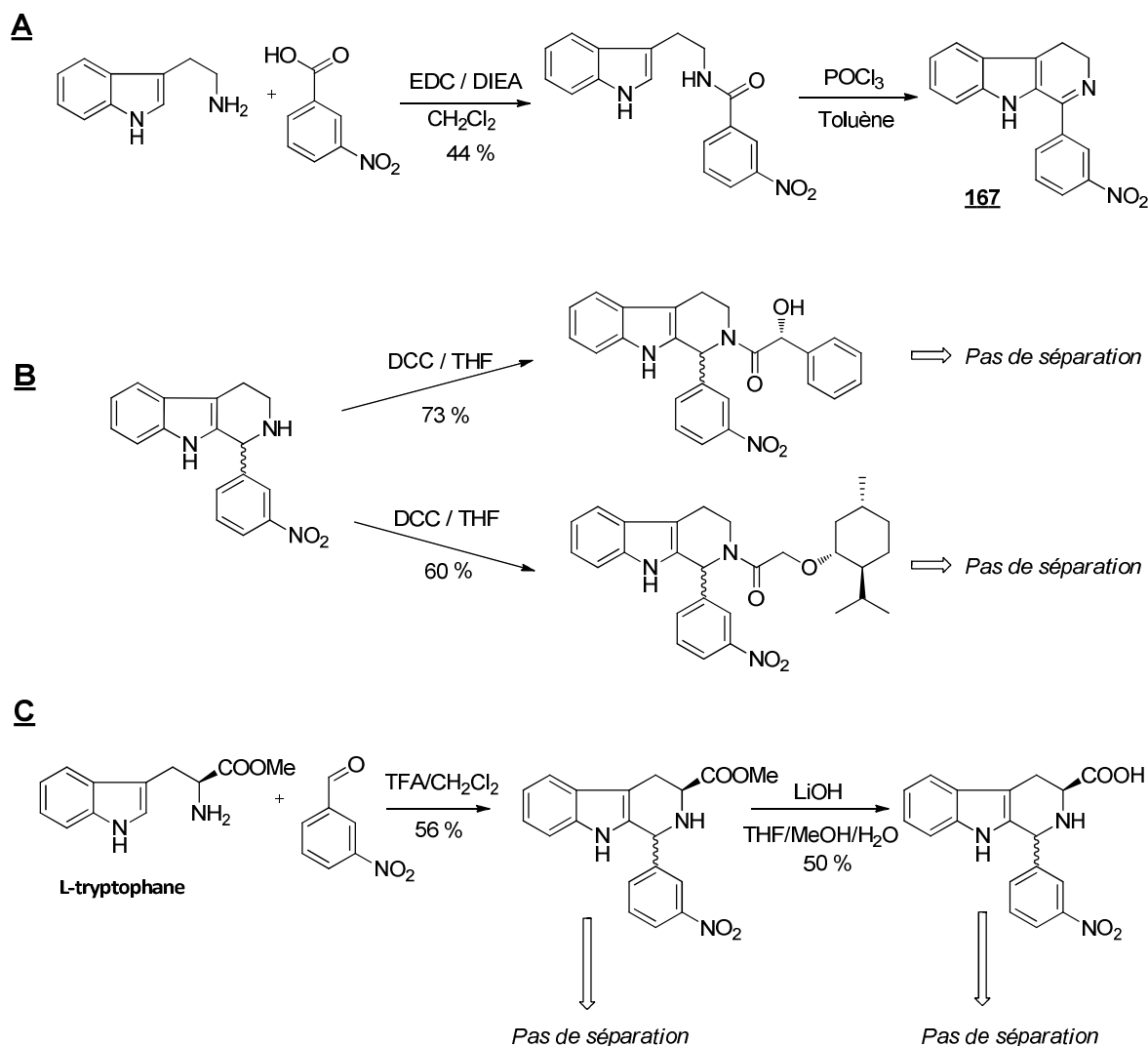


Figure 73 : Travaux réalisés par le Dr. Ambroise sur le composé ITB_2

iv) Travaux effectués par X. MONCHAUSSAT

Sous la direction du Dr. Ambroise, Xavier Monchaussat a commencé à constituer une librairie d'analogues d' ITB_2 modifiés sur le cycle D par synthèse parallèle en utilisant la réaction de Pictet-Spengler (Figure 74). La tryptamine a ainsi été condensée avec 109 aldéhydes commerciaux pour obtenir les analogues d' ITB_2 sous forme de sel de TFA. Après filtration, 62 composés ont une pureté satisfaisante (> 95 % en LC-MS). Aucun d'entre eux n'a été évalué biologiquement.

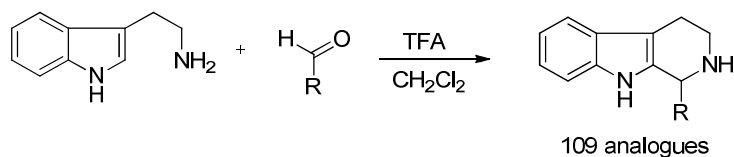


Figure 74 : Synthèse de 109 analogues d' ITB_2 par réaction de Pictet-Spengler

2. Synthèse d'analogues d'ITB₂ « de première génération »

a. Modification du cycle A

En première approche, la modification du cycle A offre de nombreuses possibilités : substitution des atomes C₇ à C₁₀, remplacement par des hétérocycles... Cependant, ayant choisi une voie de synthèse de type Pictet-Spengler, nous avons été limités dans cette approche par la faible disponibilité des synthons : hormis les dérivés de la sérotonine (comportant un oxygène en C₈), le coût élevé des autres synthons (350 € / 500 mg pour la 6-fluorotryptamine par exemple) nous a contraints à limiter les analogues sur ce cycle. Par manque de temps, nous n'avons pas cherché à développer une méthode de synthèse parallèle pour ce type d'analogues. Finalement, le composé **168** a été synthétisé à partir de la 5-méthoxytryptamine et du 3-nitrobenzaldéhyde en présence de 1,3 équivalents de TFA, dans les conditions de synthèse parallèle utilisées par X. Monchaussat. **168**, obtenu avec un rendement de 87 %, est ensuite déméthylé avec du tribromure de bore pour former **169** de façon quantitative (Figure 75).⁴ Notons que la synthèse « directe » de **169** à partir de la sérotonine par réaction de Pictet-Spengler avait été tentée sans succès par le Dr. Verhaeghe.

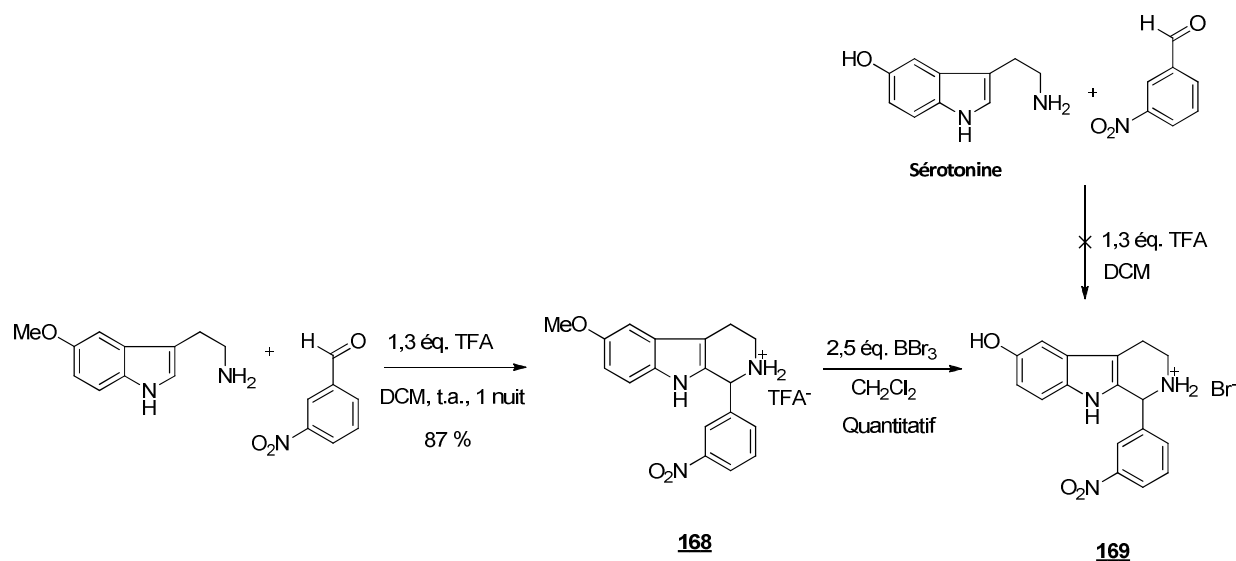


Figure 75 : Synthèse des analogues d'ITB₂ modifiés en A, **168** et **169**

Du fait des contraintes synthétiques, nous nous sommes donc limités ces deux analogues, laissant ainsi le cycle A largement inexploré.

b. Modification du cycle B

i) Isoquinolines

La transformation du squelette tétrahydrocarboline en tétrahydroisoquinoline équivaut à la suppression du cycle B. Il s'agit d'une modification assez importante de la structure d'ITB₂ mais elle est justifiée par les nombreuses propriétés biologiques décrites de cette famille (antagonistes de la mélastatine⁵, inhibiteurs de topoisomérase I⁶, inhibiteurs de CDK4⁷...). Les isoquinolines sont généralement synthétisées par réaction de Bischler-Napieralski à partir d'un amide, qui cyclise en présence de POCl₃ pour former une dihydroisoquinoline.⁸ La réduction de la fonction imine permet enfin d'obtenir la tétrahydroisoquinoline souhaitée (Figure 76).

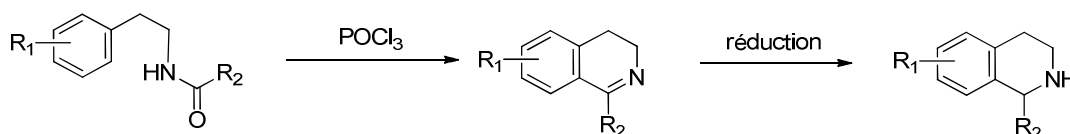


Figure 76 : Synthèse de tétrahydroisoquinolines par réaction de Bischler-Napieralski

Le succès de la cyclisation dépend fortement de la densité électronique de l'arène : les cycles enrichis en électrons forment les imines correspondantes avec de meilleurs rendements et dans des conditions moins drastiques que leurs homologues appauvris en électrons. Nous avons donc effectué la synthèse de quatre analogues d'ITB₂ à partir de phényléthylamines diversement substituées, selon la voie de synthèse exposée en Figure 77 :⁹

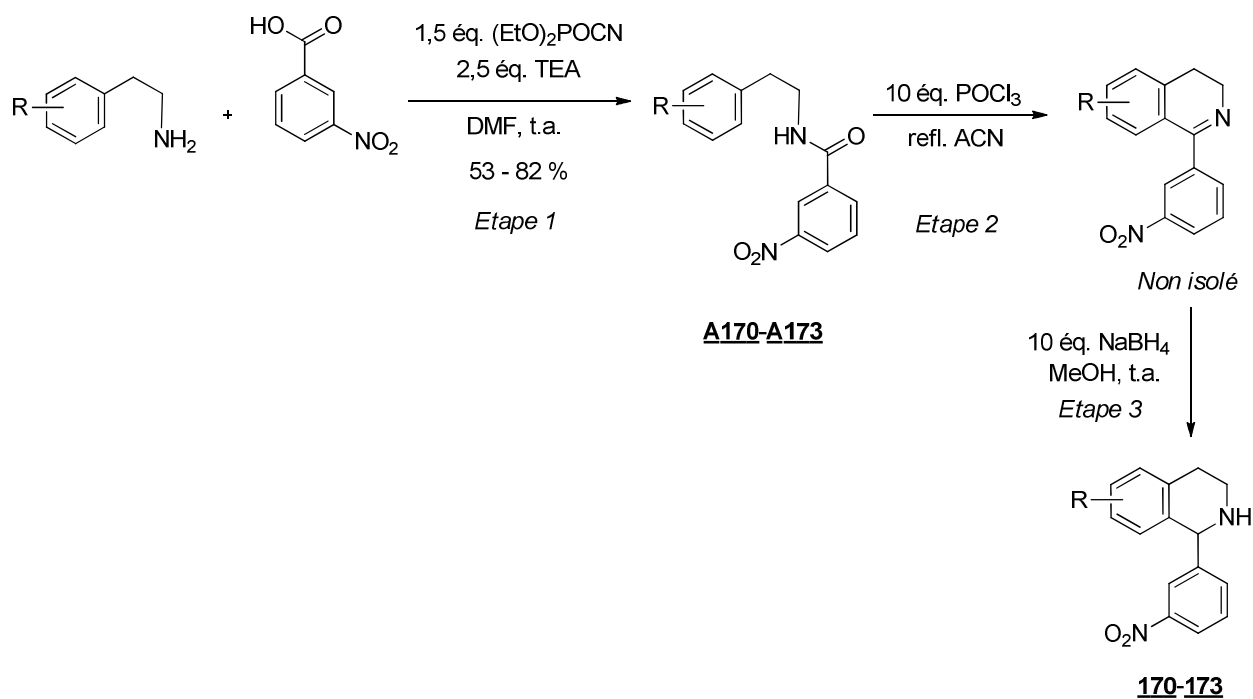


Figure 77 : Voie de synthèse des analogues tétrahydroisoquinolines d'ITB₂

La première étape est un couplage de type peptidique entre une phénéthylamine et l'acide 3-nitrobenzoïque. Les amides **A170** à **A173** ainsi formés sont cyclisés en conditions de Bischler-Napieralski, puis les imines obtenues sont réduites *in situ* pour former les tétrahydroisoquinolines correspondantes. Le Tableau 33 regroupe l'ensemble des réactions qui ont été effectuées :

Tableau 33 : Synthèse d'isoquinolines analogues d'ITB₂, 170-173

Code	R	Rendement étape 1 (%)	Rendement étapes 2 et 3 (%)	Forme
170	H	61	Traces	
171	3-OMe	53	90	Chlorhydrate
172	3,4-OMe	61	41	Amine libre
173	4-NO ₂	82	Traces	

On observe donc bien des différences de réactivité en fonction de la nature du groupe R et de la densité électronique qu'il fournit à l'arène. Les analogues « enrichis » (**171** et **172**) sont isolés avec des rendements variables, mais ceci est dû à des méthodes de purification différentes : les suivis réactionnels par LC-MS montrent dans les deux cas une conversion complète. En revanche, pour les analogues « appauvris » (**170** et **173**), malgré des temps prolongés de réaction, les taux de conversion restent faibles et les analogues – observés à l'état de traces – ne sont pas isolés. Par ailleurs, les premiers résultats biologiques sur **171** et **172** montrant que les tétrahydroisoquinolines sont inactives, cette partie des travaux n'a pas été poursuivie.

ii. Modulation de l'azote N₁₂

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité modifier l'atome d'azote N₁₂, qui constitue un point de dérivatisation relativement accessible. Nous avons donc choisi de fonctionnaliser cet atome avec diverses chaînes afin d'étudier l'effet de la substitution. Par ailleurs, nous avons synthétisé l'homologue oxygéné (Figure 78). La faible accessibilité synthétique de l'analogue soufré (X = S) nous a conduits à l'écartier dans un premier temps.

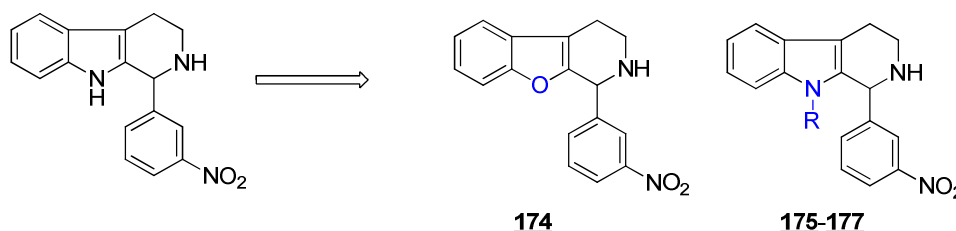


Figure 78 : Modifications envisagées sur le cycle B d'ITB₂

Le composé **174** (Figure 79) a ainsi été synthétisé par réaction de Pictet-Spengler dans les conditions usuelles, à partir de la 2-(benzofuran-3-yl)-éthylamine commerciale. L'analogue est obtenu sous forme de sel de TFA avec un rendement de 48 %.

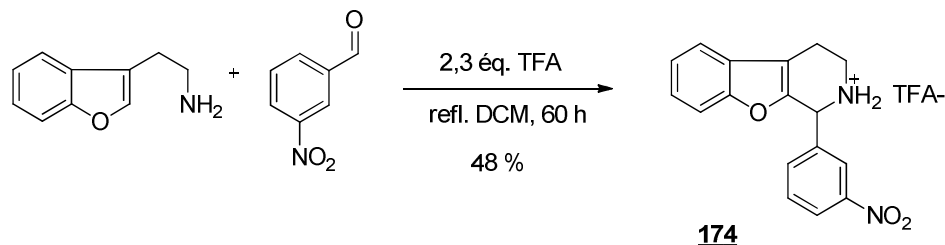


Figure 79 : Synthèse du composé **174**

Ensuite, nous avons souhaité obtenir des analogues d'ITB₂ substitués sur l'atome d'azote indolique N₁₂ (Figure 80, composés **175** à **177**) ; pour cela, la protection préalable de l'azote N₂ s'est avérée nécessaire, aucune méthode d'alkylation régiosélective en N₁₂ n'étant rapportée. Nous avons donc suivi le protocole du Dr. Verhaeghe pour la protection de N₂ par un groupement Boc (Boc₂O, NaOH dans un mélange THF/H₂O); puis, le composé **164** a été déprotoné à l'aide de NaH dans le DMF pour former l'anion indole ; finalement, l'addition de divers iodures d'alkyle permet d'obtenir les composés **178** à **180** avec des rendements variables (38 % à 74 %). Une dernière étape de déprotection dans des conditions classiques (HCl 3 M dans l'acétate d'éthyle) fournit les analogues **175** à **177** de façon quantitative, sous forme des chlorures correspondants.

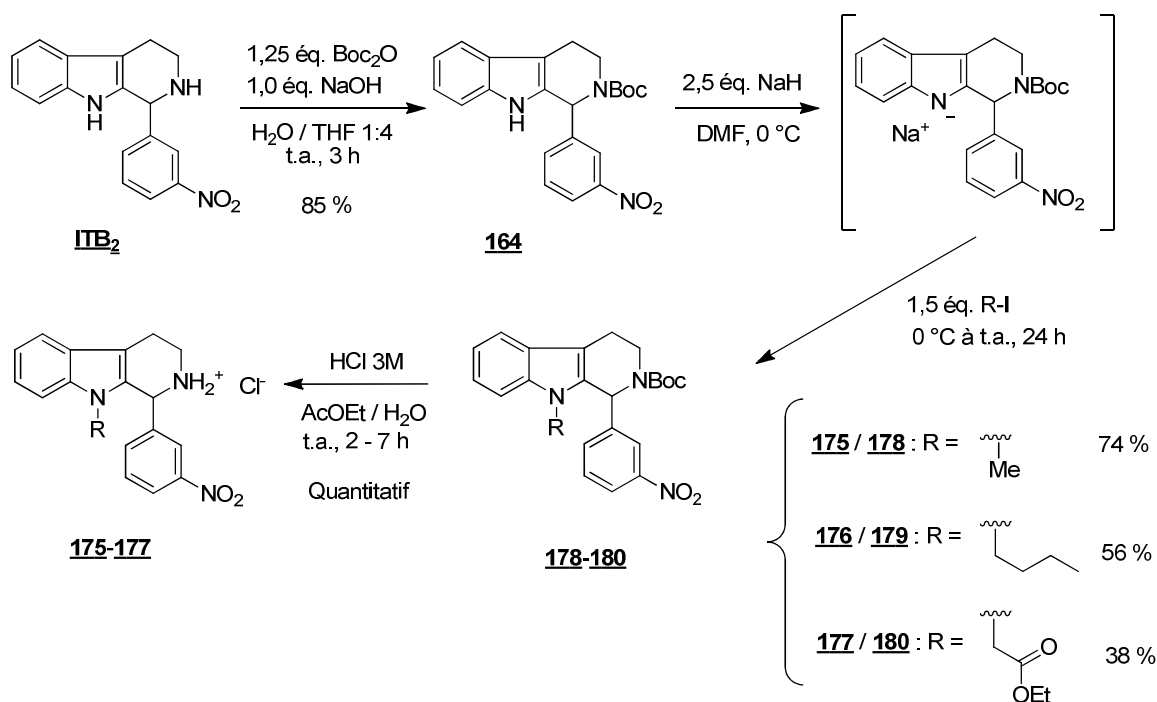


Figure 80 : Synthèse des analogues d'ITB₂ modifiés en B, **175** à **177**

Si la méthylation était la fonctionnalisation minimale de l'azote N₁₂, le choix des autres chaînes s'est fait de manière aléatoire, en fonction des réactifs disponibles au laboratoire.

L'allongement de la chaîne nous a en tous les cas paru nécessaire, dans le cas où N₁₂ pourrait constituer un point d'ancrage des fonctions trifluorométhyl-diazirine et desthiobiotine pour la synthèse d'une sonde photoactivable.

c. Modifications du cycle C

Le cycle C est celui sur lequel les possibilités de variation sont les plus nombreuses. Rappelons brièvement les types de modifications envisagées (Figure 81) :

- La taille du cycle (homologues à 5, 7 ou 8 chaînons) ainsi que son degré de saturation (oxydation partielle ou totale).
- L'atome d'azote N₂ peut être acylé par couplage peptidique ou alkylé par amination réductrice, remplacé par un autre hétéroatome (O, S) ou inversé avec C₃ pour former l'analogue γ -carboline. Ce dernier squelette est également décrit pour des activités biologiques diverses.^{10,11}
- L'impact de la stéréochimie en C₁ sera par contre étudié séparément dans une autre partie de ce manuscrit.

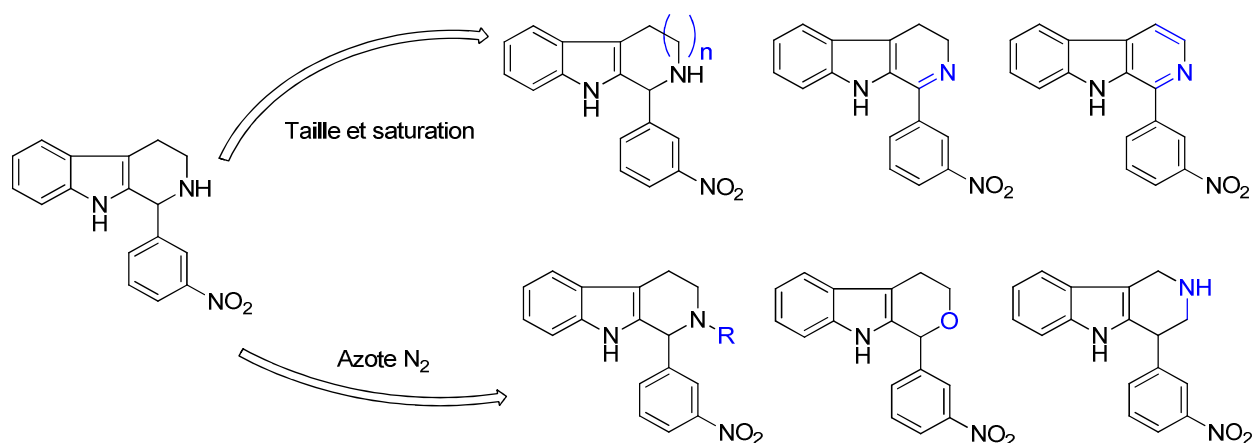


Figure 81 : Modifications envisagées sur le cycle C d'ITB₂

i) Oxydation

En ce qui concerne l'oxydation du cycle C, nous disposons déjà de la dihydro- β -carboline **167**, synthétisée avant le début de ces travaux par le Dr. Ambroise. Rappelons en effet que cette imine est un intermédiaire-clé dans la synthèse de tétrahydro- β -carbolines par réaction de Bichler-Napieralsky. En revanche, l'oxydation totale du cycle C restait à réaliser pour obtenir l'analogue **181** à partir d'ITB₂. Les premières approches avec des oxydants « classiques » (KMnO₄¹², Dess-Martin, IBX¹³) dans les conditions de la littérature n'ont fourni que des mélanges ternaires ITB₂/167/181 ou des produits de dégradation au bout de plusieurs jours de réaction. Nous avons donc utilisé une méthode

décrite pour l'aromatization totale de *N*-tosyl-tétrahydro- β -carbolines :¹⁴ un chauffage prolongé dans le DMSO, en présence d'un équivalent de NaOH, assure une conversion complète et fournit **181** avec un rendement après purification de 85 % (Figure 82).

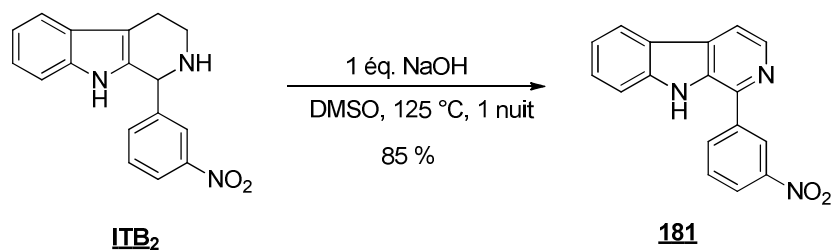


Figure 82 : Synthèse du composé **181**

ii) Extension / réduction du cycle

Dans les modifications possibles du cycle C, il nous a paru intéressant de varier la taille de ce dernier en synthétisant les homologues à 5, 7 et 8 chaînons. Ces homologues possèdent en effet une géométrie modifiée qui peut permettre d'améliorer l'affinité pour la cible biologique. Cette approche a été utilisée avec succès sur des analogues tétracycliques de la mélatonine¹⁵ ou des analogues de l'enalaprilat¹⁶ qui sont présentés en Figure 83.

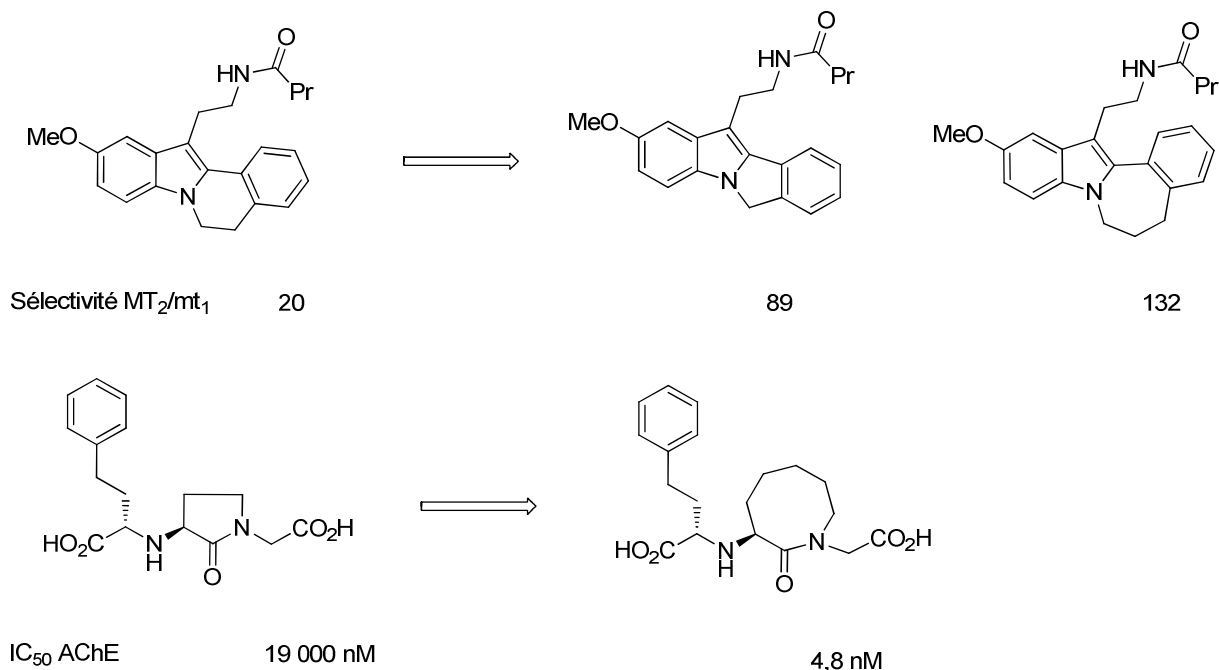


Figure 83 : Exemples d'homologies de cycles saturés. En haut, des analogues tétracycliques de la mélatonine montrent une sélectivité pour le récepteur MT₂ par rapport au récepteur mt₁ augmentée d'un facteur 4 à 7. En bas, un analogue cyclique de l'enalaprilat possède une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase augmentée d'un facteur 4 000.

Nous avons donc souhaité dans un premier temps synthétiser les amines homologues de la tryptamine, afin de les condenser dans un deuxième temps sur le 3-nitrobenzaldéhyde dans des conditions de type Pictet-Spengler (Figure 84). Au vu des produits disponibles commercialement, les

produits de départ choisis ont été les acides carboxyliques correspondants : par formation des carboxamides et réduction de la fonction carbonyle, les amines primaires sont ainsi facilement accessibles. Notons que le squelette à 5 chaînons n'est pas décrit dans la littérature, tandis qu'un seul exemple d'homologue à 8 chaînons y figure, synthétisé dans des conditions de Pictet-Spengler avec de l'acide paratoluènesulfonique.¹⁷ Enfin, quelques exemples de préparation de composés à 7 chaînons – structurellement proches des benzodiazépines – sont décrits dans des conditions de type Pictet-Spengler avec des rendements de 10 à 40 %.^{17,18}

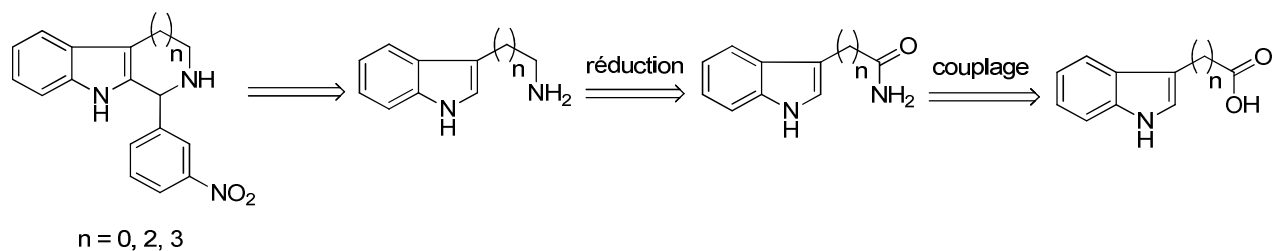


Figure 84 : Schéma de rétrosynthèse des analogues d'ITB₂ en série "taille du cycle C"

Nous avons donc effectué ces transformations à partir des trois acides commerciaux (n = 0, 2 et 3). Ceux-ci ont d'abord été convertis en carboxamides (**A-182-A-184**) par couplage de type peptidique avec l'ammoniac, en présence de 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI), avec de bons rendements.¹⁹ Puis, la réduction subséquente est effectuée au moyen de LiAlH₄ avec d'excellents rendements et permet d'obtenir les amines **183** et **184** (Figure 85). En revanche, l'amine **182** n'est pas obtenue dans ces conditions.

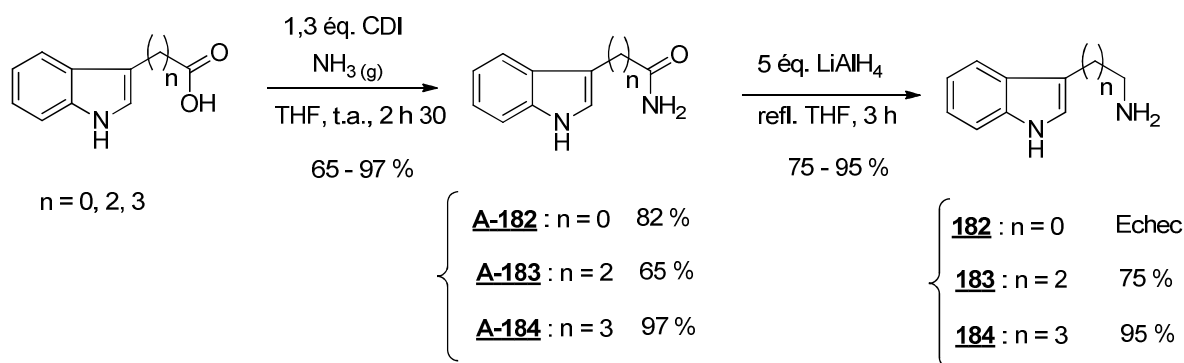


Figure 85 : Synthèse des amines **182-184**

En revanche, par réaction avec le 3-nitrobenzaldéhyde, nous ne sommes pas parvenus à former directement les analogues d'ITB₂ attendus. Les essais de cyclisation avec un aromatique pourtant relativement nucléophile (indole) n'ont fourni les produits attendus que sous forme de traces et ces derniers n'ont pu être isolés. Nous avons donc tenté d'activer l'électrophilie de l'imine en formant de façon intermédiaire un ion N-acyliminium ; une revue consacrée à la réactivité de ces intermédiaires réactionnels présente notamment des exemples de cyclisations originales à partir d'imines préformées en présence d'un électrophile, servant à générer l'acyliminium.²⁰ L'amine ainsi formée peut ensuite être déprotégée dans une dernière étape (Figure 86).

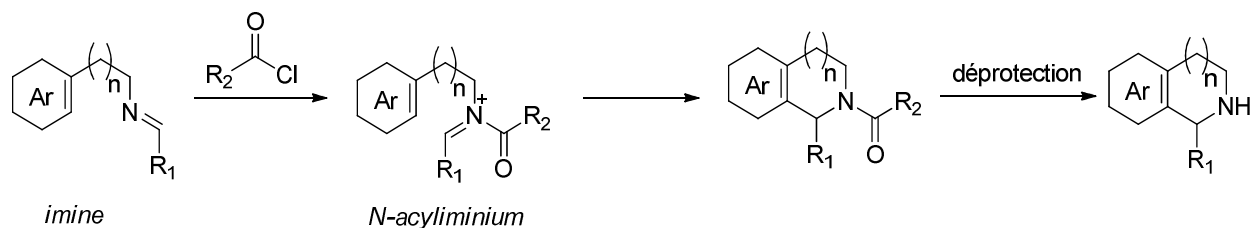


Figure 86 : Cyclisation de type Pictet-Spengler *via* un ion acyliminium

Dans le cadre de nos travaux, cette approche a donc été tentée dans le cas $n = 3$: l'imine **185** a d'abord été préformée à partir de l'amine **184** en s'inspirant de conditions décrites dans la littérature (chauffage prolongé en présence de montmorillonite).²¹ Puis, des essais de cyclisation en présence de chlorure de tosyloyle ou de chloroformate d'éthyle²² ont été menés, mais n'ont pas abouti : dans les deux cas, les produits de cyclisation attendus ne sont pas observés (Figure 87).

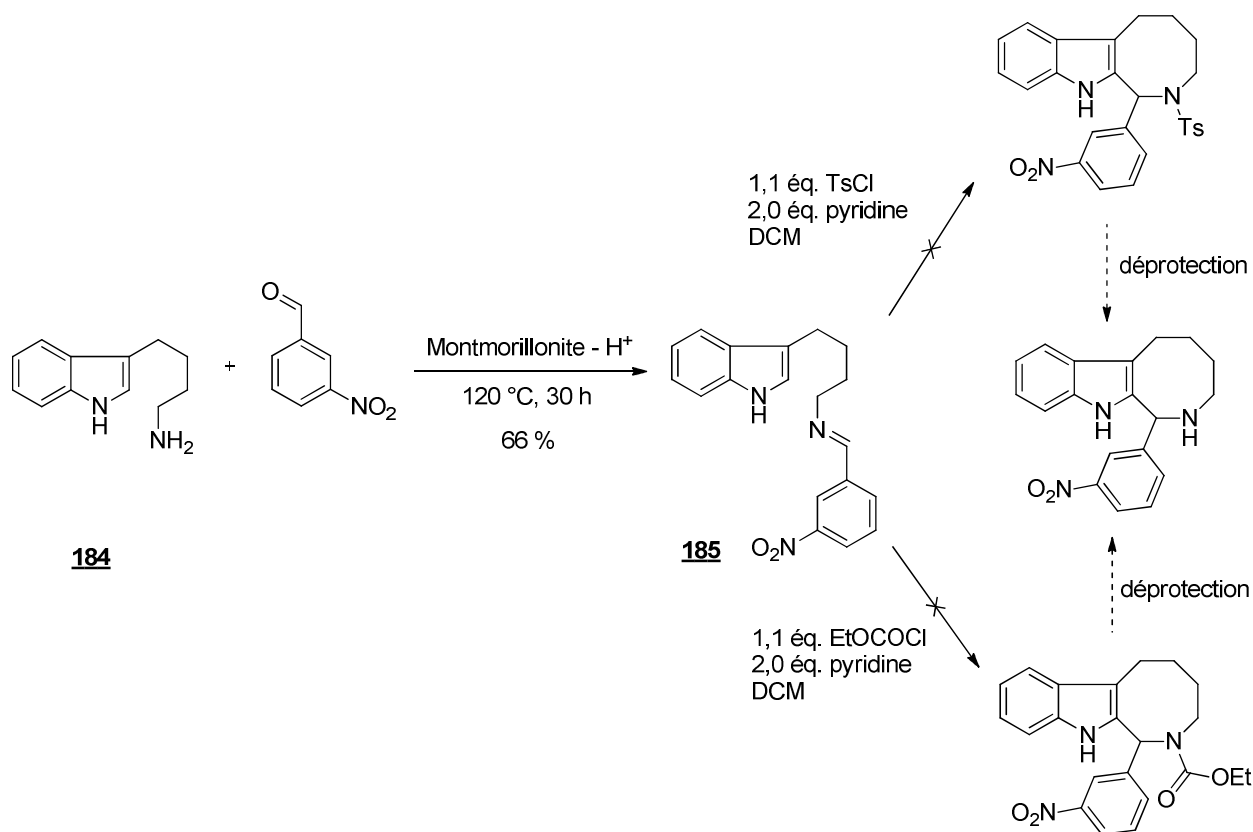


Figure 87 : Tentatives de synthèse de l'homologue d'ITB₂ à 8 chaînons

En raison du manque de temps, ces essais ont été suspendus et aucun des trois analogues initialement envisagés n'a été obtenu. Ceux-ci restent cependant d'un intérêt pharmacologique élevé pour compléter l'étude SAR du cycle C. Notons que nous avons privilégié une approche de type Pictet-Spengler qui s'est révélée infructueuse ; malgré l'absence d'alternatives recensées dans la littérature, une voie de synthèse de type Fischer - à partir de phénylhydrazine et d'une cétone cyclique à 5, 7 ou 8 chaînons - pourrait être envisagée pour aboutir à ces dérivés.

iii) Position de l'azote

Enfin, l'analogue tétrahydro- γ -carboline d'**ITB₂** a été synthétisé en 5 étapes selon des procédures décrites pour la plupart dans la littérature, à partir de la 2-bromo-3'-nitroacétophénone et de l'indole-3-carboxaldéhyde. Le schéma de synthèse de ce composé **186** est représenté sur la Figure 88.

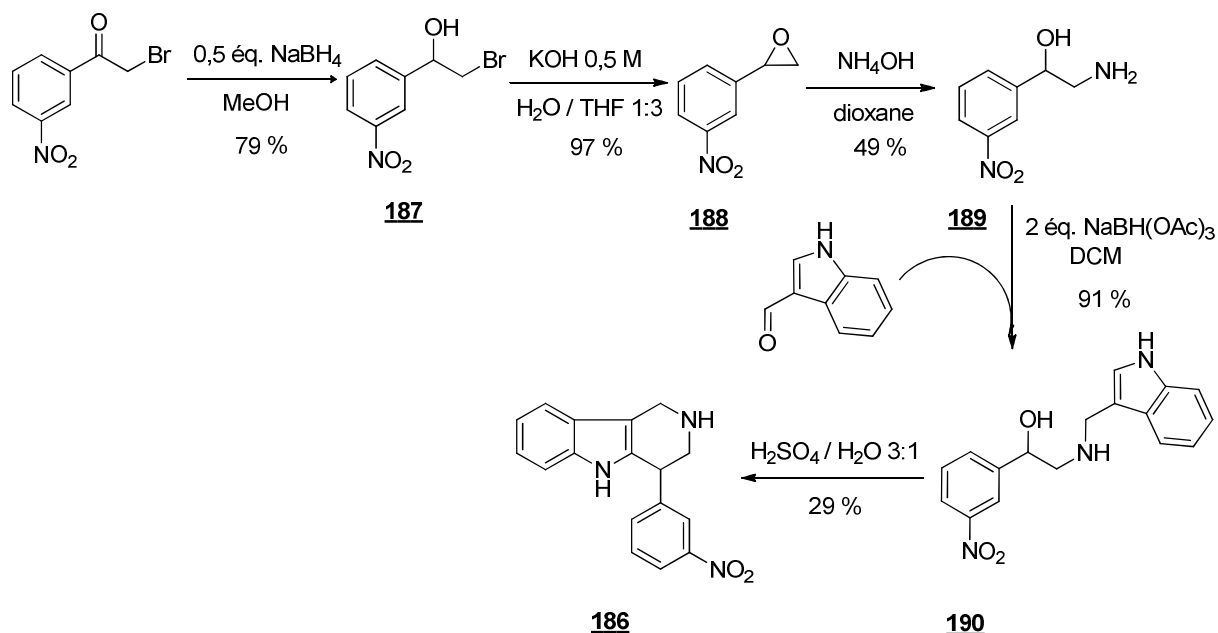


Figure 88 : Synthèse du composé **186**

Brièvement, la 2-bromo-3'-nitroacétophénone a été réduite en alcool **187** par du borohydrure de sodium avec un rendement de 79 %. Cet alcool est converti en époxyde en milieu basique (0,5 M KOH) ; **188**, obtenu à 97 %, est ensuite engagé dans un mélange 50:50 v/v de dioxane et d'ammoniaque à 24 %. La préparation du composé **189** selon cette voie est décrite par Hu & *al.*²³ Ensuite, l'amination réductrice de l'aminoalcool **189** avec l'indole-3-carboxaldéhyde permet d'obtenir **190** avec un rendement de 91 %. Pour la dernière étape, peu d'exemples sont décrits dans la littérature. Nous avons donc utilisé les conditions acides fortes (solution aqueuse d'acide sulfurique concentré) décrites pour la synthèse d'autres γ -carbolines.²⁴ Cependant, l'absence de conditions opératoires détaillées nous a contraints à effectuer une rapide optimisation, dont les résultats sont présentés dans le Tableau 34.

Tableau 34 : Optimisation de l'étape de cyclisation de **191**

Acide	Solvant	T (°C)	Durée	Résultat
2 éq. APTS	DMF	100 °C	2 h	Dégradation
50 % H ₂ SO ₄ ^a	ACN	0 °C → t.a.	7 h	Dégradation
25 % H ₂ SO ₄ ^a	ACN	0 °C → t.a.	7 h	Dégradation

100 % H ₂ SO ₄	/	0 °C → t.a.	7 h	Dégradation
75 % H ₂ SO ₄ ^a	H ₂ O	0 °C → t.a.	4 h	29 % 186
50 % H ₂ SO ₄ ^a	H ₂ O	50 °C	3 j	Dégradation
25 % H ₂ SO ₄ ^a	H ₂ O	50 °C	3 j	Dégradation

^a Les proportions indiquées sont des rapports volumiques

En utilisant l'acide sulfurique, on observe une grande variabilité en fonction de la proportion d'acide utilisée : jusqu'à 50 % v/v d'acide sulfurique, le mélange réactionnel n'évolue pas à température ambiante, mais se dégrade si l'on essaie de chauffer. Dans notre situation, la proportion optimale déterminée est de 75 % v/v d'acide sulfurique dans l'eau ([H₂SO₄] ≈ 14 M), qui permet d'obtenir **186** avec un rendement de 29 % après chromatographie, en quantité suffisante pour les tests biologiques. L'optimisation de cette dernière étape n'a donc pas été poursuivie.

iv) Nature de l'hétéroatome Y

Une autre modification envisagée concernant l'hétéroatome Y a été d'exploiter l'isostérisme NH/O/S pour former les analogues oxygéné **191** et soufré **192**. Le composé **191** peut être obtenu par la variante d'« Oxa-Pictet-Spengler »²⁵, condensation acido-catalysée entre un aryl-β-éthanol et un dérivé carbonylé, notamment utilisée pour la synthèse d'isochromanes.²⁶ Le mécanisme proposé est analogue à celui de la réaction de Pictet-Spengler, et favorise les aromatiques enrichis en électrons (Figure 89).^{27,28}

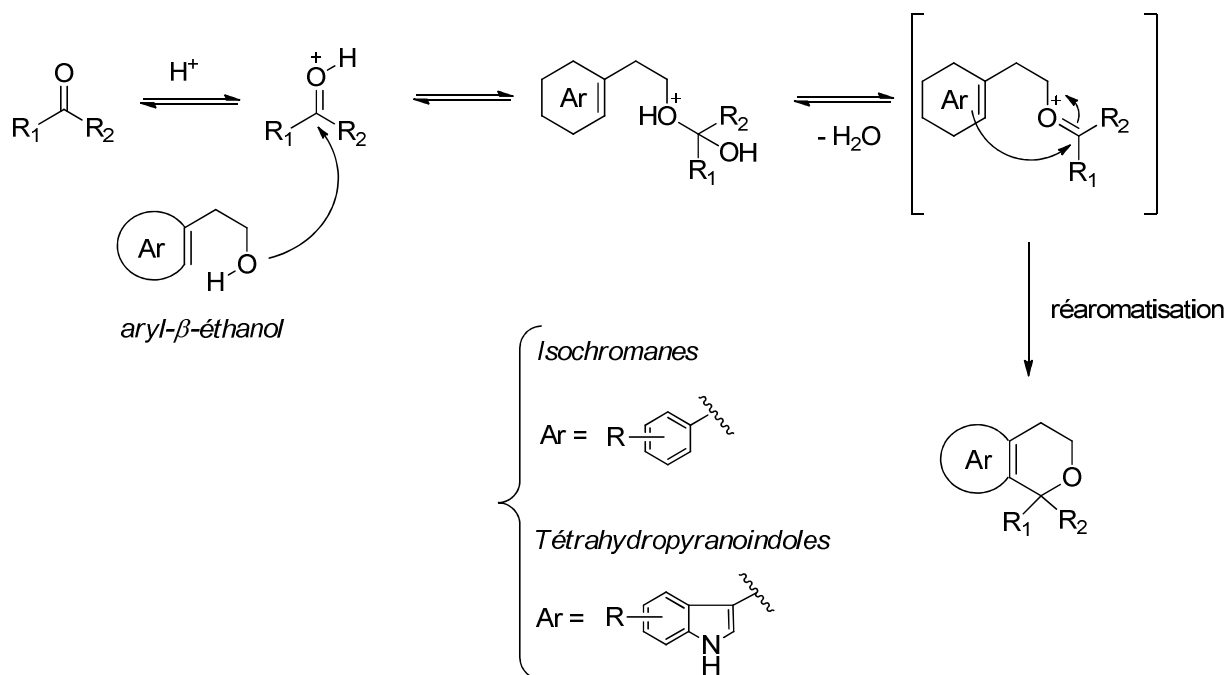


Figure 89 : Mécanisme de la réaction d'Oxa-Pictet-Spengler

De nombreux exemples de la littérature recensés par Larghi & *al.*²⁶ emploient des phénéthylalcools enrichis (substitués par des groupes hydroxy- ou méthoxy-) et de puissants catalyseurs acides de Lewis ou de Brønsted (SnCl_4 , TiCl_4 , $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, TsOH ...) pour former les isochromanes correspondants avec de très bons rendements. En revanche, la synthèse de tétrahydropyranoindoles à partir de tryptophol et d'aldéhydes est beaucoup plus rare : l'équipe de Lherbet décrit le triflate de bismuth (III) comme le meilleur catalyseur issu de leur criblage pour la condensation du tryptophol et de divers benzaldéhydes (53 % de rendement avec le 4-nitrobenzaldéhyde).^{29,30} D'après leurs observations, les auteurs suggèrent que l'activité catalytique est en fait portée par l'acide triflique issu de l'hydrolyse du $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ en présence d'eau résiduelle ; cette hypothèse semble toutefois en contradiction avec des transformations similaires effectuées en conditions anhydres.³¹ Nous avons donc tenté de condenser le tryptophol avec le 3-nitrobenzaldéhyde pour former **191** : cependant, nous ne sommes pas parvenus à reproduire les résultats décrits dans la littérature et le rendement moyen après chromatographie est de 15 %. De nombreux essais d'optimisation (durée, température, charge et nature du catalyseur) n'ont pas permis d'améliorer significativement ce résultat. Les conditions opératoires optimales pour la préparation de **191** sont présentées en Figure 90. Ayant obtenu suffisamment de produit pur pour les tests biologiques, nous n'avons donc pas poursuivi cette optimisation.

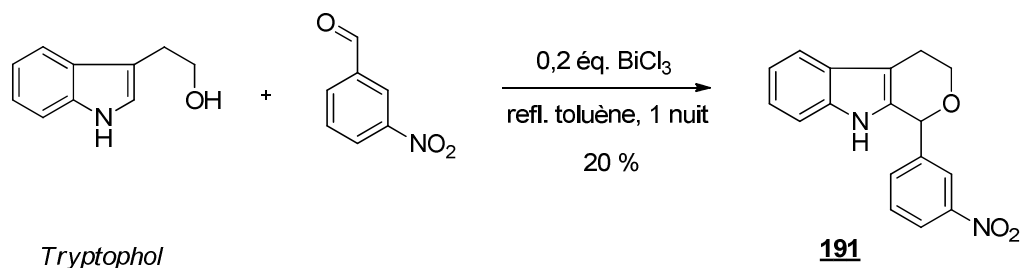


Figure 90 : Synthèse de l'analogue oxygéné d'ITB₂, **191**

De la même façon, pour l'homologue soufré **192**, très peu de méthodes de préparation sont connues : seule la condensation du thiotryptophol sur des β -cétoesters utilisée par Jirkovsky & *al.*³² (APTS dans le benzène à reflux) nous permettait d'accéder relativement facilement au tétrahydrothiopyranoindole souhaité. Pour cela, nous avons tout d'abord repris la synthèse du thiotryptophol **193** en 3 étapes à partir du 3-(2-bromoéthyl)indole commercial (Figure 91) : une substitution nucléophile par le thioacétate de potassium en présence d'une quantité catalytique d'iodure de sodium permet d'obtenir quantitativement le thioester **194**. Ce dernier est déprotégé en conditions basiques ($[\text{OH}^-] = 0,1 \text{ M}$) pour obtenir un mélange 1:1 de thiol **193** et de disulfure **195**, qui est à son tour complètement réduit en présence de LAH, avec un rendement global de déprotection de 69 %. Enfin, le thiotryptophol ainsi obtenu est engagé dans une réaction de condensation avec le 3-nitrobenzaldéhyde, en présence de 0,5 équivalent d'APTS ; le rendement en **192** obtenu après chromatographie (31 %) reste cependant médiocre. Remarquons que le dérivé soufré peut également être oxydé pour fournir les analogues de type sulfoxyde et sulfone ; ceux-ci ont été

observés par LC-MS après oxydation en présence d'acide *m*-chloroperbenzoïque mais, en raison des faibles quantités de l'analogue **192** de départ, ils n'ont pu être isolés et les essais ont été suspendus.

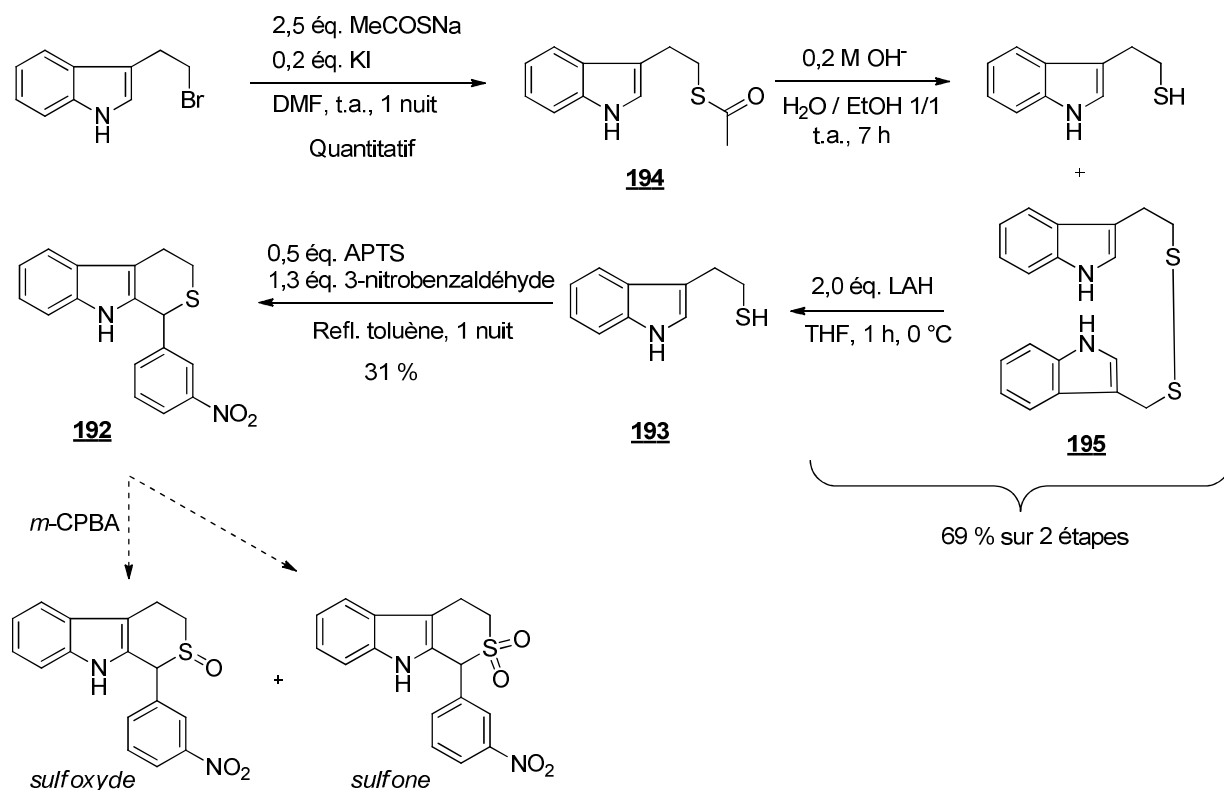


Figure 91 : Synth\u00e8se de l'analogue soufr\u00e9 d'ITB₂, **192**

v) Fonctionnalisation de l'azote N₂

L'atome d'azote N₂ repr\u00e9sente \u00e9galement un point de fonctionnalisation int\u00e9ressant et accessible. Lors des travaux ant\u00e9rieurs, seuls deux compos\u00e9s comportant des groupes greff\u00e9s sur cet atome ont \u00e9t\u00e9 synth\u00e9tis\u00e9s : **164** et **165**.

L'analogue ac\u00e9tyl\u00e9 **165** montre qu'une fonctionnalisation minimale de l'azote entra\u00eene une perte d'activit\u00e9 d'un facteur 10 environ. Nous avons souhait\u00e9 explorer un peu plus la diversit\u00e9 mol\u00e9culaire \u00e0 partir de cet analogue ; ainsi, les d\u00e9riv\u00e9s **196** \u00e0 **199** ont \u00e9t\u00e9 synth\u00e9tis\u00e9s comme indiqu\u00e9 dans la Figure 92.

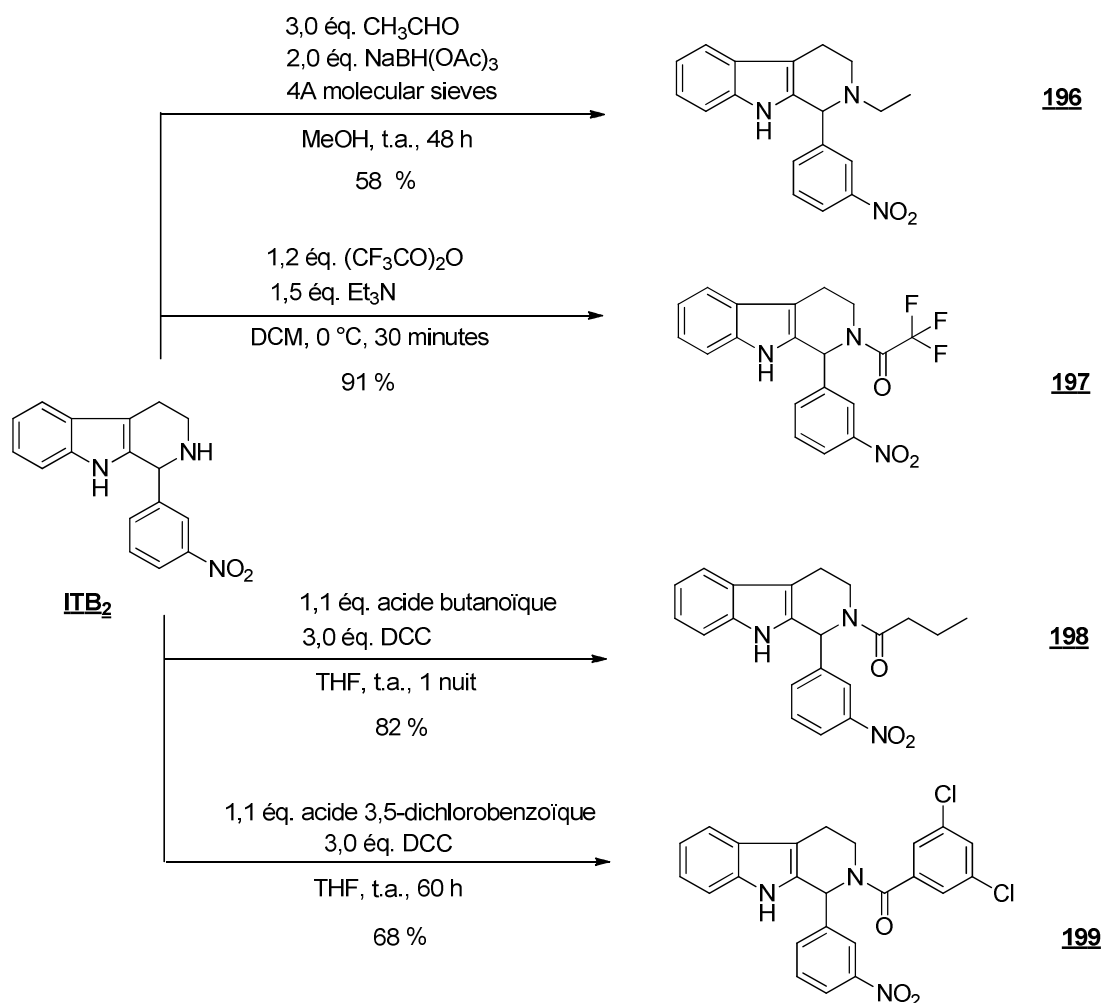


Figure 92 : Synth\u00e8se des analogues **196-199** fonctionnalis\u00e9s sur l'azote **N₂**

Le compos\u00e9 **196** ne poss\u00e8de pas la fonction carbonyle de **165** ; de ce fait, les propri\u00e9t\u00e9s physico-chimiques et acido-basiques sont modifi\u00e9es. Ce compos\u00e9 est obtenu par amination r\u00e9ductrice de l'ac\u00e9talde\u00efde sur **ITB₂**, en pr\u00e9sence de triac\u00e9toxyborohydrure de sodium. L'analogue fluor\u00e9 de **165**, **197**, est quant \u00e0 lui accessible par r\u00e9action d'**ITB₂** avec l'anhydride trifluoroac\u00e9tique.³³ Enfin, **198** et **199** sont des analogues dans lesquels l'atome d'azote est fonctionnalis\u00e9 par une cha\u00eene alkyle plus longue et un groupement aromatique encombr\u00e9 ; ils ont \u00e9t\u00e9 synth\u00e9tis\u00e9s *via* un couplage de type peptidique entre les acides correspondants et **ITB₂**, en utilisant le DCC comme agent de couplage. Par manque de temps et apr\u00e8s examen des premiers r\u00e9sultats biologiques, nous n'avons pas souhait\u00e9 constituer une librairie d'amides \u00e0 cette position, qui permettrait pourtant d'\u00e9tablir une \u00e9tude SAR d\u00e9taill\u00e9e.

d. Modifications du cycle D

Une grande diversité structurale est accessible sur le cycle D par synthèse parallèle. En effet, la condensation de Pictet-Spengler avec des aldéhydes variés en présence d'acide trifluoroacétique permet d'obtenir rapidement un grand nombre d'analogues structuraux d'ITB₂ sous forme des sels de TFA correspondants. Généralement, ces derniers précipitent hors du milieu réactionnel et sont isolés par simple filtration. Comme nous l'avons expliqué dans le récapitulatif des travaux antérieurs, cette librairie d'analogues avait été initiée par le Dr. Ambroise et Xavier Monchaussat. Dans le cas contraire, une extraction liquide/liquide en milieu basique a été réalisée pour obtenir des bruts réactionnels contenant les produits attendus à des degrés de pureté variés. De cette façon, 67 composés purs ont été obtenus (Figure 93). Ici encore, les composés sont présentés par familles chimiques par souci de clarté.

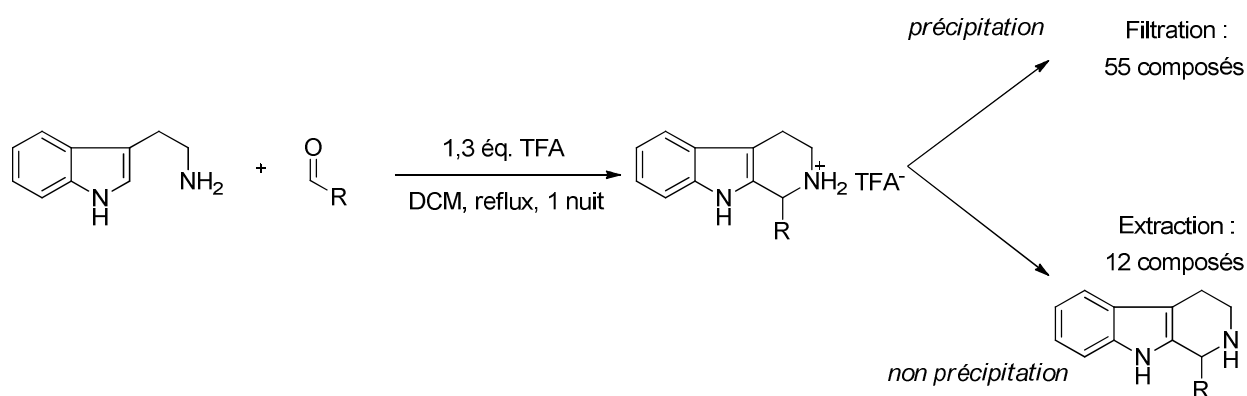


Figure 93 : Méthode d'obtention de 67 analogues d'ITB₂ modifiés en D.
Les travaux ont été effectués par X. Monchaussat et le Dr. Ambroise.

i) Série alkyle

Tout d'abord, une série d'aldéhydes aliphatiques ont été condensés sur la tryptamine pour former les analogues **200** à **207**. Les rendements de réaction sont indiqués dans le Tableau 35.

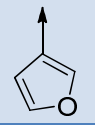
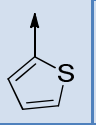
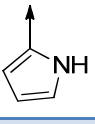
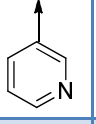
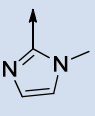
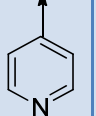
Tableau 35 : Analogues d'ITB₂ modifiés en D, série alkyle, 200-207. La flèche représente le point d'attache sur C₁

Code	R	Rendement	Forme	Code	R	Rendement	Forme
200		40	Sel de TFA	204		54	Sel de TFA
201		21	Sel de TFA	205		64	Sel de TFA
202		38	Sel de TFA	206		28	Sel de TFA
203		53	Sel de TFA	207		52	Sel de TFA

ii) Série hétérocyclique

Ensuite, des aldéhydes hétérocycliques ont été utilisés pour la synthèse des composés **208** à **213**, regroupés dans le Tableau 36.

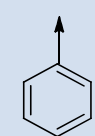
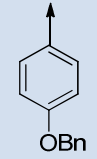
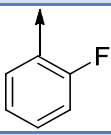
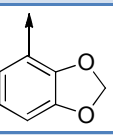
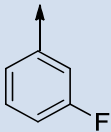
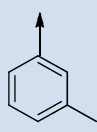
Tableau 36 : Analogues d'ITB₂ modifiés en D, série hétérocyclique, 208-213. La flèche représente le point d'attache sur C₁

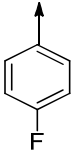
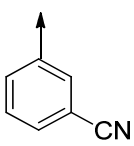
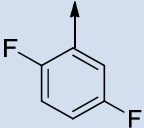
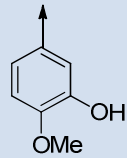
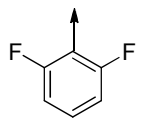
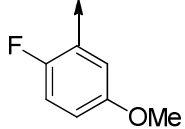
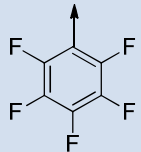
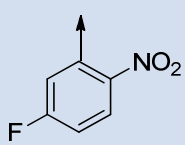
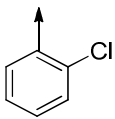
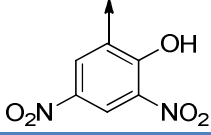
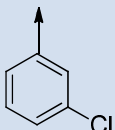
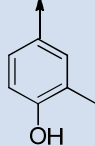
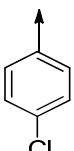
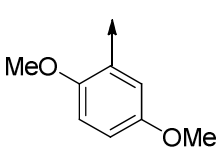
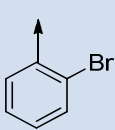
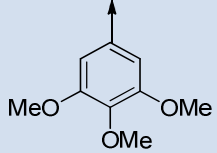
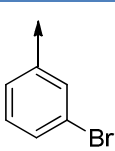
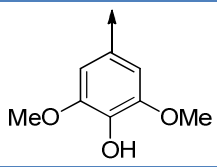
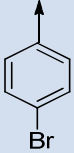
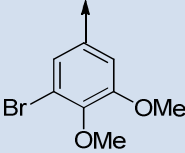
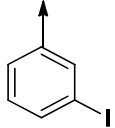
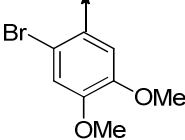
Code	D	Rendement	Forme	Code	D	Rendement	Forme
208		92	Sel de TFA	211		4	Sel de TFA
209		29	Amine libre	212		48	Sel de TFA
210		15	Sel de TFA	213		75	Sel de TFA

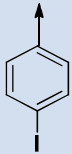
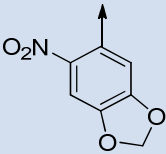
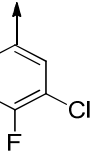
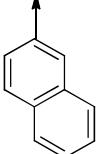
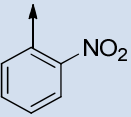
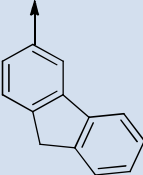
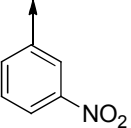
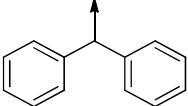
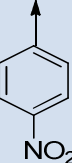
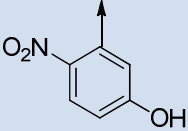
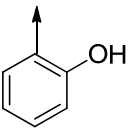
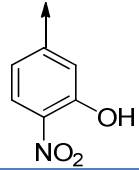
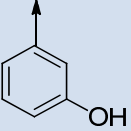
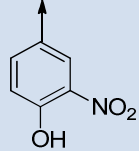
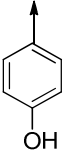
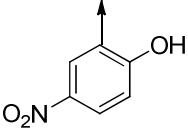
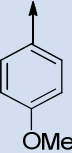
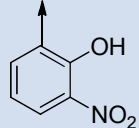
iii) Substitution du noyau phényle

Dans cette série, la condensation de la tryptamine avec divers benzaldéhydes substitués a permis de générer 46 composés, dont le noyau D est substitué par des halogènes (composés **215** à **228**), divers groupes oxygénés (composés **231** à **236**) et diverses combinaisons de substituants (**239** à **249** et **253** à **257**). Remarquons qu'ITB₂ est resynthétisé à cette occasion avec un rendement de 91 %, ainsi qu'ITB₁, l'autre tétrahydrocarboline issue du criblage du Dr. Lecat-Guillet (Tableau 37).

Tableau 37 : Analogues d'ITB₂ modifiés en D, série "phényle substitué", 214 à 257. La flèche représente le point d'attache sur C₁

Code	D	Rdt (%)	Forme	Code	D	Rdt (%)	Forme
214		50	Amine libre	235		53	Sel de TFA
215		48	Sel de TFA	236		23	Sel de TFA
216		45	Sel de TFA	237		38	Amine libre

<u>217</u>		18	Sel de TFA	<u>238</u>		64	Sel de TFA
<u>218</u>		22	Sel de TFA	<u>239</u>		81	Sel de TFA
<u>219</u>		37	Sel de TFA	<u>240</u>		60	Amine libre
<u>220</u>		74	Sel de TFA	<u>241</u>		91	Sel de TFA
<u>221</u>		77	Sel de TFA	<u>242</u>		80	Sel de TFA
<u>222</u>		66	Sel de TFA	<u>243</u>		56	Sel de TFA
<u>223</u>		63	Sel de TFA	<u>244</u>		60	Amine libre
<u>224</u>		45	Sel de TFA	<u>245</u>		75	Amine libre
<u>ITB1</u>		21	Sel de TFA	<u>246</u>		40	Sel de TFA
<u>225</u>		31	Sel de TFA	<u>247</u>		63	Sel de TFA
<u>226</u>		75	Sel de TFA	<u>248</u>		86	Sel de TFA

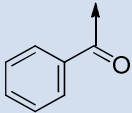
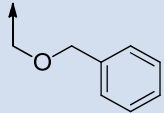
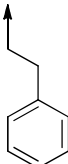
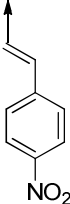
<u>227</u>		66	Sel de TFA	<u>249</u>		91	Amine libre
<u>228</u>		42	Sel de TFA	<u>250</u>		60	Sel de TFA
<u>229</u>		88	Sel de TFA	<u>251</u>		79	Sel de TFA
<u>ITB₂</u>		91	Sel de TFA	<u>252</u>		77	Sel de TFA
<u>230</u>		87	Sel de TFA	<u>253</u>		85	Sel de TFA
<u>231</u>		31	Amine libre	<u>254</u>		96	Sel de TFA
<u>232</u>		88	Sel de TFA	<u>255</u>		91	Sel de TFA
<u>233</u>		83	Sel de TFA	<u>256</u>		83	Sel de TFA
<u>234</u>		39	Amine libre	<u>257</u>		88	Sel de TFA

iv) Nature du bras espaceur

Enfin, dans une dernière série, la taille et la nature du bras espaceur entre les cycles C et D ont été variées. En raison de contraintes synthétiques, le cycle D a été le plus souvent réduit à un

noyau phényle simple et non un 3-nitrophényle comme dans la tête de file ; les analogues **285** à **261** ainsi obtenus sont présentés dans le Tableau 38.

Tableau 38 : Analogues d'ITB₂ modifiés en D, série "bras espaceur", **258** à **261**. La flèche représente le point d'attache sur C₁

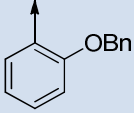
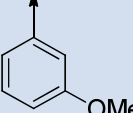
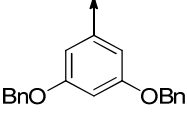
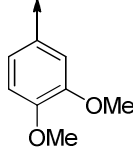
Code	D	Rendement (%)	Forme	Code	D	Rendement (%)	Forme
258		6	Sel de TFA	260		36	Sel de TFA
259		46	Sel de TFA	261		59	Sel de TFA

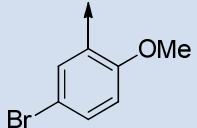
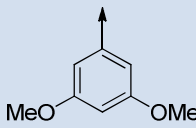
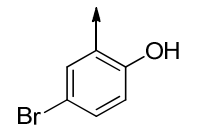
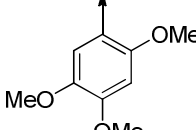
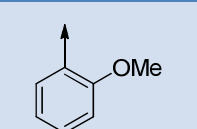
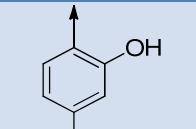
v) Autres analogues

Tous les analogues présentés précédemment sont issus de la synthèse parallèle effectuée par X. Monchaussat et possédaient un degré de pureté satisfaisant (> 90 % en RMN et en LC/MS). Les travaux de cette partie ont donc consisté à purifier un certain nombre des composés restants, qui ne satisfaisaient pas au critère de pureté. Deux méthodes ont été utilisées en fonction de la pureté du mélange brut :

- Les mélanges « propres » (dont la pureté est estimée à plus de 70 % en RMN et dont la principale impureté est l'aldéhyde de départ) ont été repris dans l'éther diéthylique et acidifiés à l'aide de TFA. Les précipités ainsi obtenus sont lavés plusieurs fois avec des mélanges éther/dichlorométhane de proportions variables, jusqu'à l'obtention d'un produit de pureté supérieure à 90 %. Les composés **262** à **271** sont ainsi isolés sous forme de sels de TFA. Remarquons qu'il s'agit exclusivement de composés appartenant à la série « phényle substitué » avec divers groupements oxygénés (Tableau 39).

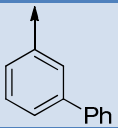
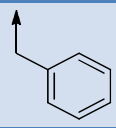
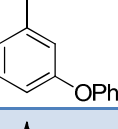
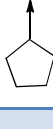
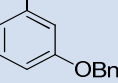
Tableau 39 : Analogues d'ITB₂ modifiés en D et purifiés par lavages successifs, **262-271**

Code	D	Rendement (%)	Code	D	Rendement (%)
262		52	267		65
263		36	268		54

<u>264</u>		48	<u>269</u>		49
<u>265</u>		87	<u>270</u>		30
<u>266</u>		54	<u>271</u>		34

- Les mélanges d'une pureté moindre ont été chromatographiés sur gel de silice, grâce à un gradient d'éluant variant de DCM/NH₄OH 99/1 à DCM/MeOH/NH₄OH 89/10/1. Les composés **272** à **276** sont ainsi obtenus sous forme d'amine libre (Tableau 40).

Tableau 40 : Analogues d'*ITB*₂ modifiés en D et purifiés par chromatographie, **269-273**.

Code	D	Rendement (%)	Code	D	Rendement (%)
<u>272</u>		83	<u>275</u>		38
<u>273</u>		48	<u>276</u>		4
<u>274</u>		32			

Dans cette partie, nous avons donc présenté l'ensemble des 92 analogues d'*ITB*₂ qui ont été synthétisés et qui permettront l'établissement de relations structure-activité dans la partie suivante. Contrairement à *ITB*₉, les variations de la structure initiale ont été plus contraintes par les difficultés synthétiques, et certains points de diversification n'ont pas du tout été abordés, tandis que d'autres ont été plus extensivement explorés.

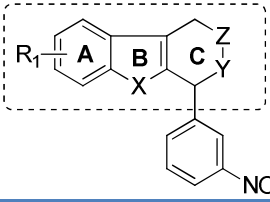
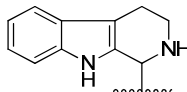
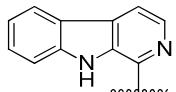
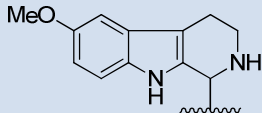
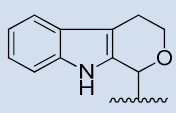
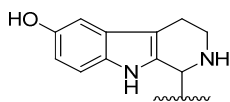
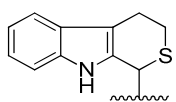
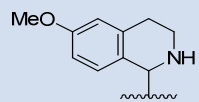
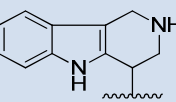
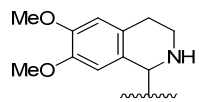
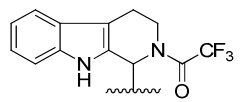
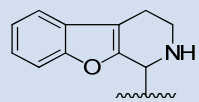
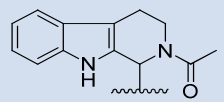
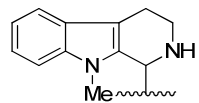
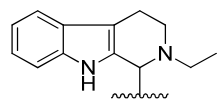
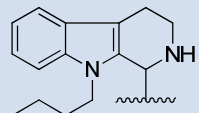
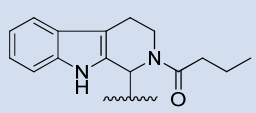
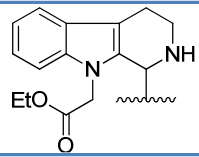
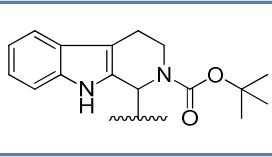
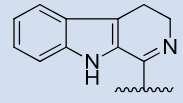
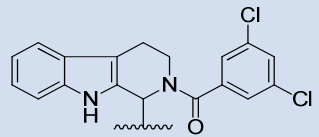
3. Relations structure-activité

Dans un deuxième temps, le pouvoir inhibiteur des composés présentés dans la partie précédente a été mesuré afin d'établir des SAR. Les résultats seront divisés en deux parties : les activités des analogues modifiés sur les cycles A, B et C, puis celles des analogues modifiés sur D.

a. Cycles A-B-C

Le nombre d'analogues synthétisés étant moins important que dans le chapitre III, le Tableau 41 regroupe l'ensemble des résultats biologiques des composés modifiés en A, B et C :

Tableau 41 : IC₅₀ des analogues d'ITB₂ modifiés en A, B ou C

					
Code	A-B-C	IC ₅₀ (μM)	Code	A-B-C	IC ₅₀ (μM)
<u>ITB₂</u>		0,3	<u>181</u>		6,5
<u>168</u>		1	<u>191</u>		0,0052
<u>169</u>		75	<u>192</u>		0,090
<u>171</u>		7,5	<u>186</u>		20
<u>172</u>		70	<u>197</u>		20
<u>174</u>		0,25	<u>165</u>		2
<u>175</u>		10	<u>196</u>		4,5
<u>176</u>		1,5	<u>198</u>		2
<u>177</u>		1,5	<u>164</u>		20
<u>167</u>		2	<u>199</u>		50

- Concernant le cycle A, les analogues de la sérotonine **168** et **169** montrent que le carbone C₈ n'est pas *a priori* une position de choix pour obtenir des composés plus actifs. Plus particulièrement, on peut penser que la déprotonation de la fonction phénol en conditions physiologiques est responsable de la chute d'activité notable entre **168** et **169**.
- La suppression du cycle B entraîne une nette diminution de l'activité biologique (de 1 µM pour **168** à 7,5 µM pour **171**), avec une différence marquée (d'un facteur 10) entre **171** et **172**. L'isostérisme NH/O sur l'atome X ne semble pas avoir d'influence sur l'activité biologique (**174**), alors que la substitution de ce dernier par diverses chaînes a un impact plutôt négatif (**175-177**). Cet atome peut toutefois constituer un point d'ancrage éventuel pour la synthèse d'une sonde photoactivable ; en effet, les IC₅₀ des analogues **176** et **177** (1,5 µM) comportant une chaîne à 4 ou 5 atomes restent acceptables et semblent indiquer qu'une substitution plus large est envisageable.
- Les résultats du cycle C montrent clairement que l'oxydation, partielle (**167**) ou totale (**181**), ainsi que la substitution de l'azote N₂ (**164-165** et **196-199**) entraînent une chute nette de l'activité biologique (d'un facteur 7 à 170 par rapport à **ITB₂**). Ce résultat est intéressant au vu de l'activité mesurée de la sonde synthétisée par le Dr. Waltz (IC₅₀ [**166**] = 0,2 µM) ; en effet, la relation structure-activité réalisée pour concevoir cette sonde avait été minimale. Nous confirmons que cette position n'est pas idéale pour la substitution, bien que l'activité de la sonde obtenue soit satisfaisante pour des expériences de photomarquage (cf. partie 1.c.ii). Alors que l'analogue γ-carboline **186** est peu actif (IC₅₀ [**186**] = 20 µM), l'échange NH ↔ O ↔ S en Y donne des résultats plus intéressants : le dérivé oxygéné **191** présente un pouvoir inhibiteur particulièrement élevé (IC₅₀ [**191**] = 5,2 nM), qui n'est pas retrouvé dans l'homologue soufré (IC₅₀ [**192**] = 0,09 µM, comparable à **ITB₂**). L'isostérisme NH/O sur Y, mineur en termes de variations structurales, supprime le caractère donneur de liaison hydrogène et modifie la charge globale de la molécule (l'azote N₂ est protoné à pH physiologique). C'est probablement pour ces raisons que l'activité biologique se retrouve améliorée d'un facteur 60.

Les résultats de l'étude SAR menée sur cette première série d'analogues montre que la structure tricyclique A-B-C est globalement assez sensible aux variations structurales : aucune substitution n'a permis d'améliorer substantiellement l'activité. Pour autant, certains analogues substitués d'**ITB₂** conservent une activité satisfaisante, de l'ordre du micromolaire (**165**, **167**, **168**, **174**, **175**, **177**, **192**, **196** et **198**). En revanche, l'isostérisme NH/O sur Y permet une amélioration remarquable du pouvoir inhibiteur (**191**). Notons que ce squelette tétrahydropyranoindole est retrouvé dans trois composés de structure voisine connus pour leurs activités antalgique et anti-inflammatoire, l'acide prodolique³⁴, le pemedolac³⁵ et l'etodolac (Lodine®). Ce dernier est un anti-inflammatoire non stéroïdien anti-COX2³⁶ indiqué notamment dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Figure 94).³⁷

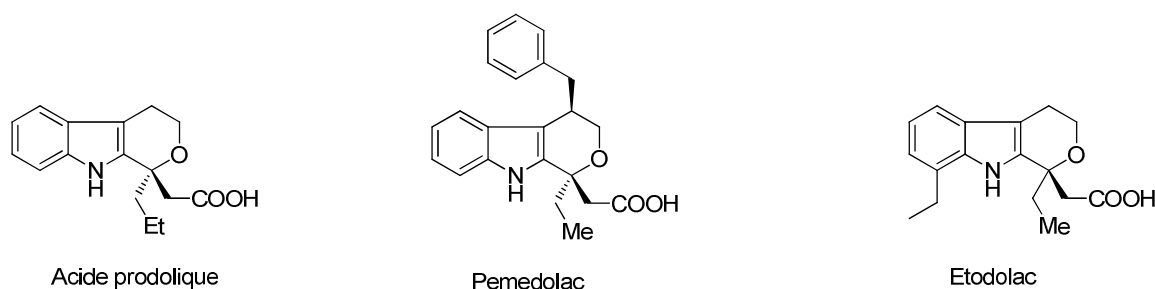


Figure 94 : Structures chimiques de l'acide prodolique, du pemedolac et de l'etodolac (Lodine®)

b. Cycle D

Après avoir étudié le motif A-B-C, nous nous intéressons maintenant aux résultats biologiques des analogues modifiés sur le cycle D. La présentation en séries de composés est la même que celle utilisée en partie 2.d. de ce chapitre.

i) Série alkyle

Dans un premier temps, les activités biologiques des analogues **200** à **207** qui constituent la série alkyle, sont présentées dans le Tableau 42.

Tableau 42 : IC₅₀ des analogues d'ITB₂ modifiés en D, série alkyle, 200-207. La flèche représente le point d'attache sur C₁

Code	D	IC ₅₀ (μM)	Code	D	IC ₅₀ (μM)
200		> 100	205		2
201		> 100	206		> 100
202		> 100	207		> 100
203		> 100	276		2
204		> 100			

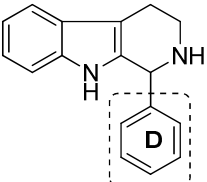
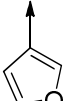
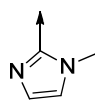
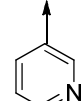
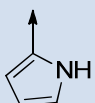
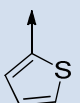
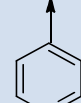
De manière évidente, la substitution du carbone C₁ par des chaînes alkyles diverses réduit à néant l'activité biologique des analogues ; à l'exception notable de **205** et **276**, tous les composés

possèdent des IC₅₀ supérieurs à 100 µM, qui ne peuvent pas être déterminés précisément grâce au test utilisé ; ils sont donc considérés comme inactifs au regard de la tête de file.

ii) Série hétérocyclique

Dans un deuxième temps, l'évaluation biologique des analogues modifiés en D par des hétérocycles (**208-213**) a donné les résultats regroupés dans le Tableau 43.

Tableau 43 : IC₅₀ des analogues d'ITB₂ modifiés en D, série hétérocyclique, 208-213. La flèche représente le point d'attache sur C₁

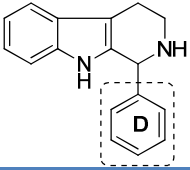
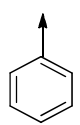
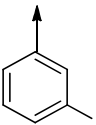
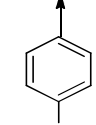
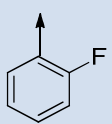
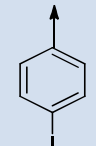
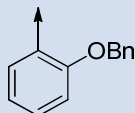
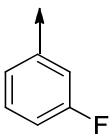
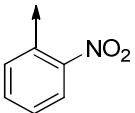
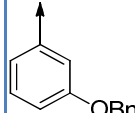
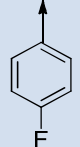
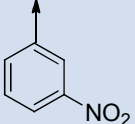
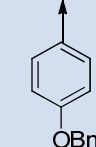
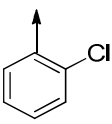
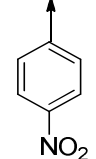
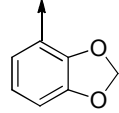
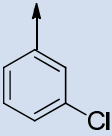
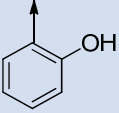
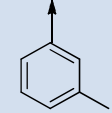
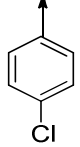
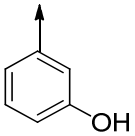
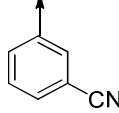
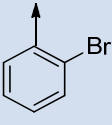
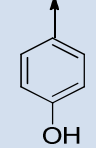
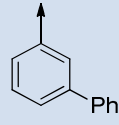
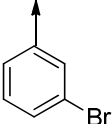
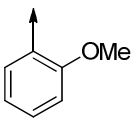
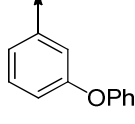
								
Code	D	IC ₅₀ (µM)	Code	D	IC ₅₀ (µM)	Code	D	IC ₅₀ (µM)
208		14,5	210		15	212		80
209		> 100	211		3	213		7

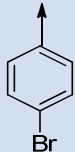
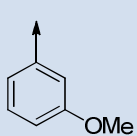
Les résultats en série hétérocyclique sont assez variés, bien qu'aucune amélioration notable par rapport à la tête de file ne soit observée. Remarquons que les analogues **211** et **213** ont des activités similaires à l'homologue **214** (IC₅₀ [**214**] = 5 µM) comportant un noyau phényle simple et dont ils sont des isostères (d'un facteur environ 10 par rapport à ITB₂). En revanche, le composé **212** voit son activité biologique chuter drastiquement – notamment vis-à-vis de **213** - ce qui laisse supposer que la position 3 du cycle D est relativement importante pour l'activité ; ce point sera en effet confirmé dans la partie suivante.

iii) Substitution du noyau phényle

Pour cette série, pour des raisons de clarté, nous avons séparé les analogues en deux parties, présentées successivement. Dans la première, 29 analogues comportant un seul substituant sur le noyau phényle nous permettront d'étudier finement les relations structure-activité (Tableau 44).

Tableau 44 : IC₅₀ des analogues d'ITB₂ en série "phényle substitué", 1^{ère} partie. La flèche représente le point d'attache sur C₁

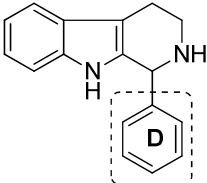
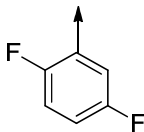
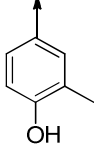
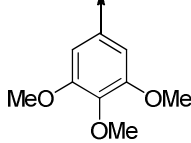
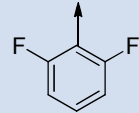
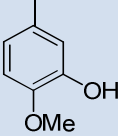
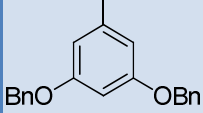
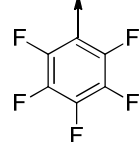
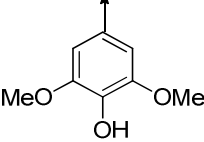
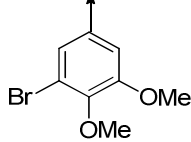
								
Code	D	IC ₅₀ (μM)	Code	D	IC ₅₀ (μM)	Code	D	IC ₅₀ (μM)
<u>214</u>		5	<u>226</u>		0,2	<u>234</u>		0,55
<u>215</u>		4,5	<u>227</u>		0,3	<u>262</u>		7
<u>216</u>		0,7	<u>228</u>		55	<u>274</u>		0,95
<u>217</u>		1,5	<u>ITB₂</u>		0,3	<u>235</u>		2,3
<u>221</u>		7,5	<u>230</u>		0,3	<u>236</u>		0,4
<u>222</u>		0,25	<u>231</u>		4,5	<u>237</u>		0,7
<u>223</u>		0,75	<u>232</u>		2,5	<u>238</u>		0,55
<u>224</u>		6,5	<u>233</u>		3,5	<u>272</u>		6,5
<u>ITB₁</u>		0,2	<u>266</u>		> 100	<u>273</u>		0,4

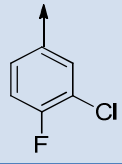
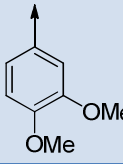
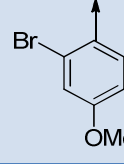
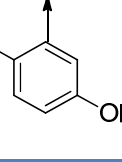
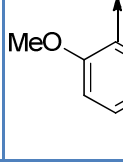
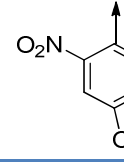
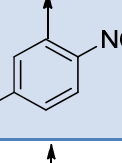
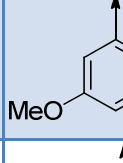
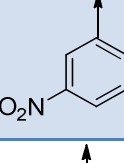
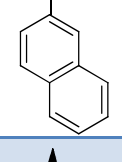
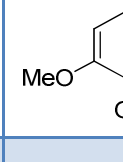
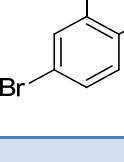
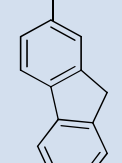
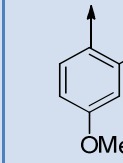
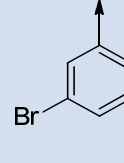
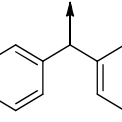
<u>225</u>		0,35	<u>267</u>		0,8
------------	---	------	------------	---	-----

L'ensemble de ces séries montre clairement une influence de la position du substituant sur le cycle aromatique sur l'activité biologique, dans l'ordre de préférence suivant : *meta* > *para* >> *ortho*. Dans certaines séries, les différences d'activité entre les positions 2, 3 et 4 sont particulièrement importantes (229 par rapport à ITB₂ et 230, 266 par rapport à 267 et 234). Nous pouvons également remarquer que, si la position 3 est préférée, elle est paradoxalement assez peu sensible à la nature du substituant : les analogues halogénés (217, 222, ITB₁, 226), oxygénés (267, 274, 236, 273) ou diversement substitués (237, 238) possèdent tous des IC₅₀ compris entre 0,5 et 3 fois l'IC₅₀ mesuré d'ITB₂. Seul l'analogue hydroxylé (232, protoné à pH physiologique) et l'analogue biphenyle (272, rigide et encombré) montrent une perte d'activité plus significative. Remarquons enfin que l'analogue 214, comportant un noyau phényle non substitué, présente un IC₅₀ égal à 5 μM, soit une perte d'activité d'un facteur 10 environ.

Dans un deuxième temps, nous avons regroupé dans le Tableau 45 les résultats de 25 autres analogues, présentant des modifications plus larges et diverses combinaisons de substituants.

Tableau 45 : IC₅₀ des analogues d'ITB₂ en série "phényle substitué", deuxième partie. La flèche représente le point d'attache sur C₁.

								
Code	D	IC ₅₀ (μM)	Code	D	IC ₅₀ (μM)	Code	D	IC ₅₀ (μM)
<u>218</u>		0,2	<u>243</u>		0,85	<u>245</u>		25
<u>219</u>		3	<u>244</u>		6,5	<u>263</u>		4
<u>220</u>		2	<u>246</u>		60	<u>247</u>		0,9

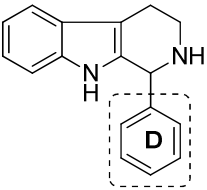
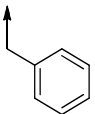
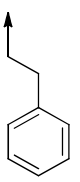
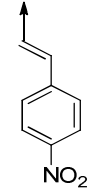
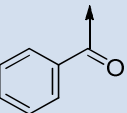
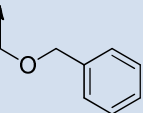
226		0,4	268		5	248		5,5
240		0,25	244		15	249		10
241		10	269		0,7	242		> 100
250		0,7	270		> 100	264		3,5
251		3	271		20	265		2
252		20						

Sans essayer de rationaliser systématiquement ces résultats au vu de la première étude réalisée dans le paragraphe précédent, nous nous contentons d'observer certains analogues intéressants : les composés **218**, **228** et **240**, isostères respectifs de **216**, **222** et **267** dans lesquels un atome d'hydrogène est remplacé par un atome de fluor en position 2 ou 4 gardent une activité proche de celle d'ITB₂. La plupart des autres composés possèdent au moins un groupement dont la nature (OH, déprotonable) ou la position (*ortho*) entraîne une chute modérée ou importante de l'activité biologique par rapport à la tête de file.

iv) Nature de l'espaceur

Enfin, la dernière série de composés a permis de tester l'influence de l'espacement entre les cycles C et D sur l'activité biologique. Rappelons que ce « bras espaceur » est réduit à 0 dans ITB₂ et que – en raison de l'accessibilité des réactifs – le cycle D est le plus souvent un phényle non substitué dans cette série. Les effets de l'espacement seront donc à comparer au regard de l'activité de **214** (IC₅₀ = 5 µM) – et non celle d'ITB₂ – comme référence.

Tableau 46 : IC₅₀ des analogues d'ITB₂ modifiés en D, série "bras espaceur"

								
Code	D	IC ₅₀ (μM)	Code	D	IC ₅₀ (μM)	Code	D	IC ₅₀ (μM)
275		30	259		7,3	261		0,5
258		19,5	260		9,5			

De manière générale, cette dernière série montre que l'espacement du cycle aromatique ne permet pas un gain d'activité biologique par rapport au composé **214** (IC₅₀ = 5 μM), dans lequel le noyau phényle est attaché directement au carbone C₁. Les analogues à un chaînon (**258**, **275**) sont nettement moins actifs que les analogues à 2 ou 3 chaînons (**259**, **260**) ; il serait intéressant de poursuivre cette série pour savoir si cette tendance se confirme. Enfin, le cas de l'analogue **261** est particulier : il s'agit d'un vinylogue du composé **230** et ils présentent des activités similaires (IC₅₀ [**230**] = 0,3 μM) ; ce bioisostérisme est d'ailleurs retrouvé dans d'autres travaux de chimie thérapeutique.³⁸ En résumé, nous conserverons donc par la suite la structure d'ITB₂, dans laquelle les cycles C et D ne comportent pas de bras espaceur.

c. Conclusion

En conclusion, grâce à l'évaluation biologique de 94 analogues d'ITB₂ « de première génération », un premier ensemble de relations structure-activité a pu être établi, qui est résumé dans la Figure 95.

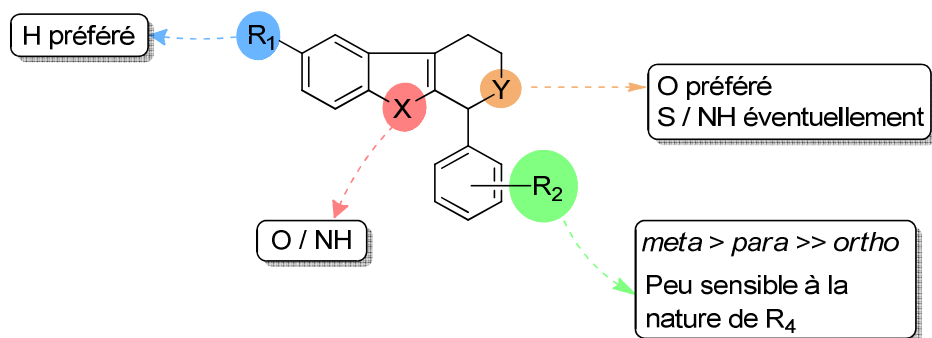


Figure 95 : Etude SAR d'ITB₂

La plupart des modifications effectuées ont un impact négatif sur l'activité biologique, bien que dans des proportions modestes (de l'ordre d'un facteur 10). Trois modifications ont retenu notre attention : au niveau de l'hétéroatome X, l'échange NH \rightleftharpoons O est neutre en termes d'activité (composé **174**). Au niveau de l'hétéroatome Y, l'échange NH \rightleftharpoons S ne procure qu'une faible amélioration (composé **192**) tandis que la modification NH \rightleftharpoons O permet d'augmenter nettement le pouvoir inhibiteur et d'atteindre un IC₅₀ de 5,2 nM (composé **191**). Enfin, la large étude réalisée sur le noyau phényle D montre que la substitution doit être effectuée préférentiellement en position 3 et qu'elle est relativement indépendante de la nature du substituant. Cette dernière observation est intéressante car elle suggère un point d'ancrage possible pour la synthèse d'une sonde photoactivable dérivée d'ITB₂, différente de celle synthétisée par le Dr. Waltz au cours de sa thèse (composé **166**).

4. Optimisation de l'activité dans la famille d'ITB₂

Dans cette partie, nous adopterons une démarche similaire à celle du chapitre précédent : dans une première partie, les résultats de l'étude SAR obtenus en partie IV.3 seront exploités pour générer des analogues « de seconde génération » possédant une activité potentielle élevée. Dans un deuxième temps, l'importance de la stéréochimie du carbone C₁ sur l'activité sera étudiée plus en détail.

a. Analogues « de seconde génération »

Les résultats de l'étude SAR ont mis particulièrement en avant l'importance du motif tétrahydropyrane pour l'activité biologique (IC₅₀ [**191**] = 5,2 nM), la plupart des autres modifications étant neutres ou néfastes en termes d'activité. Par manque de temps, nous avons donc seulement choisi de condenser le tryptophol sur 8 aldéhydes ayant servi à former parmi les meilleurs analogues de la série D (partie 3.b.iii, composés **ITB₁**, **218**, **222**, **225**, **228**, **230**, **235**, **240** dont l'IC₅₀ < 0,4 μM). Ces analogues de seconde génération – à activité potentielle élevée – ont ainsi été synthétisés dans des conditions acides (TFA) de type Pictet-Spengler, mises au point après une rapide optimisation (Figure 96).

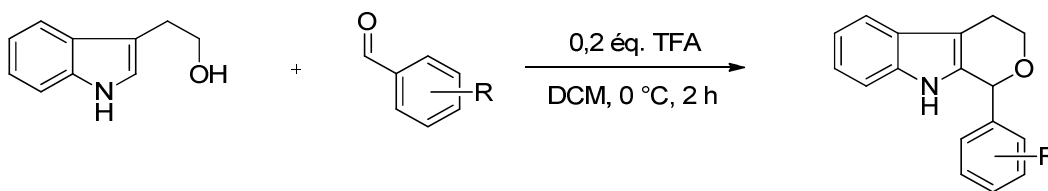
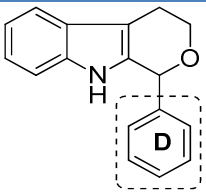
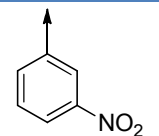
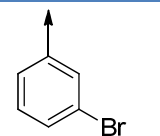
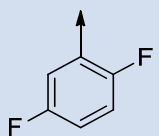
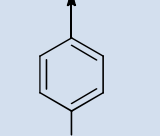
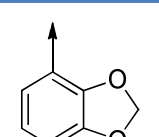
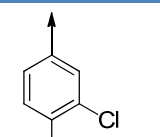
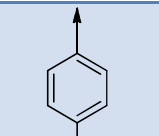
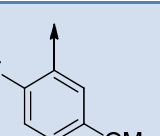
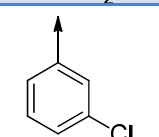


Figure 96 : Synthèse des analogues d'ITB₂ "de seconde génération"

Les composés **277** à **284** ainsi obtenus ont ensuite été testés par RAIU afin d'évaluer leur pouvoir inhibiteur du transport de l'iode. Ces analogues de seconde génération, les rendements de synthèse après chromatographie et les IC₅₀ ainsi déterminés sont rassemblés dans le Tableau 47.

Tableau 47 : Synthèse et évaluation biologique des analogues d'*ITB*₂ de seconde génération 277-284. Le composé de référence de cette série oxygénée, **191**, est rappelé à titre de comparaison.

							
Code	D	Rendement (%)	IC ₅₀ RAIU (μM)	Code	D	Rendement (%)	IC ₅₀ RAIU (μM)
191			0,0052	281		19	0,17
277		18	0,17	282		22	0,50
278		19	0,00041	283		16	0,20
279		20	2,2	284		19	0,0057
280		23	0,14				

Cette librairie d'analogues « de seconde génération » fournit des résultats plus contrastés en termes d'activité : si tous ces analogues possédaient des IC₅₀ très proches en série azotée (entre 0,2 μM et 0,4 μM), la série oxygénée voit des écarts allant jusqu'à un facteur 5 000 (entre **278** et **279**) ! Il apparaît donc difficile de rationaliser ces résultats de prime abord. On peut cependant remarquer que la présence d'un halogène en position *meta* se traduit par des IC₅₀ très proches de celui d'*ITB*₂ (composés **277**, **280**, **281** et **283**). En revanche, la position *para* semble nettement plus défavorable (composés **279** et **282**) : cet effet avait déjà été observé en série azotée mais semble plus net en série oxygénée. Enfin, en plus de **191**, deux autres composés - **278** et **284** - possèdent des IC₅₀ particulièrement faibles, de l'ordre du nanomolaire (IC₅₀ [**278**] = 0,41 nM et IC₅₀ [**284**] = 5,7 nM). La

présence dans ces trois composés d'hétéroatomes (N/O) nous permet d'envisager l'hypothèse d'un réseau d'interactions de type liaison hydrogène autour de la position *meta* pour expliquer en partie l'activité de ces composés. Celles-ci seraient en effet rompues dans le cas de substituants halogénés ou en position *para*. Par ailleurs, ce réseau ne serait également établi que lorsque l'hétéroatome Y est accepteur avec une certaine directionnalité (Y = O), ce qui permettrait d'expliquer la chute d'activité entre certains composés oxygénés et leurs homologues azotés ou soufrés. Cette hypothèse permettant d'expliquer la plupart des résultats expérimentaux, est résumée en Figure 97.

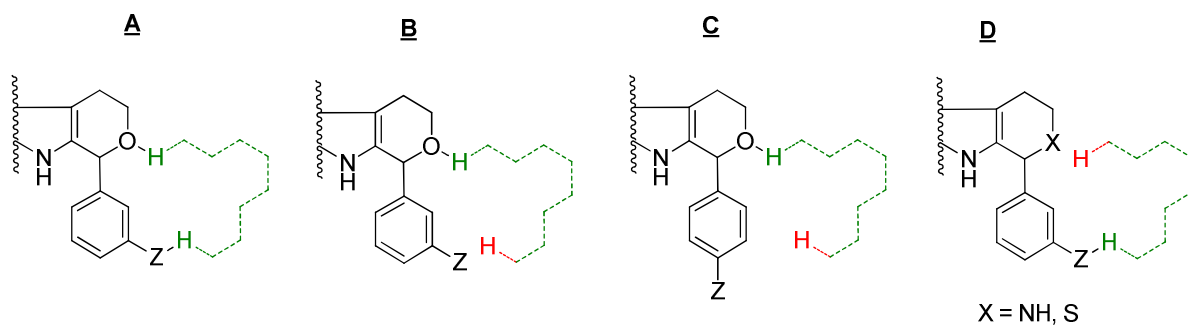


Figure 97 : Hypothèse d'un réseau de liaisons H entre l'hétéroatome X et la position *meta* du cycle D d'ITB₂. En A, le réseau de liaisons H est établi entre l'oxygène et un groupe Z favorable (nitro-, oxygène) ; en B, le réseau est rompu à cause d'un groupe Z défavorable (halogènes) ; en C, le réseau est rompu à cause d'un groupe Z non accessible en position *para* ; en D, le réseau est rompu à cause d'un hétéroatome X défavorable (NH, S).

Notons par ailleurs qu'au vu du résultat du composé **174** (X = O, IC₅₀ [**174**] = 0,25 μM), il aurait été intéressant de diversifier cette librairie avec des analogues mixtes de type tétrahydropyranobenzofurane (X = Y = O) afin d'étudier d'éventuels effets synergiques similaires à ceux décrits précédemment.

b. Détermination de la configuration active

Enfin, toujours dans l'optique d'améliorer l'activité de cette famille et de compléter l'étude SAR, nous avons souhaité déterminer la configuration active d'ITB₂. En effet, tout comme ITB₉, ITB₂ possède un centre asymétrique et tous les analogues testés à présent l'ont été en mélange racémique pour les raisons déjà exposées en partie 3.a. du chapitre III. Les deux énantiomères d'ITB₂ ont donc été séparés sur colonne chirale (ee > 99 %) et évalués indépendamment ; rappelons que ces travaux, effectués par le Dr. Verhaeghe, ont permis d'identifier un eutomère (ITB₂-E₁, IC₅₀ = 0,3 μM) et un distomère (ITB₂-E₂, IC₅₀ = 35 μM), avec un rapport eudismique de 116. Leur configuration absolue restait toutefois indéterminée lors de la reprise de ces travaux. Trois approches permettaient *a priori* d'identifier la configuration active d'ITB₂.

- L'insertion d'une copule chirale permettant la séparation des diastéréomères, puis le retrait de la copule (sans racémisation du centre asymétrique). Celle-ci pouvait notamment être introduite au niveau de l'azote aliphatique N₂ ou de l'azote indolique

N₁₂. Après recristallisation de chacun des énantiomères, une analyse par diffraction aux rayons X pouvait permettre d'accéder à l'information stéréochimique.

- **ITB₂** possédant une fonction amine libre, une co-cristallisation avec un acide carboxylique chiral permettant la séparation des deux diastéréoisomères est également possible. De la même façon, la configuration absolue peut alors être déterminée par diffraction aux rayons X.
- Enfin, nous pouvons déterminer directement les configurations absolues par dichroïsme circulaire, comme nous avons procédé avec **ITB₉**, sous réserve de posséder une référence.

Avant le début des travaux présentés dans ce manuscrit, seule la première approche avait été tentée, avec peu de succès. Nous avons donc choisi les deux autres approches afin de vérifier que les résultats obtenus étaient en concordance.

i) Co-cristallisation

Les premiers essais de co-cristallisation d'**ITB₂** avec des acides chiraux pour obtenir des sels d'ammonium avec les acides L-tartrique et D-tartrique n'ont pas permis d'obtenir un enrichissement notable. En revanche, avec les acides (*S*)-mandélique et (*R*)-mandélique, seul ce dernier a conduit à l'obtention de cristaux énantio-purs (ee > 98 % en HPLC) après trois recristallisations successives à température ambiante dans un mélange toluène/éthanol 1/1. L'analyse de ces cristaux par diffraction aux rayons X, effectuée par Pierre THUERY (*Laboratoire de Chimie de Coordination des Eléments f : CEA/IRAMIS/SIS2M/LCCEf*), permet d'observer une stéréochimie *S* du carbone C₁, comme le montre le cliché présenté dans la Figure 98. Les coordonnées atomiques sont regroupées dans l'Annexe II.

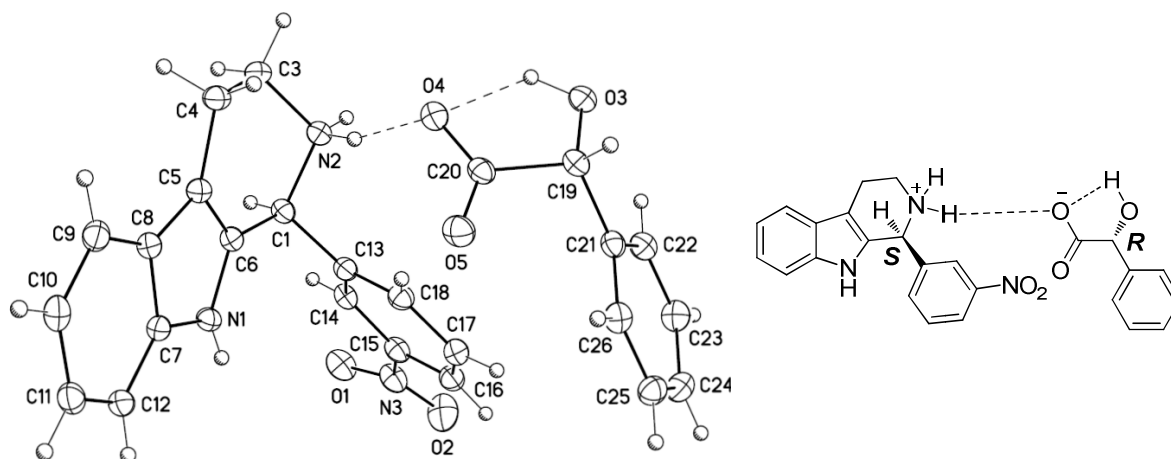
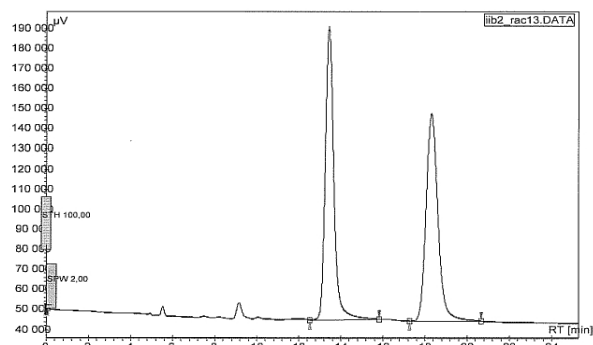


Figure 98 : Configuration absolue de l'énantiomère (*S*)-ITB₂.
La numérotation des atomes ne suit pas la nomenclature utilisée dans ce manuscrit.

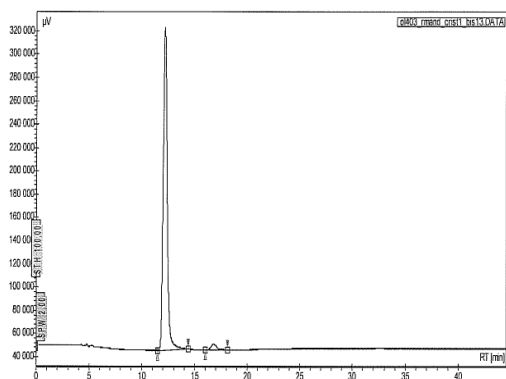
L'énantiomère S ainsi obtenu et le mélange racémique ont ensuite été injectés séparément, puis co-injectés sur colonne chirale dans les mêmes conditions que celles utilisées dans la thèse du Dr. Verhaeghe (Chiracel OD, hexane/éthanol). On observe que le temps de rétention de l'énantiomère actif (eutomère ITB_2-E_1 , sorti en tête de colonne) est identique au lot provenant de la cristallisation décrite précédemment (énantiomère (S)- ITB_2). Ceci est confirmé par la co-injection de ce lot et du mélange racémique (Figure 99). Nous avons ainsi identifié de façon non équivoque l'énantiomère S comme étant l'eutomère ITB_2-E_1 et l'énantiomère R est donc le distomère ITB_2-E_2 . Nous pouvons ainsi conclure que la configuration active d' ITB_2 est la configuration S.

A : Rac- ITB_2



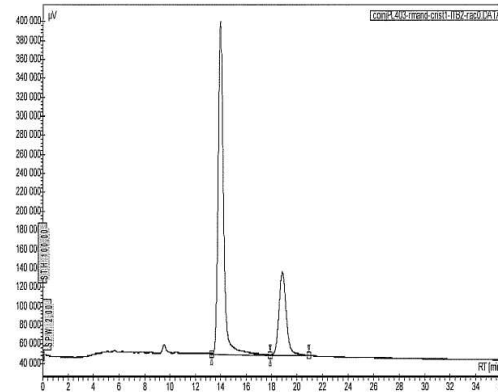
#	Name	Time [Min]	Height [μV]	Area [μV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	13.45	146140.7	69201.1	50.393
2	UNKNOWN	18.31	103630.7	68121.0	49.607
Total			249771.4	137322.1	100.000

B : (S)- ITB_2



#	Name	Time [Min]	Height [μV]	Area [μV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	12.17	277180.4	122947.4	97.058
2	UNKNOWN	16.80	5666.8	3726.3	2.942
Total			282847.2	126673.8	100.000

C : Co-injection Rac- ITB_2 + (S)- ITB_2



#	Name	Time [Min]	Height [μV]	Area [μV.Min]	Area % [%]
1	UNKNOWN	13.95	350198.8	173316.9	75.096
2	UNKNOWN	18.85	87580.3	57475.5	24.904
Total			437779.1	230792.5	100.000

Figure 99 : Spectres obtenus en sortie de colonne chirale pour l'identification de l'énantiomère actif d' ITB_2 . En A, le mélange racémique ; en B, l'énantiomère S ; en C, la co-injection du racémique et de l'énantiomère S.

ii) Dichroïsme circulaire

Par ailleurs, nous avons isolé les deux énantiomères du composé **191**, meilleur inhibiteur de première génération (IC_{50} [**191**] = 5,2 nM), sur une colonne chirale de type Chiralpak AD. Obtenus avec une pureté stéréochimique supérieure à 99 %, $191-E_1$ et $191-E_2$ ont été testés en RAIU en quadruplat : les activités mesurées sont respectivement de 33,4 μM et 61 pM (rapport eudismique >

600 000 !). Ici encore, nous sommes clairement en présence d'un eutomère (**191-E₂**) et d'un distomère (**191-E₁**) dont nous souhaitons déterminer les configurations absolues. La co-cristallisation ne pouvant être réalisée sur ce composé, nous avons tout d'abord réalisé les spectres CD des quatre énantiomères **ITB₂-E₁**, **ITB₂-E₂**, **191-E₁** et **191-E₂**, présentés en Figure 100. L'absence de référence dans la littérature nous a conduits à comparer ces spectres expérimentaux avec des spectres théoriques déterminés *in silico* par le Dr. Bogdan IORGA (*Equipe cristalochimie, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette*); cette procédure a déjà été utilisée dans la littérature.³⁹ Brièvement, grâce au logiciel MacroModel de la suite Schrödinger, quatre conformères d'énergie minimale ont été générés pour les énantiomères R d'**ITB₂** et de **191**. Ensuite, les spectres théoriques de dichroïsme circulaires ont été déterminés pour chacun de ces conformères à l'aide du logiciel Gaussian09. Le spectre moyen a enfin été obtenu en moyennant les quatre spectres théoriques des conformères, pondérés par les distributions de Boltzmann de ces derniers. Les spectres CD théoriques des énantiomères R d'**ITB₂** et **191** sont également présentés en Figure 100.

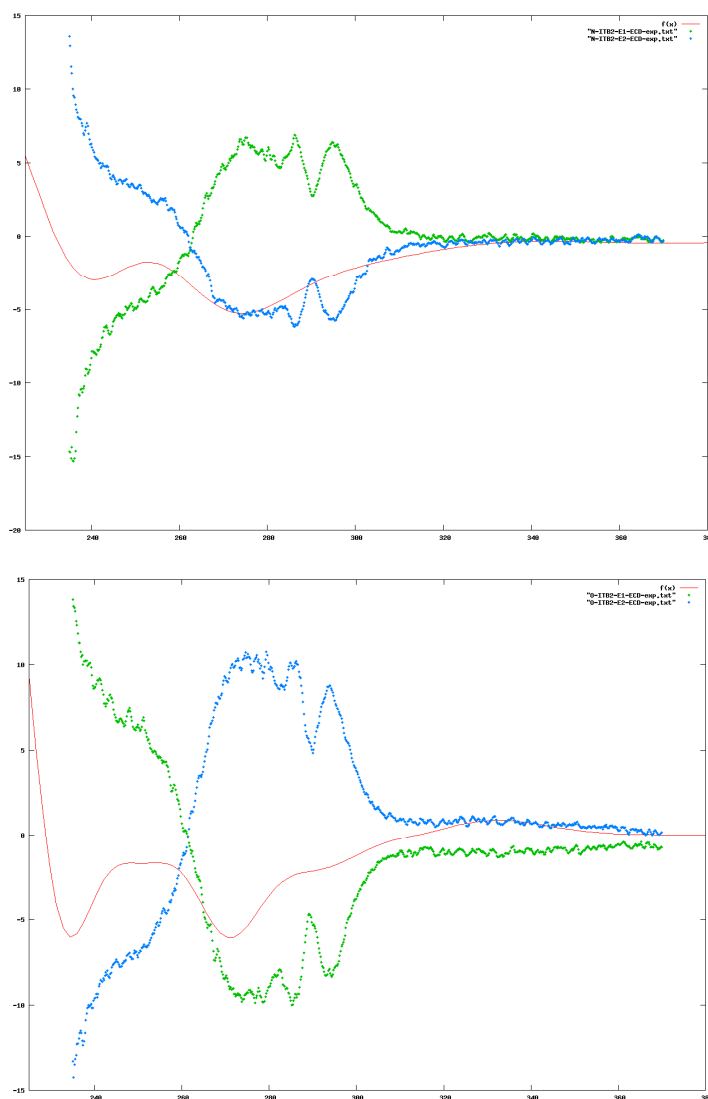


Figure 100 : Spectres CD théoriques et expérimentaux des énantiomères d'**ITB₂** (en haut) et de **191** (en bas). En rouge, le spectre théorique moyen de l'énantiomère R ; en vert, le spectre expérimental de l'énantiomère E1 ; en bleu, le spectre expérimental de l'énantiomère E2.

Pour **ITB₂**, l'adéquation de la courbe théorique avec le spectre expérimental d'**ITB₂-E2** (haut, en bleu) nous permet sans ambiguïté d'attribuer la stéréochimie (*R*) à ce dernier. Nous confirmons ainsi le résultat déterminé par diffraction aux rayons X dans la partie précédente, à savoir la stéréochimie (*S*) de l'eutomère **ITB₂-E1**. Par ailleurs, en ce qui concerne le composé **191**, l'adéquation entre le spectre théorique et le spectre expérimental de **191-E1** (bas, en vert) est moins franche mais reste satisfaisante pour attribuer la stéréochimie (*R*) à cet énantiomère. Or, pour **191**, l'ordre de sortie en tête de colonne est inversé et l'énantiomère E1 est le distomère. Finalement, nous pouvons conclure que pour ces deux composés – et donc *a priori* pour toute la famille d'**ITB₂** – la stéréochimie (*S*) en C₁ est responsable de l'activité.

c. Conclusion

Dans cette partie, en nous inspirant des relations structure-activité déterminées en partie 3, nous avons dans un premier temps conçu et synthétisé, puis testé une dizaine d'analogues de seconde génération en série oxygénée (Y = O). Deux de ces composés se sont révélés particulièrement actifs (IC₅₀ [**278**] = 0,41 nM, IC₅₀ [**284**] = 5,7 nM) et constituent – avec le composé **191** (IC₅₀ [**191**] = 5,2 nM) – des candidats intéressants pour un développement ultérieur en vue d'une utilisation thérapeutique. Dans un second temps, nous avons tâché d'identifier la stéréochimie du carbone C₁ responsable de l'activité : nous avons identifié pour **ITB₂** et **191** un eutomère et un distomère. Par comparaison avec des spectres CD théoriques obtenus *in silico*, la configuration active de C₁ a été identifiée comme étant (*S*). Cette stéréochimie préférentielle a été confirmée par diffraction aux rayons X pour **ITB₂**.

5. Sondes photoactivables dérivées d'ITB₂

a. Conception des sondes

La conception d'une sonde dérivée d'**ITB₂** s'est appuyée sur plusieurs considérations. A titre de rappel, le Dr. Waltz avait synthétisé lors de sa thèse une sonde photoactivable à partir d'une étude SAR minimale et en utilisant comme point d'ancrage l'atome d'azote N₂ (composé **166**). Cette sonde – en dépit d'une activité satisfaisante (IC₅₀ [**166**] = 0,2 μM) - n'avait pas permis d'isoler de manière formelle la protéine-cible de cette famille. Par ailleurs, nous avons montré lors de l'étude SAR que le remplacement de l'atome d'azote N₂ par un oxygène permettait d'améliorer l'activité biologique de façon importante (composé **191**). Il nous a donc semblé intéressant de valoriser ces résultats en concevant une deuxième sonde « oxygénée » basée sur **191**, et comportant donc avec un point d'ancrage des fonctionnalités [groupe photoactivable + desthiobiotine] différent. Pour cela,

la position 3' est particulièrement indiquée dans la mesure où elle tolère une grande diversité de substituants aux propriétés physico-chimiques et stériques très différentes (partie 3.b.iii)

b. Synthèse d'une sonde dérivée d'ITB₂

i) Synthèse d'une première sonde **285**

Nous avons donc choisi de concevoir une sonde **285**, dérivée d'ITB₂ et où les fonctionnalités seraient greffées en position 3' de la même façon que la sonde **139**. Nous avons donc tenté de synthétiser **285** selon la voie décrite dans la Figure 101. Brièvement, nous avons tout d'abord effectué l'hydrogénation de la fonction nitro- de **191** pour obtenir l'aniline **286**, dans les conditions utilisées par le Dr. Verhaeghe² sur ITB₂; les conditions et le rendement obtenu (87 %) sont ainsi parfaitement transposables sur le dérivé oxygéné. Par la suite, un couplage peptidique avec la Boc-β-alanine a permis d'obtenir l'amide **287** avec un rendement de 92 %. Toutefois, le clivage du groupement protecteur n'a pas pu être effectué de façon satisfaisante : quelles que soient les conditions opératoires utilisées (TFA/dichlorométhane ou HCl/dioxane à différentes concentrations et températures), une dégradation du mélange réactionnel est systématiquement observée. Nous avons donc choisi de modifier la synthèse en utilisant un groupe protecteur différent.

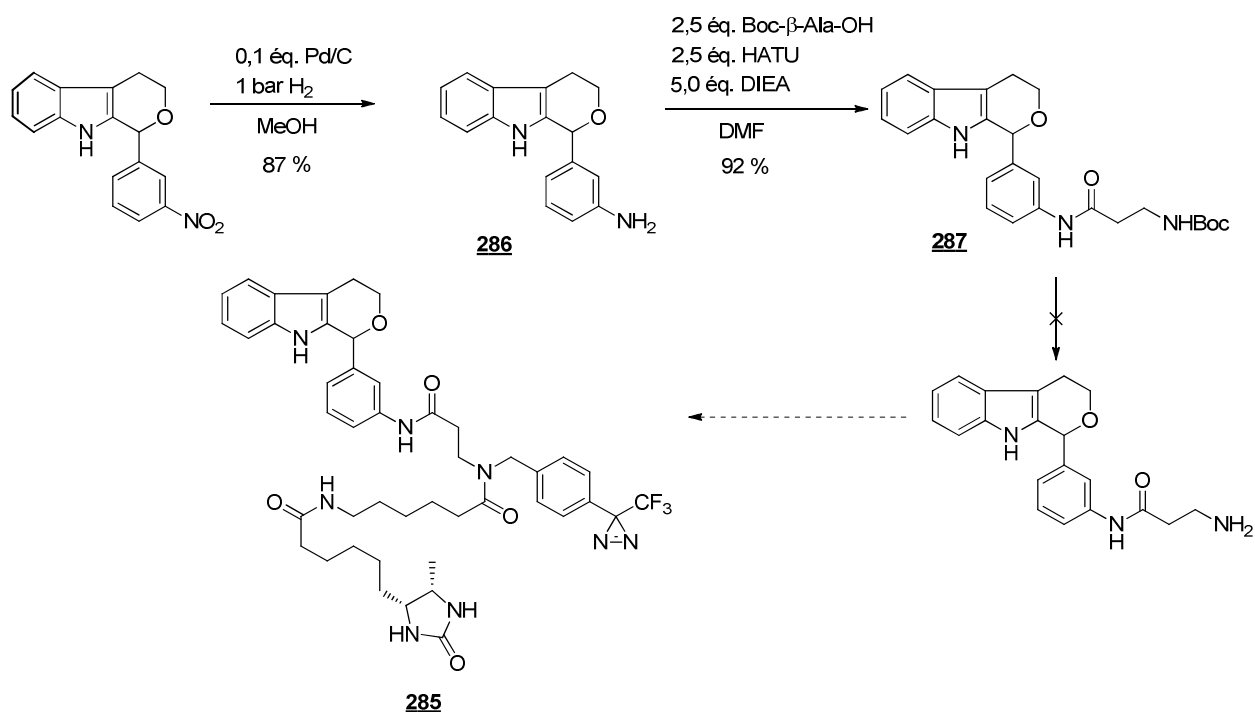


Figure 101 : Voie de synthèse de la sonde **285**

ii) Synthèse d'une deuxième sonde **288**

Les essais de synthèse de **285** s'étant avérés difficiles, la voie de synthèse a été reprise en modifiant le groupement protecteur de la fonction amine primaire afin d'obtenir une déprotection plus efficace. En fonction des synthons disponibles au laboratoire, nous avons ainsi choisi de greffer une glycine protégée par un groupement Fmoc, qui peut être clivé en conditions plus douces. La longueur du bras espaceur, réduit d'un chaînon par rapport à **285**, permet encore une certaine flexibilité, tout en conservant le groupement photoactivable relativement proche du squelette de l'inhibiteur. La synthèse de **288** est présentée en Figure 102. Brièvement, un couplage de type peptidique entre **286** et la Fmoc-glycine permet d'obtenir le composé protégé **289** avec 67 % de rendement. La déprotection de l'amine dans des conditions douces (TBAF/DMF à température ambiante⁴⁰), suivie d'une amination réductrice sur **141**, forme l'amine secondaire **290** - obtenue avec un rendement de 35 % sur les deux étapes. Enfin, un autre couplage de type peptidique avec l'acide **140** permet d'accéder à la sonde **288** sous forme d'un mélange de diastéréoisomères, avec un rendement final de 44 %.

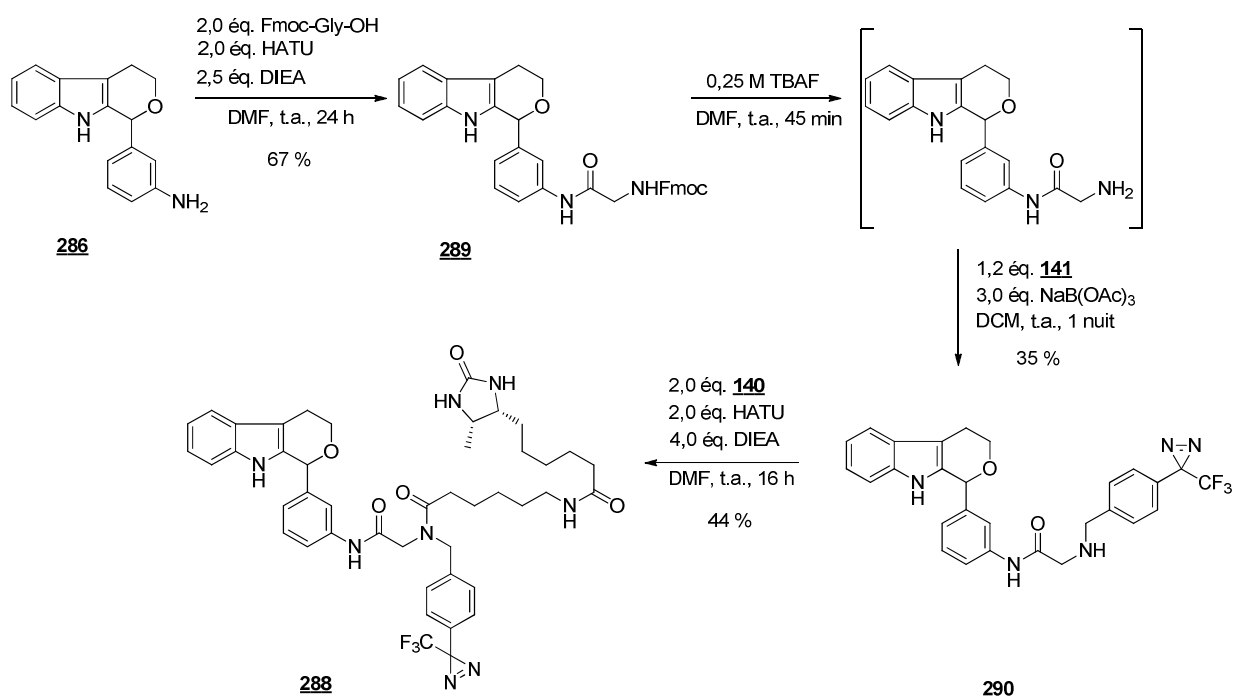


Figure 102 : Synthèse de la sonde **288**

Nous avons ainsi réussi à synthétiser une sonde **288** à partir du composé **191**, sur la base de l'étude SAR réalisée sur **ITB₂**. Obtenue sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, elle sera utilisée telle quelle pour le photomarquage d'affinité.

iii) **Activité biologique de **288** et des intermédiaires de synthèse**

Comme pour **ITB₂**, nous devons nous assurer que la sonde ainsi synthétisée reste active. Nous avons également testé les intermédiaires de synthèse vis-à-vis de l'incorporation d'iodures. Les résultats sont présentés dans le Tableau 48.

Tableau 48 : IC₅₀ de la sonde **288 et des intermédiaires de synthèse.** Les IC₅₀ d'**ITB₂** et du composé **191**, sur lequel est basée la sonde sont rappelés à titre indicatif.

Composé	ITB₂	191	286	289	290	288
IC ₅₀ (μM)	0,3	0,0052	0,0011	0,14	57	13

On remarque donc que l'aniline **286** est un inhibiteur particulièrement actif, avec un IC₅₀ mesuré de 1,1 nM. Cette valeur est surprenante compte tenu du fait que son homologue azoté **163** avait été évalué par le Dr. Verhaeghe à 10 μM (partie 1.c.i). Toutefois, il constitue un analogue de seconde génération pouvant être associé aux composés **277** à **284**. Par ailleurs, l'ajout d'un bras contenant l'amine protégée par un groupe FMOC permet de conserver une activité proche d'**ITB₂** (composé **289**) alors que le composé **290** est, lui, peu actif (IC₅₀ = 57 μM). Enfin, la sonde **288** possède une activité 4 fois inférieure à **ITB₂**, avec un IC₅₀ évalué à 13 μM ; cependant, il s'agit d'une valeur suffisante pour réaliser des expériences de photomarquage, qui seront présentées dans la partie suivante.

c. **Photomarquage d'affinité**

i) **Identification de protéines spécifiques d'**ITB₂****

De la même façon que pour la sonde **139** dérivée d'**ITB₂**, nous avons réalisé des essais de photomarquage dans les conditions suivantes, issues à la fois des optimisations réalisées par le Dr. Waltz et de celles effectuées en partie 5.e.i) du chapitre III :

- Photomarquage sur cellules entières, irradiation de 4 minutes
- Concentration de sonde : cette fois-ci, au vu de l'IC₅₀ plus élevé de **288** (IC₅₀ [**288**] = 13 μM), deux concentrations de sonde ont été utilisées : 5 μM et 50 μM.
- Concentration en compétiteur **191** : 250 μM (limité par la solubilité dans le tampon)
- Solution de streptavidine-HRP : 250 ng/mL

Le film photo obtenu après révélation par chimioluminescence est présenté en Figure 103.

Piste	1	2	3	4	5	6	7
[Sonde 288]		-	25 µM	5 µM	5 µM	50 µM	50 µM
[Compétiteur 191]		-	/	/	250 µM	/	250 µM
	PM		Sans UV				

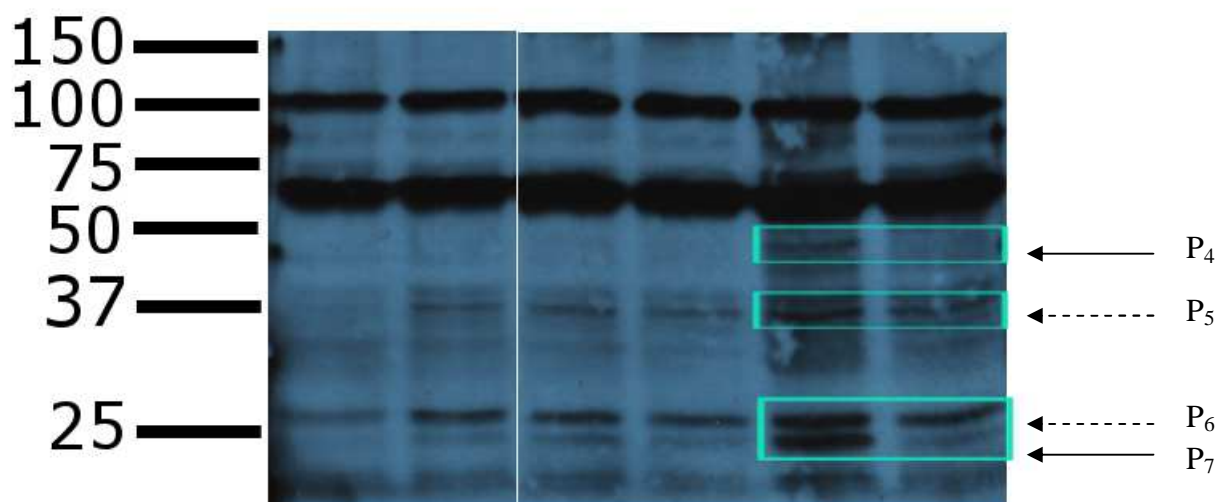


Figure 103 : Film photo obtenu après 4 minutes d'irradiation, à différentes concentrations de sonde **288**, en présence ou en absence de compétiteur. Sont également présentés en pistes 1, 2 et 3 les marqueurs de poids moléculaire, un contrôle sans sonde et un contrôle sans irradiation UV.

Les pistes ainsi obtenues montrent clairement le marquage spécifique de plusieurs cibles à la plus haute concentration de sonde utilisée. En effet, même si l'intensité de la piste 6 est globalement plus forte que les autres, la comparaison des pistes 2 (absence de sonde), 6 (avec sonde) et 7 (avec sonde et compétiteur) indique qu'au moins deux bandes (P_4 et P_7) correspondent à des protéines marquées spécifiquement par la sonde **288**. Ces bandes sont très nettement absentes des pistes contrôle 2 et 3 et s'éteignent quasiment complètement en présence d'un excès de compétiteur (piste 7). Ce sont donc très probablement des cibles spécifiques d'ITB₂. Leurs poids moléculaires respectifs sont de 50 kDa et 25 kDa environ. Pour P_5 et P_6 , l'interprétation est moins directe : en effet, ces bandes apparaissent sur le contrôle en piste 3 où les échantillons n'ont pas subi d'irradiation UV, et P_6 est même présente de façon plus discrète en piste 2. Par ailleurs, l'extinction de ces bandes en présence de compétiteur n'est pas aussi nette que pour P_4 et P_7 . Deux remarques permettent toutefois de nuancer ces observations : d'une part, la haute concentration de sonde utilisée en contrôle (25 µM) peut suffire à marquer des protéines cibles en présence de lumière naturelle, à laquelle sont inévitablement exposés les échantillons durant les manipulations. D'autre part, l'excès de compétiteur n'est que d'un facteur 5 en concentration ; même si l'IC₅₀ mesuré de ce dernier est beaucoup plus élevé que celui de la sonde **288**, rappelons que ceci n'est pas forcément révélateur d'une affinité beaucoup plus importante pour ces cibles, particulièrement si celles-ci sont secondaires : d'autres paramètres d'ordre pharmacocinétique peuvent influencer cette valeur. De plus, si les constantes d'affinité de **191** et **288** pour les cibles P_5 et P_6 sont en réalité proches,

l'échange entre le ligand et la sonde vis-à-vis du site actif de la protéine peut alors être assez équilibré et l'effet de compétition observé assez faible.

ii) Comparaison des deux sondes dérivées d'ITB₂, **166** et **288**

Il nous a paru intéressant de mener des expériences de photomarquage pour comparer les profils obtenus avec la sonde **166** synthétisée par le Dr. Waltz, et notre sonde **288**. En effet, nous avons particulièrement mis en évidence dans la partie 5 du chapitre I, consacrée à la chémogénomique, le fait que deux sondes photoactivables basées sur le même composé de départ peuvent mener à l'identification de cibles différentes. Les structures des sondes, rappelées en Figure 104 comportent un point d'ancrage des fonctionnalités différent et ne possèdent pas la même étiquette (biotine ou desthiobiotine).

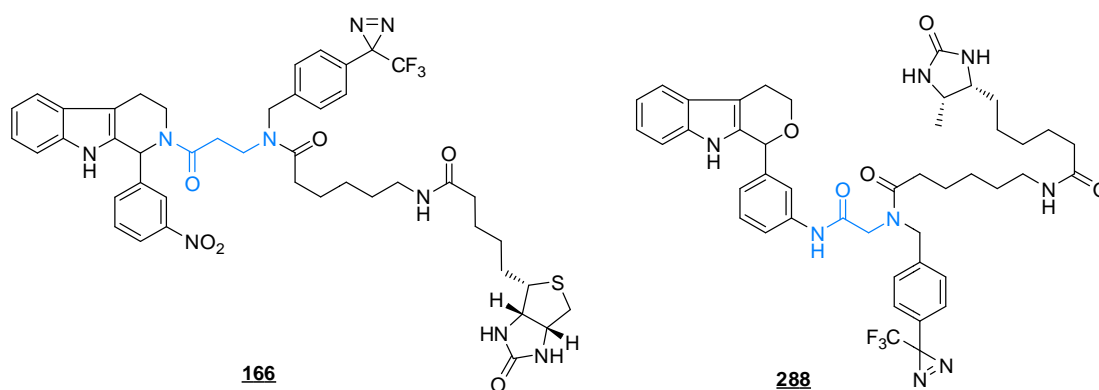


Figure 104 : Structure des sondes dérivées d'ITB₂, **166** et **288**.
Les points d'ancrage du groupe photoactivable et de l'étiquette sont indiqués en bleu.

Les expériences de photomarquage ainsi réalisées pour comparer les deux sondes ont été effectuées dans les conditions décrites précédemment, et les résultats correspondants sont présentés en Figure 105.

Piste	1	2	3	4
Sonde à 50 µM	166	166	288	288
Compétiteur à 250 µM	/	ITB₂	/	191

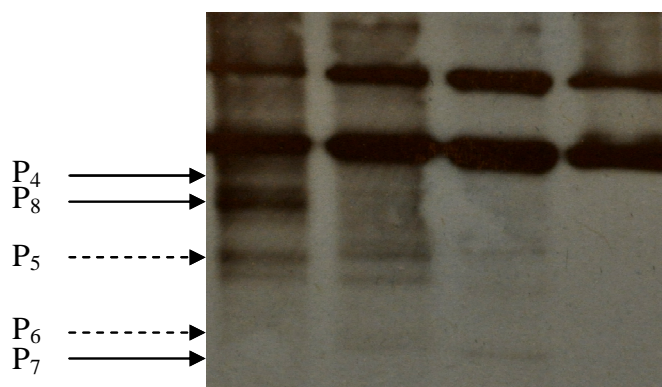


Figure 105 : Comparaison du photomarquage entre les sondes **166** et **288**

La comparaison des pistes 1 et 2 montre le marquage spécifique net par **166** d'une bande, qui avait déjà été observée par le Dr. Waltz – bien que de manière beaucoup moins nette (à une concentration de 10 μ M). En revanche, les pistes 3 et 4 ne permettent pas une visualisation aussi nette des protéines P₄ à P₇ identifiées à partir de la Figure 103. Ceci peut être attribué *a posteriori* à une moindre efficacité de la lyse cellulaire effectuée sur ces deux échantillons lors des manipulations. Cependant, les positions des protéines étant repérées, il apparaît que P₆ et P₇ ne sont pas marquées par **166**, tandis que la situation est moins claire pour P₅. En revanche, une bande large, dans la région de P₄, disparaît complètement en présence de compétiteur (pistes 1 et 2) : il est cependant difficile de distinguer si elle correspond à une ou deux protéines (P₄ et/ou P₈). En tout état de cause, les profils obtenus en utilisant **166** et **288** sont différents et suggèrent que ces deux sondes, pourtant basées sur le même inhibiteur, marquent des cibles différentes et éventuellement certaines en commun.

iii) Purification des échantillons marqués par **288** pour identification

Enfin, en reprenant l'échantillon marqué par la sonde **288**, nous avons tenté de purifier ce dernier en vue de l'identification d'une ou plusieurs des protéines P₄ à P₇. En effet, l'analyse par spectrométrie de masse sera effectuée à partir de morceaux de gel SDS-PAGE excisés dans la région correspondant à la protéine d'intérêt. Il faut donc que celle-ci soit particulièrement propre pour éviter la contamination de l'échantillon par d'autres protéines de poids moléculaire proche qui pourraient fausser l'identification. Par manque de temps, nous avons seulement utilisé un ensemble de conditions opératoires en s'inspirant des travaux de thèse du Dr. Waltz :

- Incubation de l'échantillon sur billes d'agarose-streptavidine pendant une nuit à 4 °C. Cette étape permet de capter les protéines biotinylées sur billes, dont la (ou les) protéines d'intérêt.
- Une série de lavages des billes dans des conditions de plus en plus drastiques (PBS à froid, solutions de NaCl à température ambiante, puis tampon Laemmli à 40 °C) permet d'éliminer successivement un certain nombre de protéines non spécifiques.
- Une dernière élution dans du tampon Laemmli à 60 °C permet de décrocher plusieurs protéines dont potentiellement la (ou les) protéines d'intérêt.

L'expérience est doublée en utilisant un échantillon photomarké par **288** en présence de compétiteur **191**, afin de bien repérer les protéines marquées spécifiquement par la sonde. Le film photographique correspondant à cette expérience est présenté en Figure 106.

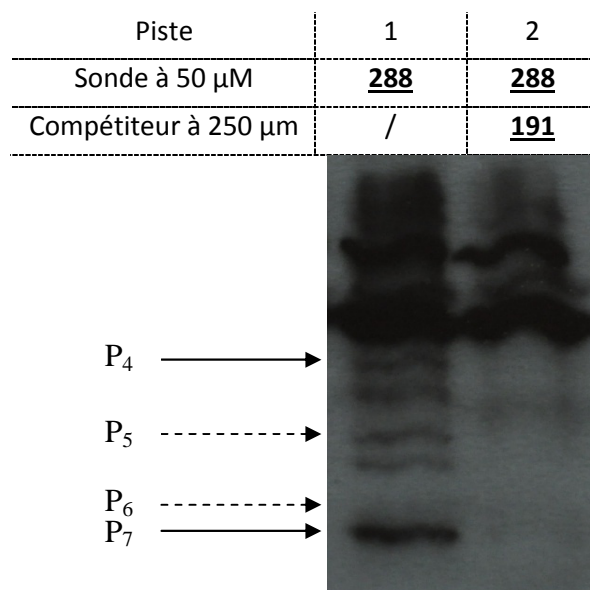


Figure 106 : Film photo des premières expériences de purification d'échantillons marqués par 288

Après passage sur billes d'agarose-streptavidine, on observe en piste 1 plusieurs bandes correspondant à des protéines marquées spécifiquement et retenues sur les billes après les différents lavages. Si l'on retrouve vraisemblablement les protéines P₄, P₅ et P₇, deux autres bandes non observées auparavant sont également présentes. Cependant, en l'absence d'expériences complémentaires, nous n'avons pas approfondi les investigations sur ces dernières. Tout au plus pouvons nous noter que la protéine P₇ semble abondante et dans une région du gel particulièrement propre par rapport au premier film obtenu en Figure 103. Ce résultat est donc satisfaisant et pourrait conduire à l'identification prochaine de cette protéine ; les expériences de dépôt sur gel SDS-PAGE et d'identification par spectrométrie de masse sont en effet en cours de réalisation.

6. Conclusion générale et perspectives

Dans cette partie, nous avons présenté un certain nombre de travaux effectués sur le composé ITB₂. Après un rappel des travaux antérieurs déjà réalisés sur cette famille au laboratoire, nous avons présenté la synthèse et l'évaluation biologique d'une centaine d'analogues, nous ayant permis d'établir plusieurs relations structure-activité. En particulier, une étude assez large a été menée sur le cycle D et a conduit à la mise en évidence d'une position préférentielle de substitution, en *meta* ; en revanche, la nature du substituant (encombrement et propriétés physico-chimiques) semble avoir peu d'influence sur l'activité biologique. Par ailleurs, en ce qui concerne les modifications sur les cycles A, B et C, celles-ci pourraient être complétées, notamment la substitution sur le cycle A et la taille des cycles B et C. Cependant, l'accessibilité synthétique de ces dérivés reste limitée *a priori*. L'étude SAR réalisée montre que le squelette tétrahydro- β -carboline d'ITB₂ reste globalement peu variable au niveau de la structure carbonée. Les hétéroatomes X et Y, s'ils ne

représentent pas des points de fonctionnalisation majeurs, peuvent être remplacés par leurs isostères (NH/O/S) avec une totale rétention d'activité biologique – voire une amélioration substantielle d'un facteur 60 pour le dérivé **191** (Y = O). Enfin, il existe une stéréochimie préférentielle au niveau du carbone asymétrique C₁ : celle-ci a été déterminée par diffraction aux rayons X et est (S) pour **ITB₂**. Une confirmation a été apportée par comparaison des spectres expérimentaux avec des spectres CD obtenus *in silico*. Cette dernière approche nous a également permis de déterminer la stéréochimie (S) de l'eutomère de **191**, **191-E1**.

Dans un deuxième temps, nous avons conçu et synthétisé plusieurs composés particulièrement actifs, basés sur le composé **191**. Outre ce dernier, les analogues **278**, **284** et **287** possèdent tous des IC₅₀ inférieurs à 5 nM et représentent donc des candidats thérapeutiques intéressants dans cette deuxième famille. De la même façon que pour **ITB₂**, ces composés ont fait l'objet d'un brevet⁴¹ mais n'ont pas été exploités plus avant ; en particulier, l'étude de leur stabilité chimique et métabolique ainsi que des premiers tests pharmacocinétiques devraient être conduits. Le potentiel de ces composés reste toutefois entier, dans la mesure où ils constituent une famille alternative à celle d'**ITB₂** et possédant *a priori* un mode d'action différent.

Enfin, une sonde photoactivable **288**, dérivée de **191** et basée sur les conclusions des études SAR, a été synthétisée. Malgré une activité modérée (IC₅₀ [**288**] = 13 μM), cette sonde a mené au marquage spécifique de deux protéines P₄ et P₇ – et éventuellement de deux autres, P₅ et P₆. Il est intéressant de constater qu'à première vue, certaines de ces protéines sont différentes de celles marquées par la sonde **166** dérivée d'**ITB₂**, synthétisée par le Dr. Waltz au cours de sa thèse. Par ailleurs, un premier essai de purification sur billes d'agarose-streptavidine a conduit à l'obtention d'un profil de gel satisfaisant dans la région de la protéine P₇, pouvant conduire à l'identification de cette dernière. La prolongation de ces expériences – purification, isolement et identification en spectrométrie de masse – pourrait à terme mener à la découverte de nouvelles protéines ayant un rôle dans le transport de l'iode. Celles-ci, si elles sont confirmées et originales, ouvrent la voie à de nouvelles cibles thérapeutiques ainsi qu'à une meilleure connaissance des mécanismes biologiques régissant le transport de l'iode dans la glande thyroïde.

Références bibliographiques

- ¹ Lecat-Guillet N, Merer G, Lopez R, Pourcher T, Rousseau B, Ambroise Y, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 889-895
- ² Verhaeghe E, "Etude des mécanismes d'accumulation de l'iode chez l'algue brune *Laminaria Digitata* et chez les mammifères", **2007**, Université Paris XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, CEA-Saclay
- ³ Waltz F, "Etude du transport de l'iode par chémogénomique", **2011**, Université Paris XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, CEA-Saclay
- ⁴ Yamashita T, Kawai N, Tokuyama H, Fukuyama T, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15038-15039
- ⁵ Tamayo NA, Bo Y, Gore V, Ma V, Nishimura N, Tang P, Deng H, Klionsky L, Lehto SG, Wang W, Youngblood B, Chen J, Correll TL, Bartberger MD, Gavva NR, Norman RH, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1593-1611
- ⁶ Jayaraman M, Fox BM, Hollingshead M, Kohlhagen G, Pommier Y, Cushman M, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 242-249
- ⁷ Tsou HR, Liu X, Birnberg G, Kaplan J, Otteng M, Tran T, Kuterer K, Tang Z, Suayan R, Zask A, Ravi M, Bretz A, Grillo M, McGinnis JP, Rabindran SK, Ayril-Kaloustian S, Mansour TS, *J. Med. Chem.* **2009**, *8*, 2289-2310
- ⁸ Bischler A, Napieralski B, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1893**, *2*, 1903-1908
- ⁹ Patil R, Patil S, Wang XD, Ma F, Orr WE, Li W, Yates CR, Geisert EE, Miller DD, *Med. Chem. Res.* **2011**, *20*, 131-137
- ¹⁰ Bridoux A, Millet R, Pommery J, Pommery N, Henichart JP, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *11*, 3910-3924
- ¹¹ Plattner JJ, Herbert CA, Tretter JR, **1977**, US4001263
- ¹² Singh V, Hutait S, Biswas S, Batra S, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *3*, 531-539
- ¹³ Panarese JD, Waters SP, *Org. Lett.* **2010**, *18*, 4086-4089
- ¹⁴ Dong J, Shi XX, Yan JJ, Xing J, Zhang Q, Xiao S, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *36*, 6987-6992
- ¹⁵ Faust R, Garrat PJ, Yeh LK, Tsotinis A, Panoussopoulou M, Calogeropoulou T, Teh MT, Sugden D, *J. Med. Chem.* **2000**, *6*, 1050-1061
- ¹⁶ Thorsett ED, pp. 257-268 in *Actualités de Chimie Thérapeutique*, Combet-Farnoux C, Société de Chimie Thérapeutique, Châtenay-Malabry
- ¹⁷ Yeung BKS, Zou B, Rottmann M, Lakshminarayana SB, Ang SH, Leong SY, Tan J, Wong J, Keller-Maerki S, Fischli C, Goh A, Schmitt EK, Krastel P, Francotte E, Kuhen K, Plouffe D, Henson K, Wagner T, Winzeler EA, Petersen F, Brun R, Dartois V, Diagana TT, Keller TH, *J. Med. Chem.* **2010**, *14*, 5155-5164
- ¹⁸ a) Liu Y, Shang D, Zhou X, Liu X, Feng X, *Chem. Eur. J.* **2009**, *9*, 2055-2058 ; b) Burm BEA, Gremmen C, Wanner MJ, Koomen GJ, *Tetrahedron* **2001**, *10*, 2039-2050
- ¹⁹ Hagihara M, Komori KI, Sunamoto H, Nishida H, Matsugi T, Nakajima T, Hatano M, Kido K, Hara H, *EP1679308*, **2006**
- ²⁰ Maryanoff BE, Zhang HC, Cohen JH, Turchi IJ, Maryanoff CA, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1431-1628
- ²¹ Wang YF, Song ZB, Chen CX, Peng JS, *Sci. Chin. Chem.* **2010**, *3*, 562-568
- ²² Yamanaka E, Shibata N, Sakai S, *Heterocycles* **1984**, *2*, 371-375
- ²³ Hu B, Ellingboe J, Gunawan I, Han S, Largis E, Li Z, Malamas M, Melvey R, Oliphant A, Sum FW, Tillett J, Wong V, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 575-760
- ²⁴ Abou-Gharbia M, Patel UR, Webb MB, Moyer JA, Andree TH, Muth EA, *J. Med. Chem.* **1987**, *10*, 1818-1823
- ²⁵ Wünsch B, Zott M, *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, *39*
- ²⁶ Larghi EL, Kaufman TS, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *27*, 5195-5231
- ²⁷ Guiso M, Marra C, Cavarischia C, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6531
- ²⁸ Guiso M, Bianco A, Marra C, Cavarischia C, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3407
- ²⁹ Bouguerne B, Hoffmann P, Lherbet C, *Synth. Comm.* **2010**, *40*, 915-926
- ³⁰ Bouguerne B, Lherbet C, Baltas M, *Lett. Org. Chem.* **2010**, *6*, 420-423
- ³¹ Danieli B, Lesma G, Passarella D, Silvani A, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3489
- ³² Jirkovsky I, Humber LG, Noureldin R, *J. Het. Chem.* **1975**, *5*, 937-940
- ³³ Lemaire S, Willemsens B, Markó IE, *Synlett* **2007**, *5*, 709-712
- ³⁴ Demerson CA, Humber LG, Dobson TA, Martel RR, *J. Med. Chem.* **1975**, *2*, 189-191
- ³⁵ a) Katz AH, Demerson CA, Shaw CC, Asselin AA, Humber LG, Conway KM, Gavin G, Guinasso C, Jensen NP, Mobilio D & al. *J. Med. Chem.* **1988**, *6*, 1244-1250 b) Chau TT, Weichman BM, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **1989**, *3*, 907-915
- ³⁶ Demerson CA & al., *US3939178*, **1976**

³⁷ Mullane JF, US4742076, **1988**

³⁸ p. 182, "Vinylogues and benzologues" in *The Practice of Medicinal Chemistry*, Wermuth GC, **2003**, Elsevier, ISBN : 0-12-744481-5

³⁹ Gu SX, Li ZM, Ma XD, Yiang SQ, He QQ, Chen FE, De Clerck E, Balzarini J, Pannecouque C, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *53*, 229-234

⁴⁰ Ueki M, Amemiya M, *Tet. Lett.* **1987**, *28*, 6617-6620

⁴¹ En cours de dépôt à l'OEB

Chapitre V : A la recherche de nouvelles familles d'inhibiteurs...

A la suite des résultats biologiques obtenus sur les analogues d'**ITB₉** de première génération (chapitre III, partie 3), une collaboration a été entamée avec l'équipe du Dr. Iorga, visant à découvrir de nouvelles familles de molécules actives sur le transport de l'iode à l'aide des outils de modélisation moléculaire. Les années 2000 ont vu en effet l'émergence d'approches *in silico* ayant pour but de concevoir de nouvelles molécules actives, en complément des méthodes « classiques » (criblage haut-débit, optimisation de molécules existantes...);^{1,2} ces différentes méthodes assistées par ordinateur peuvent être classées en deux types généraux :^{3,4}

- L'approche « *structure-based* » repose sur la conception de nouveaux ligands en fonction de la structure connue de la cible ou du récepteur biologique.
- L'approche « *ligand-based* » consiste en revanche à construire à partir d'une famille de ligands d'activités connues un modèle pharmacophorique de la cible biologique. Ce dernier est composé d'un arrangement tridimensionnel de plusieurs fragments nécessaires à l'activité, déterminés en fonction des résultats biologiques de la famille de ligands connus. Des bibliothèques de composés peuvent ensuite être criblées virtuellement afin de découvrir de nouvelles têtes de file. Ce type d'approche est le seul utilisable dans notre cas, car la structure de la cible biologique est inconnue.

Les activités biologiques de 126 analogues d'**ITB₉** déterminées dans le chapitre III serviront ainsi à concevoir un modèle pharmacophorique. Ce dernier sera ensuite « criblé » virtuellement sur deux bibliothèques commerciales, afin de trouver de nouveaux composés actifs *in silico*, qui seront validés expérimentalement. Ceux-ci pourront servir de têtes de file pour une nouvelle optimisation. Cette démarche a été utilisée notamment pour découvrir cinq nouveaux composés actifs sur une lignée cellulaire LNCaP (cancer de la prostate) par criblage sur les bibliothèques Maybridge et NCI⁵ et cinq nouveaux inhibiteurs de la tyrosine phosphatase h-PTP 1B par criblage sur la bibliothèque NCI.⁶

1. Détermination d'un modèle pharmacophorique d'ITB₉

Le modèle pharmacophorique a été généré par le Dr. Georgiana SURPATEANU (*Equipe cristallographie, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette*) grâce au logiciel Discovery Studio 3.1 (ex-Catalyst) d'Accelrys® à partir des analogues d'**ITB₉**, en utilisant le module

HypoGen. Pour chacun des 126 composés de la famille, plusieurs conformères sont générés par minimisation d'énergie en utilisant le champ de force CHARMM⁷, et en tenant compte de la stéréochimie active de C₄, déterminée en partie 4.c. du chapitre III. Chacune de ces structures est ensuite assignée dans une des trois catégories : « actif », « neutre » ou « inactif ». Notons ainsi que le pharmacophore obtenu est donc issu d'une analyse qualitative et non quantitative. Plus particulièrement, les structures retenues comme « actives » ont été sélectionnées avec pIC₅₀ > 4 (Tableau 49) et l'alignement des conformères retenu pour générer le pharmacophore est présenté en Figure 107 :

Tableau 49 : Composés "actifs" pour génération du pharmacophore

Code	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>49</u>	<u>50</u>	<u>129</u>	<u>137</u>
Structure						
IC ₅₀ (mM)	0,000065	0,000075	0,0000032	0,00002	0,000004	0,00000085
pIC ₅₀	4,2	4,1	5,5	4,7	5,4	6,1

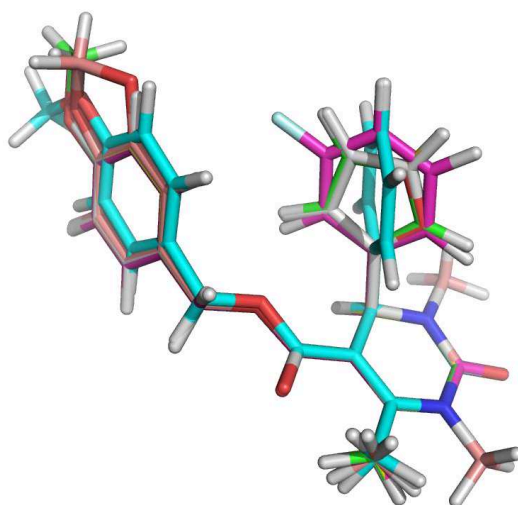


Figure 107 : Alignement des conformères des 6 composés "actifs" retenu pour générer le pharmacophore

A partir de l'alignement de ces structures, plusieurs modèles pharmacophoriques sont proposés avec une fonction de score et nous avons choisi le meilleur d'entre eux ; ce dernier comporte les caractéristiques suivantes (Figure 108) :

- 5 fragments pharmacophoriques, de type ARRHD :
 - un accepteur de liaisons hydrogène (A), figuré en vert, centré sur l'oxygène en *para* du groupe méthoxybenzyle en R₅.

- deux cycles aromatiques (R), figurés en orange, correspondant aux deux noyaux aromatiques d'**ITB₉** en R₄ et R₅.
 - un groupe hydrophobe (H), figuré en bleu, correspondant à une courte chaîne alkyle en R₆.
 - un donneur de liaisons hydrogène (D), figuré en rose, centré sur l'azote N₃.
- 13 volumes d'exclusion, figurés en gris, générés sur la base des résultats des analogues les moins actifs ($pIC_{50} < 1,2$). Ils définissent des zones « interdites », sensibles à l'encombrement stérique et ne devant pas être substituées de préférence. En particulier, 9 d'entre eux, situés autour de R₄, traduisent la grande sensibilité de cette position à la substitution.

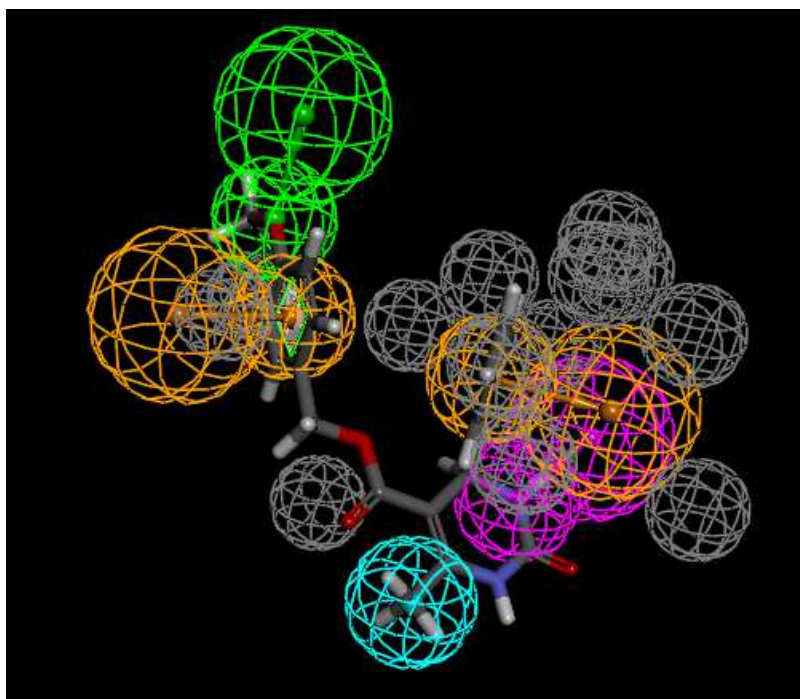


Figure 108 : Structure d'**ITB₉** et meilleur modèle pharmacophorique obtenu avec Discovery Studio® à partir de la famille d'**ITB₉**.

2. Criblage sur les chimiothèques commerciales

Dans un deuxième temps, les structures chimiques contenues dans deux chimiothèques commerciales ont été alignées *in silico* sur ce pharmacophore. Un score a été attribué à chacune en fonction de son adéquation avec le modèle proposé.

a. Présentation des chimiothèques

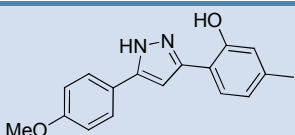
La première chimiothèque est DIVERSet de Chembridge, composée de 16 475 molécules « drug-like », respectant les règles de Lipinski ;⁸ rappelons que cette librairie a déjà été utilisée par le Dr. Lecat-Guillet avec un test RAIU ayant conduit à la découverte des 10 **ITB**. Le pharmacophore ayant été généré à partir de la famille **ITB₉**, de nombreuses dihydropyrimidinones contenues dans cette chimiothèque devraient donc posséder des scores élevés.

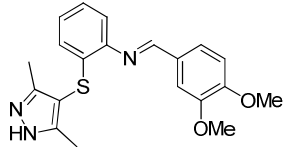
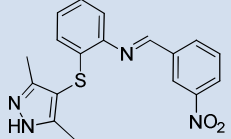
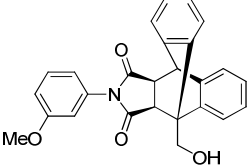
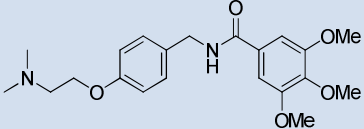
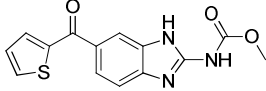
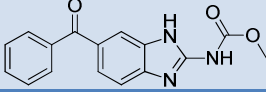
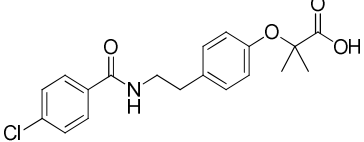
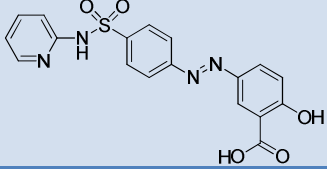
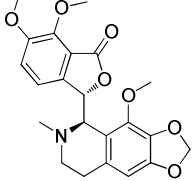
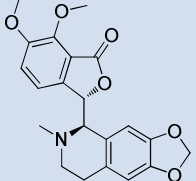
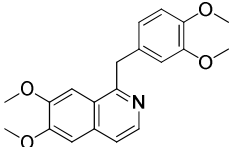
La deuxième chimiothèque est la *Chemical Library* de Prestwick ; fondée par le Pr. Camille Wermuth à Strasbourg, cette société met notamment à disposition des chimistes médicaux des chimiothèques de produits structurellement très diversifiés et ayant déjà passé plusieurs phases d'essais cliniques. Dans notre cas, la librairie comporte 1 095 molécules approuvées par la *Food and Drug Administration*). Ce type de chimiothèque répond en général à un objectif de *drug repositioning* ou de *SOSA (Selective Optimisation of Side Activities*, concept développé par le Pr. Wermuth^{9,10}) : il s'agit de tester des principes actifs déjà commercialisés ou des substances ayant passé plusieurs phases d'essais cliniques sur de nouvelles cibles pharmacologiques ; les *hits* peuvent alors être utilisés comme des têtes de file possédant déjà des profils pharmacologiques optimisés pour l'administration chez l'homme. Ce concept est basé sur l'hypothèse que la plupart des principes actifs n'interagissent pas avec une cible unique mais sur plusieurs récepteurs biologiques. Il s'agit alors d'optimiser la tête de file pour augmenter cette activité « secondaire » au détriment de l'activité initiale pour laquelle ce médicament a été développé.

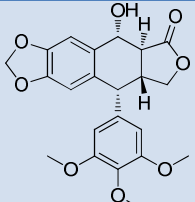
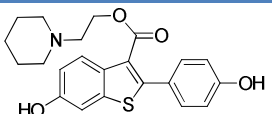
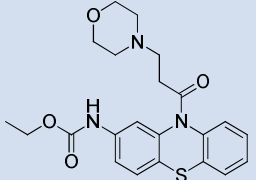
b. Résultats du criblage virtuel

Pour chaque composé issu des chimiothèques, plusieurs conformères sont également générés par minimisation d'énergie, puis criblés *in silico* sur le modèle pharmacophorique présenté précédemment. A chaque structure est ainsi associé un score (*Fit Value*) : un premier filtre (*Fit Value* > 0,10) a été appliqué et a permis d'extraire 35 molécules de Chembridge et 17 molécules de Prestwick, classées par score décroissant (Annexe III). Après élimination des dihydropyrimidinones, regroupement par famille et évaluation des scores, nous avons conservé pour la suite les molécules indiquées dans le Tableau 50.

Tableau 50 : Composés issus des chimiothèques sélectionnés à l'issue du criblage *in silico*. Les codes CB correspondent à des composés issus de la chimiothèque Chembridge tandis que les codes P correspondent à la chimiothèque de Prestwick. Pour cette dernière, le nom commercial de la substance est également indiqué.

Code	Structure	Dénomination usuelle/commerciale	Fit Value
CB1			1,310

CB2			1,262
CB3			2,053
CB4			2,653
P1		Triméthobenzamide	0,179
P2		Nocodazole	0,918
P3		Mebendazole	0,695
P4		Bezafibrate	0,851
P5		Sulfasalazine (Salazopyrine®)	0,504
P6		Noscapine	1,186
P7		Hydrastine	1,693
P8		Papaverine	1,162

P9		Podophyllotoxine (Condylox®)	1,806
P10		Raloxifène (Evista®)	1,223
P11		Moricizine (Ethmozine®)	2,065

A l'issue de ces deux criblages *in silico*, nous avons donc retenu 4 molécules issues de la chimiothèque ChemBridge et 11 molécules issues de la chimiothèque Prestwick. Il est à présent intéressant de vérifier expérimentalement ces prédictions théoriques. Dans la partie suivante, ces molécules seront donc évaluées *in cellulo* contre l'incorporation d'iodures afin de trouver d'éventuelles molécules actives.

3. Evaluation biologique - « faire du neuf avec du vieux ? »

Nous disposons des deux chimiothèques au laboratoire sous formes de plusieurs jeux de plaques 96 puits, en solution dans le DMSO à 10 mM et stockées à - 20 °C. Les 15 composés sélectionnés sont donc tout d'abord analysés en LC-MS afin d'évaluer leur pureté, puis testés contre l'incorporation d'iodures sur cellules FRTL-5 suivant le protocole habituel. Les dilutions pour constituer la gamme de concentrations de chaque composé sont effectuées à partir d'un jeu de plaques-filles 96 puits. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 51.

Tableau 51 : Pureté LC-MS et IC₅₀ des composés CB1-CB4 et P1-P11

Code	LC-MS	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ RAIU (μM)	Code	LC-MS	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ RAIU (μM)
CB1	> 90 %	> 10 μM		P5	> 90 %	0,55 μM	4 μM
CB2	> 90 %	> 10 μM		P6	50 % d'une impureté	> 10 μM	
CB3	40 % d'une impureté	3 μM		P7	> 90 %	> 10 μM	
CB4	> 90 %	> 10 μM		P8	> 90 %	> 10 μM	
P1	> 90 %	> 10 μM		P9	> 90 %	> 10 μM	
P2	> 90 %	> 10 μM		P10	> 90 %	> 10 μM	
P3	> 90 %	> 10 μM		P11	> 90 %	> 10 μM	
P4	> 90 %	> 10 μM					

Les composés dont les IC_{50} sont supérieurs à 10 μM sont écartés et considérés comme peu actifs. Deux composés présentent en revanche des IC_{50} de l'ordre du micromolaire, **CB3**, et **P5**.

- **CB3** est une imine susceptible d'être hydrolysée rapidement et dont la LC-MS n'est pas propre. Ses propriétés pharmacologiques sont inconnues mais le résultat biologique est prometteur ($IC_{50} = 3 \mu M$). Cependant, par manque de temps, ce composé n'a pas pu être resynthétisé avec une pureté satisfaisante afin d'affiner cette première évaluation.
- **P5** est la sulfasalazine : commercialisée par Pfizer sous l'appellation Salazopyrine®, elle est indiquée dans le traitement de pathologies intestinales (rectocolite hémorragique, maladie de Crohn) et de la polyarthrite rhumatoïde. Pour le premier ensemble d'indications, il s'agit en fait d'une prodrogue de l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA) à activité anti-inflammatoire, protégé par une fonction sulfapyridine clivée *in vivo* par des bactéries au niveau du côlon (Figure 109).¹¹ En revanche, il a été suggéré que son action contre la polyarthrite rhumatoïde pourrait être due à la sulfasalazine en tant que telle et non à ses métabolites.^{12,13}

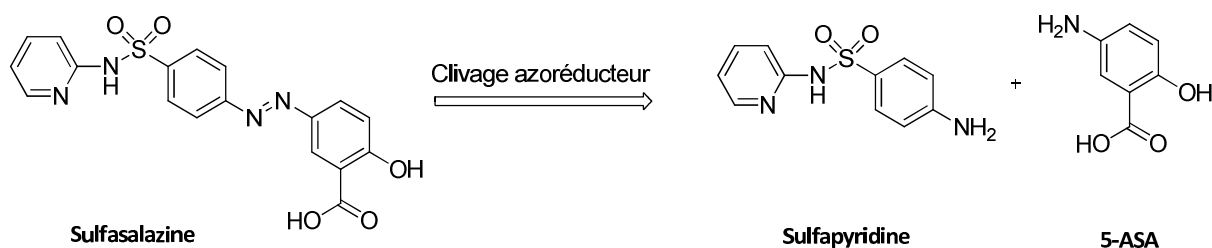


Figure 109 : Clivage *in vivo* de la sulfasalazine au niveau du côlon

Dans nos conditions de test, l' IC_{50} de la sulfasalazine pour l'inhibition de l'incorporation d'iodures a été évalué à 0,55 μM . A cause de sa coloration jaune intense, nous avons souhaité vérifier que la détection colorimétrique n'était pas perturbée et nous avons également testé ce composé en RAIU. La valeur de l' IC_{50} ainsi mesuré est plus élevée, de l'ordre de 4 μM . Cette activité reste toutefois satisfaisante pour une nouvelle tête de série. Notons que – contrairement à ses autres indications – la sulfasalazine pourrait être active en tant que telle, le clivage azoréducteur n'ayant que peu de chances de se produire dans les cellules FRTL-5. Notons que la sulfasalazine est – des 15 molécules retenues – celle qui possède le score le plus faible. La corrélation entre ces scores et les activités biologiques est par ailleurs relativement faible, ce qui n'est guère surprenant étant donné le caractère qualitatif du pharmacophore généré en partie 1. En effet, l'observation de la superposition de la sulfasalazine sur le modèle pharmacophorique montre une corrélation moyenne (Figure 110) ; en particulier, le fragment hydrophobe n'est pas « rempli » par un groupement fonctionnel de la sulfasalazine. Notons qu'il serait particulièrement intéressant de synthétiser un analogue avec Ainsi, malgré le fait que le modèle pharmacophorique ne soit pas quantitatif et basé

« seulement » sur 6 structures actives, la validation expérimentale a conduit à la découverte d'un nouveau squelette actif.

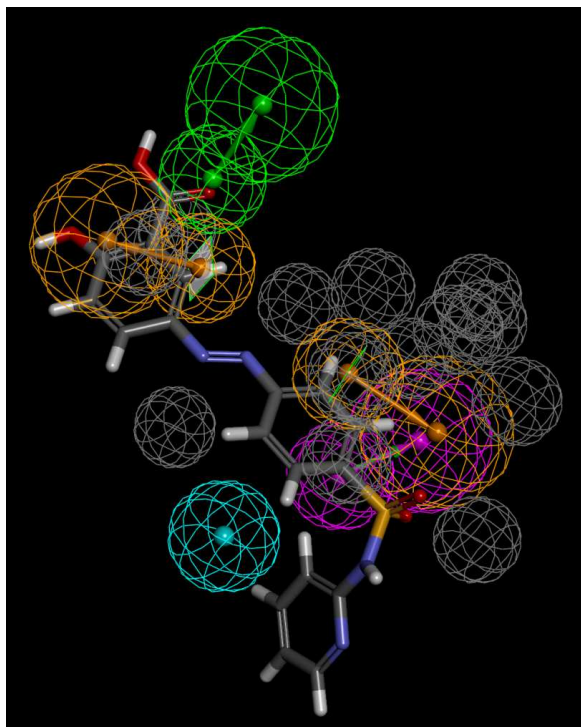


Figure 110 : Superposition du pharmacophore et de la structure de la sulfasalazine

4. Conclusion

Cette approche de modélisation moléculaire nous a donc permis de découvrir une nouvelle structure présentant une activité micromolaire vis-à-vis du transport de l'iode. Le profil toxicologique et pharmacologique de la tête de série ayant déjà été optimisé, cette nouvelle famille peut se révéler très intéressante pour concevoir des candidats pharmaceutiques. Il est toutefois nécessaire de passer par une nouvelle phase de pharmacomodulation afin d'optimiser cette nouvelle activité biologique.

Par ailleurs, ce résultat illustre la pertinence de certaines approches de conception rationnelle de médicaments assistée par ordinateur. Plus rapides, plus ciblées et plus économes en produits et en matériel, ces méthodes *in silico* sont actuellement en pleine expansion et présentent un complément efficace aux approches classiques de *drug design*. En particulier, les approches de type *ligand-based* s'avèrent particulièrement puissantes, en ceci qu'elles ne nécessitent pas de connaître la structure de la cible biologique mais procèdent par analogie de structure à partir d'une famille de ligands aux activités connues. Dans notre cas, l'évaluation de nouvelles DHPM plus diversifiées sur certains points pourrait permettre d'affiner le modèle pharmacophorique ; cependant, l'écart observé entre la prédiction *in silico* et les résultats expérimentaux montre les limites de l'approche qualitative utilisée ici.

Références bibliographiques

- ¹ Wermuth CG, "Chap. 5 : Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses" in *The Practice of Medicinal Chemistry*, Wermuth GC, **2003**, Elsevier, ISBN : 0-12-744481-5
- ² Klebe G, *Persp. Drug Design Discov.* **2000**, 20, 7-11
- ³ McInnes C, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2007**, 5, 494-502
- ⁴ Sun H, *Curr. Med. Chem.* **2008**, 10, 1018-1024
- ⁵ Purushottamachar P, Khandelwal A, Chopra P, Maheshwari N, Gediya LK, Vasaitis TS, Bruno R, Clement OO, Njar VCO, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 3413-3421
- ⁶ Taha MO, Bustanji Y, Al-Bakri AG, Yousef AM, Zalloum WA, Al-Masri IM, Atallah N, *J. Mol. Graph. Model.* **2007**, 25, 870-884
- ⁷ Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M, *J. Comp. Chem.* **1983**, 4, 187-217
- ⁸ Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ, *Adv. Drug. Del. Rev.* **1997**, 23, 3-25
- ⁹ p.77, « New leads from old drugs : the SOSA approach » in *The Practice of Medicinal Chemistry*, Wermuth GC, **2003**, Elsevier, ISBN : 0-12-744481-5
- ¹⁰ Wermuth CG, *J. Med. Chem.* **2004**, 6, 1303-1314
- ¹¹ Dictionnaire Vidal 2012, article Salazopyrine®
- ¹² a) Baggott JE, Morgan SL, Ha T, Vaughn WH, Hine RJ, *Biochem. J.* **1992**, 282, 197-202; b) Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM, *J. Clin. Invest* **1998**, 101, 1163-1174
- ¹³ Chidley C, Haruki H, Pedersen MG, Muller E, Johnsonn K, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 375-383

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ces travaux, nous avons synthétisé et évalué biologiquement de nouveaux inhibiteurs du transport de l'iode, appartenant à deux familles chimiques : les dihydropyrimidinones et les tétrahydro- β -carbolines. A partir de deux têtes de file identifiées par criblage à haut-débit, **ITB₂** et **ITB₉**, nous avons synthétisé deux chimiothèques d'analogues comportant chacune une centaine de composés. Les mesures d'IC₅₀ contre l'incorporation d'iode dans les cellules FRTL-5, grâce au test colorimétrique à l'iode froid mis au point au laboratoire, nous ont ensuite permis de développer un ensemble de relations structure-activité. La synthèse d'analogues ayant été contrainte par la disponibilité des réactifs et l'accessibilité synthétique, ces études SAR ne sont naturellement pas exhaustives et méritent d'être approfondies, particulièrement sur certaines positions d'**ITB₉** (X, N₁, N₃ et R₄) et d'**ITB₂** (cycle A, taille du cycle C).

Puis, dans un deuxième temps, les résultats obtenus ont été exploités de deux manières : nous avons d'une part conçu et synthétisé une dizaine d'analogues « de seconde génération » dans chaque famille afin d'améliorer l'activité biologique ; d'autre part, afin d'identifier la (ou les) protéine(s)-cible(s) de chacun des inhibiteurs, une sonde photoactivable dérivée d'un inhibiteur particulièrement puissant a été synthétisée (**139** pour **ITB₉** et **288** pour **ITB₂**), comportant un groupement photoactivable de type trifluorométhylidiazirine et une étiquette desthiobiotinylée. Cette sonde a ensuite été utilisée pour des expériences de photomarquage, en effectuant une optimisation partielle des conditions opératoires.

Pour **ITB₉**, une famille de 115 composés a été générée par synthèse parallèle en utilisant la réaction multicomposants de Biginelli. La plupart des fragments d'**ITB₉** ont ainsi pu être explorés, mettant en évidence le rôle crucial joué par les substituants R₄ et R₅ sur l'activité biologique. Il est cependant important de poursuivre les études sur la nécessité du lien ester, qui reste le principal « point faible » de cette famille pour une utilisation *in vivo*. Ces résultats nous ont ensuite conduits à la synthèse d'analogues de seconde génération comportant plusieurs modifications par rapport à la structure originale : six d'entre eux possèdent en particulier des IC₅₀ inférieurs à 5 nM, ce qui représente une amélioration d'un facteur jusqu'à 1 400 par rapport à la tête de file. Par ailleurs, la stéréochimie du carbone asymétrique C₄ responsable de l'activité a été déterminée, avec des rapports eudismiques allant jusqu'à 14 000. De la même façon, une chimiothèque d'une centaine de composés a également été synthétisée à partir d'**ITB₂**, dont près des deux-tiers en utilisant des variantes de la réaction de Pictet-Spengler. La diversification, moindre que pour la famille précédente, a toutefois permis d'établir un certain nombre de relations structure-activité qui demandent à être complétées. Ici encore, le rôle-clé de l'hétéroatome Y ainsi que de la position *meta* du cycle D a été mis en évidence : la modification simultanée de ces deux paramètres a mené à

la conception de plusieurs analogues de seconde génération, dont quatre d'entre eux possèdent des IC₅₀ inférieurs à 5 nM (facteur d'amélioration jusqu'à 700 pour **278** par rapport à la tête de file). En particulier, la série oxygénée (Y = O) montre que les tétrahydropyranoindoles sont en général plus actifs que leurs homologues azotés de type tétrahydro-β-carbolines. Enfin, la stéréochimie active en C₁ a été déterminée par diffraction aux rayons X, avec des rapports eudismiques variables (jusqu'à 60 000 pour **191**).

Ainsi, les énantiomères actifs des 10 composés « de seconde génération » (**49**, **128**, **129**, **135**, **136**, **137**, **191**, **278**, **284** et **286**) constituent des candidats médicaments à potentiel thérapeutique élevé. Possédant pour la plupart des propriétés physico-chimiques satisfaisant aux règles de Lipinski et une cytotoxicité faible à des concentrations de l'ordre du micromolaire, ces dix molécules représentent également les meilleurs inhibiteurs de la fonction thyroïdienne d'accumulation d'iodures décrits à ce jour. Leur intérêt potentiel a conduit au dépôt d'un brevet dans chaque famille et permet d'envisager des tests *in vivo* pour étudier leur stabilité métabolique ainsi que leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques ; leur activité *in vivo* pourrait également être aisément évaluée par imagerie à l'iode 125. C'est seulement à l'issue de ces résultats biologiques que le potentiel thérapeutique de ces deux familles pourra être confirmé.

Par ailleurs, une deuxième application ne nécessitant pas de propriétés pharmacologiques particulières a été envisagée : la recherche de protéines-cibles impliquées dans le transport de l'iode par photomarquage d'affinité. Dans chaque famille, une sonde photoactivable a donc été conçue et synthétisée en s'appuyant sur les résultats des études SAR. Les composés **139** et **288** ont conduit chacun à la mise en évidence de plusieurs protéines marquées spécifiquement et pouvant jouer un rôle dans le transport d'iode dans la thyroïde. Elles sont au nombre de trois pour **ITB₉** et quatre pour **ITB₂** (éventuellement cinq en comptant P₈, observée en utilisant la sonde **166** du Dr. Waltz). Par manque de temps, il n'a pas été possible d'approfondir ces résultats mais ceux-ci semblent néanmoins prometteurs. Le marquage est plus net pour certaines bandes (P₁, P₃, P₄, P₇ et P₈) et les profils observés laissent penser que certaines protéines sont communes à plusieurs sondes tandis que d'autres sont plus spécifiques. Rappelons à cette occasion que les deux inhibiteurs **ITB₂** et **ITB₉** possèdent *a priori* des modes d'actions différents, ce qui n'exclut pas forcément une interaction avec deux sites d'une même protéine engendrant au final un phénotype similaire (inhibition de l'incorporation d'iodures). Il est donc d'un intérêt crucial de poursuivre ces travaux en purifiant les échantillons, puis d'exciser les bandes repérées et de les analyser en spectrométrie de masse. Les protocoles mis au point par le Dr. Waltz sur une sonde dérivée d'**ITB₅** ont en effet conduit à l'identification de trois protéines membranaires dont l'implication dans le transport d'iode reste à confirmer par validation fonctionnelle (utilisation d'inhibiteurs spécifiques, siRNA...). Cette stratégie, menée à son terme à partir des expériences présentées dans ce manuscrit, pourrait aboutir à établir une cartographie plus complète des protéines gouvernant de façon plus ou moins directe l'influx d'iodures dans la glande thyroïde.

Sommaire de la Partie Expérimentale

Biologie & biochimie

<i>Appareillage</i>	E-5
<i>Liste et conservation des produits</i>	E-6
<i>Préparation du milieu de culture pour cellules FRTL-5</i>	E-8
<i>Décongélation de cellules FRTL-5</i>	E-9
<i>Passage de cellules FRTL-5</i>	E-10
<i>Congélation de cellules FRTL-5</i>	E-11
<i>Ensemencement de cellules FRTL-5 dans des microplaques 96 puits</i>	E-12
<i>Dosage des ions iodures par détection spectrophotométrique</i>	E-13
<i>Dosage des ions iodures par détection radioactive (RAIU)</i>	E-16
<i>Test de cytotoxicité (MTT)</i>	E-17
<i>Photomarquage sur cellules et lyse cellulaire</i>	E-18
<i>Dosage protéique à l'acide bicinchoninique</i>	E-20
<i>Electrophorèse sur gel SDS-PAGE</i>	E-21
<i>Transfert sur membrane PVDF et révélation par chimioluminescence</i>	E-23

Chemistry & organic synthesis

<i>Methods</i>	E-29
<i>Compounds <u>C1-C37</u></i>	E-31
<i>Compounds <u>U1-U6</u></i>	E-40
<i>Compounds <u>12-126</u> : <u>ITB₉</u> and first generation analogues</i>	E-42
<i>Compounds <u>128-138</u> : Second generation <u>ITB₉</u> analogues</i>	E-82
<i>Compounds <u>139-160</u> : <u>ITB₉</u> probes and intermediates</i>	E-86
<i>Compounds <u>164-196</u> : First generation <u>ITB₂</u> analogues and intermediates (modified on A-B-C)</i>	E-92
<i>Compounds <u>127-273</u> : <u>ITB₂</u> and first generation analogues (modified on D)</i>	E-102
<i>Compounds <u>274-281</u> : Second generation <u>ITB₂</u> analogues</i>	E-129
<i>Compounds <u>283-287</u> : <u>ITB₂</u> probes and intermediates</i>	E-132

Biologie & biochimie

Appareillage

- Hotte à flux laminaire Hera Safe HS (Heraeus) :

Dans la hotte à flux laminaire, l'air circule du haut vers le bas après être passé au travers d'un filtre HEPA de 0,2 micron afin d'éviter la contamination des cellules et du matériel par des micro-organismes. La hotte doit néanmoins être nettoyée avec de l'éthanol 70% avant et après chaque utilisation et par irradiation UV une fois par semaine. L'opérateur doit en outre porter une blouse propre, des gants nettoyés régulièrement à l'éthanol 70% et éviter au maximum de perturber le flux laminaire au cours des opérations de culture. Sous cette hotte sont réalisées les différentes opérations de culture cellulaire.

- Autoclave Prater (Subtil Crépieux)

Cet appareil permet la stérilisation à 100 °C et 1,33 bar du matériel nécessaire à la culture cellulaire.

- Laveur de plaques Power Washer 384 (Tecan) :

L'appareil sert à laver des microplaques : il retire le surnageant des puits et peut remplacer la solution aspirée par une autre. Il peut être équipé de têtes de lavage adaptées soit à des microplaques 384 puits, soit à des microplaques 96 puits, avec dans les deux cas, une aiguille d'aspiration et une aiguille de distribution par puits. 5 vitesses de distribution sont utilisables et le positionnement de la tête de lavage par rapport à la microplaque modulable afin d'éviter de trop forts remous qui décrocheraient les cellules.

- Liquidator 96

Le Liquidator est un système manuel de pipetage équipé d'une « tête à 96 canaux ». Il permet de transférer entre 1 et 200 µL de solutions d'une plaque 96 puits à une autre ou d'un réservoir à une microplaque. Il comporte deux plaques coulissantes permettant l'utilisation simultanée de 4 contenants : 1 boîte de cônes spécifiques au Liquidator, 1 à 3 microplaques et/ou 1 à 2 réservoir(s).



- Distributeur automatique Multidrop 384 (Thermolabsystems)

Le Multidrop est une pompe péristaltique à 8 canaux. Il permet de distribuer jusqu'à 8 réactifs différents dans les 96 ou 384 puits d'une microplaque. Pour un volume de 20 µL/puits, 5 s sont nécessaires pour remplir une microplaque 96 puits et 20 s pour une microplaque 384 puits. L'appareil permet également de sélectionner le nombre de colonnes à remplir (de 1 à 12 pour une microplaque 96 puits, de 1 à 24 pour une microplaque 384 puits). Les cassettes distributrices, comportant 8 canules, sont amovibles et autoclavables.

- Lampe UV Black-Ray® B100AP

La lampe délivre une lumière ultraviolette de haute intensité de longueur d'onde $\lambda \sim 365$ nm. Equipée d'une ampoule au mercure de 100 W, elle permet d'obtenir une puissance de 21,7 µW/cm² à une distance de 5 cm et une puissance de 8,9 µW/cm² à une distance de 25 cm. Elle nous a permis de réaliser le photomarquage de protéines sur cellules entières en présence de sondes photoactivables.

- Système d'électrophorèse Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad)

La système d'électrophorèse Mini-PROTEAN II permet de couler un ou deux gels de polyacrylamide 7 cm x 8 cm de 0,5 ou 1 mm d'épaisseur et de faire migrer simultanément 5, 10 ou 20 échantillons. Elle est constituée d'une cuve, d'un couvercle avec câbles, d'un support de coulée, de deux supports à vis pour la réalisation de sandwichs plaque de verre-spacers-plaque de verre, d'un support à électrodes en forme de U sur lequel sont fixés les supports à vis lors de la migration, de peignes 5 et 10 puits, de spacers 0,5 mm d'épaisseur et de plaques de verre 8,3 cm x 10,2 cm et 7,3 cm x 10,2 cm.

- Système de transfert sur membrane Mini Trans-Blot® (Bio-Rad)

Le système de transfert Mini Trans-Blot permet le transfert de protéines depuis 1 ou 2 mini-gel(s) vers 1 ou 2 membrane(s) PVDF, dans la cuve déjà utilisée pour l'électrophorèse. Le système est constitué d'une cuve et d'un couvercle avec câbles mais aussi de deux cassettes où sont réalisés les sandwichs gel – membrane et d'un module à électrodes.

Liste et conservation des produits

Certains produits sont aliquotés et conservés dans des conditions particulières. Pour ces produits, les conditions de stockage sont indiquées. Les autres sont conservés à température ambiante dans leur flacon original.

Culture et tests cellulaires :

- Acétate de L-Glycine-L-Histidine-L-Lysine (Sigma : G7387) : -20 °C
- Hormone thyrotropique ou TSH bovine (Sigma : T8931) : 0 °C
- Insuline de pancréas de veau (Sigma : I5500) : -20 °C
- Transferrine humaine (Sigma : T8158) : -20 °C
- Hydrocortisone 98% (Sigma : H0888) : -20 °C
- L-Glutamine (Sigma : G7513) : aliquotée par 5 mL, -20 °C
- Pénicilline/streptomycine (Sigma : P4333) : aliquotée par 5 mL, -20 °C
- Sérum de veau fœtal inactivé (Thermo Fisher : W3387M) : aliquoté par 25 mL, -20 °C
- *Coon's modified Ham's F12 medium* (Biochrom : F0855) : 0 °C
- Trypsine-EDTA 0,25% (Sigma : T4049) : aliquotée par 3, 6 ou 9 mL, -20 °C
- Bleu trypan 0,4% (Sigma : T8154)
- *Dubelcco's Phosphate Buffered Saline* ou PBS (Sigma : D8537) : 0 °C
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma : M2128) : 0 °C

- HEPES Buffer 1 M (Sigma : H0887) : 0 °C
- *Hanks' balanced salt solution* (HBSS) avec rouge de phénol (Sigma : H9269) : 0 °C
- NaI à 99,999% (Aldrich : 409286-1G)
- [125-I]-NaI (Perkin Elmer)
- Perchlorate de sodium > 98% (Sigma : S1513)
- Diméthylsulfoxyde ou DMSO stérile (Sigma : D8418)

Photomarquage, lyse et dosage protéique, gel SDS-PAGE, Western-blot :

- *Hans' balanced Salt solution* (HBSS) sans rouge de phénol (Sigma : H8264) : 0 °C

- Chlorure de sodium (Pro labo : 27810.295)
- Triton X-100 (Produits Touzard & Matignon)
- Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (Prolabo : 20302.180)
- Trizma[®] hydrochloride ou Tris-HCl (Sigma : T3253)
- Cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma : P8340) : aliquoté par 200 µL, -20 °C
- Solution d'acide bicinchoninique (Sigma : B9643) : 0 °C
- Solution de sulfate de cuivre (Sigma : C2284) : 0 °C
- Solution d'albumine bovine (Sigma : P0914) : 0 °C

- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane ou TrisBase (Sigma : 252859)
- Sodium dodécylsulfate ou SDS (Sigma : L3771)
- Acrylamide/Bis-acrylamide 30% (Sigma : A3699) : 0 °C
- *N,N,N',N'*-tétraméthylethylènediamine ou TEMED (Sigma : 87689)
- Persulfate d'ammonium ou APS (Sigma : A3678)
- Glycérol (Prolabo : 24387.292)
- Bleu de bromophénol (Aldrich : 114391)
- 2-mercaptoéthanol (Sigma : M7154) : 0 °C
- Marqueur de poids moléculaire biotinylé (Sigma : B2787) : aliquoté par 100 µL, -20 °C
- Glycine (Sigma : G7126)

- Brilliant Blue R-250 (Fluka : 27816)
- Thiosulfate de sodium pentahydraté (Prolabo : 27905.362)
- Nitrate d'argent (Prolabo : 21572.188)
- Carbonate de sodium (Prolabo : 27771.290)
- Formaldéhyde 37% (Aldrich : 252549)
- Sulfate d'ammonium (Prolabo : 21333.296)
- Acide orthophosphorique 85% (Merck : B855652)
- Brilliant Blue G (Sigma : B0770)

- Albumine bovine (Sigma : A3912) : 0 °C
- Tween-20 (Sigma : P7949)
- Streptavidine-HRP (Thermo Scientific : 21126) : aliquoté par 100 µL, -20 °C
- Substrats pour révélation ECL (Thermo Scientific : 32209) : 0 °C
- Révélateur photo Kodak (VWR : KODK5158621)
- Fixateur photo Kodak (VWR : KODK5158639)

Préparation de milieu de culture pour cellules FRTL-5

Les cellules FRTL-5 (Fisher Rat Thyroid Low serum 5%) ont été obtenues à partir d'une glande normale de thyroïde de rat Fisher de 5 à 6 semaines. Ces cellules présentent les mêmes caractéristiques de différenciation que les cellules thyroïdiennes originales, excepté qu'elles ne forment pas de follicules, et possèdent les mêmes propriétés de transport d'iodures que des cultures primaires : inhibition par le perchlorate, dépendance au sodium, sensibilité à la TSH (Thyroid-Stimulating Hormone). La préparation du milieu de culture de ces cellules nécessite la préparation préalable de solutions d'hormones :

Préparation des solutions d'hormones (sous hotte à flux laminaire) :

- **Solution de TSH 1000×** : Reconstituer un flacon de TSH lyophilisée (10 U.I) avec 10 mL de tampon HBSS stérile. Aliquoter par échantillons de 3 mL, congeler dans l'azote liquide et stocker à -20°C .
- **Solution d'Insuline 1000×** : Dissoudre 100 mg d'insuline dans 10 mL de tampon HBSS stérile et ajouter quelques gouttes de NaOH 1N (0,4 g dans 10 mL d'eau milli Q) pour aider à la solubilisation de l'insuline. Aliquoter par échantillons de 3 mL, congeler dans l'azote liquide et stocker à -20°C .
- **Solution de Transferrine humaine 1000×** : Dissoudre 50 mg de transferrine humaine 98% dans 10 mL de tampon HBSS stérile. Aliquoter par échantillons de 3 mL, congeler dans l'azote liquide et stocker à -20°C .
- **Solution d'Hydrocortisone 1000×** : Dissoudre 3,62 mg d'hydrocortisone 98% dans 2 mL d'éthanol absolu et 8 mL de tampon HBSS stérile. Transférer 10 μL de cette solution dans 10 mL de tampon HBSS stérile. Aliquoter par échantillons de 3 mL, congeler dans l'azote liquide et stocker à -20°C .
- **Solution d'acétate de L-Glycine-L-Histidine-L-Lysine 1000×** : Dissoudre 0,5 mg d'acétate de L-Glycine-L-Histidine-L-Lysine dans 0,5 mL de tampon HBSS stérile. Transférer 20 μL de cette solution dans 10 mL de tampon HBSS stérile. Aliquoter par échantillons de 3 mL, congeler dans l'azote liquide et stocker à -20°C .

Préparation du cocktail d'hormones 5H (100× sous hotte à flux laminaire

Dans 15 mL de tampon HBSS stérile (avec rouge de phénol), ajouter 3 mL de solution 1000× de TSH, 3 mL de solution 1000× d'insuline, 3 mL de solution 1000× de Transferrine humaine, 3 mL de solution 1000× d'hydrocortisone et 3 mL de solution 1000× d'acétate de L-Glycine-L-Histidine-L-Lysine. Aliquoter par échantillons de 5 mL et stocker à -20°C .

Préparation de milieu complet B sous hotte à flux laminaire

Dans 500 mL de *Coon's modified Ham's F12 medium*, ajouter 5 mL de L-Glutamine (concentration finale : 2 mM), 5 mL de pénicilline/streptomycine (concentration finale : 1 mg/mL), 5 mL de cocktail d'hormones 5H 100× (équivalent dans le milieu à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'Insuline, 10 nM d'Hydrocortisone, 10 ng/mL d'acétate de L-Glycine-L-Histidine-L-Lysine, 1 mU/mL de TSH et 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Transferrine), puis 25 mL de sérum de veau fœtal inactivé (milieu à 5%). Ajouter 5 mL de cocktail d'hormones et 5 mL de L-Glutamine une fois par semaine et conserver 2 semaines maximum à 0°C .

Décongélation de cellules

A réaliser sous hotte à flux laminaire

Produits : Milieu complet B, tampon HBSS (avec rouge de phénol) préalablement chauffés au bain-marie à 37 °C ; un lot de cellules congelées (4 à 10 x 10⁶ cellules).

Protocole :

- Préparer 10 mL de milieu dans un tube Falcon de 50 mL

- Préparer une flasque de 25 cm² (Corning 734-1712, VWR) : inscrire la date, le nom de la lignée et le nombre de passages et ajouter 3 mL de milieu
- Sortir 1 lot de cellules de l'azote liquide, le chauffer dans ses mains jusqu'à ce que le glaçon se détache des parois
- Verser le glaçon dans le tube Falcon de 50 mL sans toucher les bords

- Après disparition du glaçon, centrifuger les cellules à 1500 rpm à température ambiante pendant 5 min
- Retirer le surnageant
- Resuspendre doucement le culot dans 2 mL de milieu par des « allers-retours » à la micropipette
- Ajouter la suspension cellulaire à la flasque préparée précédemment
- Placer la flasque dans l'incubateur à 37 °C et 5% CO₂

Procéder le lendemain à un changement de milieu simple (sans lavage à l'HBSS) et 2 jours plus tard à un changement de milieu complet (avec lavage) :

- Retirer le milieu
- Ajouter 5 mL d'HBSS stérile
- Faire passer doucement sur les cellules par inclinaisons de la flasque
- Retirer le tampon
- Ajouter 5 mL de milieu

Lorsque les cellules arrivent à confluence, elles sont trypsinolysées (cf. protocole de passage). En attendant, un changement de milieu complet est effectué tous les 3 à 4 jours.

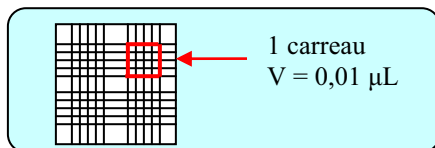
Passage de cellules FRTL-5

A réaliser sous hotte à flux laminaire avec des produits et du matériel stérile, à l'exception du comptage en cellule de Malassez

Produits : Trypsine-EDTA (0,25%), tampon HBSS (avec rouge de phénol) et milieu complet B préalablement chauffés au bain-marie à 37 °C ; PBS (non stérile) ; solution de bleu Trypan à 0,4% (non stérile)

Protocole :

- Préparer des flasques 75 cm² (Corning 734-1713, VWR) stériles : inscrire le nom de la lignée, la date et le nombre de passages et ajouter 10 mL de milieu.
- Aspirer le milieu de la flasque sortie de l'incubateur à l'aide d'une pipette sérologique, puis ajouter 5 mL de tampon HBSS sur la paroi opposée à celle des cellules ; faire passer doucement sur les cellules par inclinaisons de la flasque puis retirer le tampon
- Ajouter de la trypsine-EDTA (0,25%) directement sur le tapis cellulaire (1,5 mL pour une flasque de 25 cm², 3 mL pour une de 75 cm²), puis placer la flasque dans l'incubateur (37 °C, 5% CO₂) jusqu'au décollement des cellules (10 min pour une flasque de 25 cm², 15 à 20 min pour une de 75 cm²)
- Ajouter rapidement du milieu (4,5 mL pour une flasque de 25 cm², 9 mL pour une de 75 cm²), puis prélever la suspension et la reverser sur la paroi des cellules 3-4 fois pour entraîner les dernières cellules encore accrochées. Transférer la suspension dans un tube Falcon de 50 mL et centrifuger (1 500 rpm, 5', t. a.)
- Retirer le surnageant, puis resuspendre doucement le culot dans 4 mL de milieu avec une micropipette. Ajouter 6 mL de milieu avec une pipette et homogénéiser par plusieurs « allers-retours »
- Procéder au comptage en cellule de Malassez :



Cellule de Malassez

- Prélever 20 µL de suspension cellulaire et les ajouter dans un tube eppendorf 0,5 mL à 20 µL de Bleu Trypan 0,4% et 160 µL de tampon PBS et homogénéiser par allers-retours à la micropipette
- Faire couler 20 µL de la solution sous une lamelle de verre, sur la plage de lecture de la cellule de Malassez
- Attendre 1 min que les cellules sédimentent, puis compter au microscope et calculer la moyenne **n** de cellules par carreau

Nombre de cellules par µL dans la solution de comptage : $n' = n / 0,01$

Nombre de cellules par µL dans la suspension cellulaire : $n'' = n' \times 10$

- Connaissant la concentration cellulaire de la suspension, ajouter le nombre de cellules nécessaire dans chaque flasque, soit 4×10^6 de cellules pour obtenir 80% de confluence en 7 jours
- Placer les flasques et/ou les boîtes de Pétri dans l'incubateur à 37 °C et 5% CO₂

Congélation de cellules

A réaliser sous hotte à flux laminaire avec des produits et du matériel stérile, à l'exception du comptage en cellule de Malassez.

Produits : Milieu complet B, tampon HBSS (avec rouge de phénol) préchauffés au bain-marie à 37 °C ; trypsine-EDTA (0,25%), PBS (non stérile), solution de bleu Trypan à 0,4% (non stérile), DMSO (> 99,7%), sérum de veau fœtal inactivé

Protocole (pour 4 flasques 75 cm² à confluence) :

- Trypsinolyser les cellules (cf. protocole de passage)
- Centrifuger les cellules à 1 500 rpm pendant 5 min à température ambiante

- Retirer le surnageant et resuspendre doucement le culot dans 2 mL de sérum de veau fœtal par plusieurs « allers-retours » à la micropipette
- Ajouter 3 mL de sérum de veau fœtal et homogénéiser par plusieurs « allers-retours » à la pipette
- Déterminer la concentration de la suspension cellulaire obtenue par comptage en cellule de Malassez (cf. protocole de passage)
- Diluer, si nécessaire, la suspension cellulaire avec du sérum de veau fœtal de sorte à obtenir une concentration comprise entre 4 et 10 x 10⁶ de cellules / mL
- Préparer des tubes cryogéniques de 2 mL (Nalgène 5000-0020) : dater, indiquer le nom de la lignée et le nombre de passages, remplir avec 200 µL de DMSO et 800 µL de sérum de veau fœtal , puis ajouter 1 mL de suspension par tube
- Mettre les tubes dans une boîte à isopropanol (Nalgène) et placer le tout à -80 °C pendant 1 h 30
- Plonger les tubes quelques secondes dans un bain d'éthanol et de carboglace (-80 °C) puis transférer rapidement dans l'azote liquide

Le lendemain, décongeler l'un des aliquots selon le protocole de décongélation et cultiver les cellules deux à trois semaines pour voir si elles ont bien supporté le processus de congélation. Si ce n'est pas le cas, jeter l'ensemble des aliquots congelés.

Ensemencement de cellules dans des microplaques 96 puits

A réaliser sous hotte à flux laminaire avec des produits et du matériel stérile, 3 jours avant les tests d'accumulation d'iodures. Le distributeur automatique est nettoyé à l'éthanol avant d'être introduit sous la hotte. La cassette distributrice, une pince métallique et une bouteille en verre munie d'un barreau aimanté sont stérilisés dans l'autoclave.

Produits : Milieu complet B, tampon HBSS (avec rouge de phénol) préchauffés au bain-marie à 37 °C ; trypsine-EDTA (0,25%), PBS (non stérile), solution de bleu Trypan à 0,4% (non stérile).

Protocole :

Les cellules sont trypsinolysées, resuspendues dans 10 mL de milieu B et comptées en cellule de Malassez comme indiqué dans le protocole de passage.

Le nombre de cellules à ensemercer dans les microplaques (Costar 3628, VWR) pour être à environ 80% de confluence le jour du test est de 50 000 cellules par puit pour un volume de 200 µL. La suspension cellulaire obtenue précédemment est donc diluée dans du milieu B à une concentration de 250 000 cellules/mL dans une bouteille en verre munie d'un barreau aimanté.

La bouteille est placée sur un agitateur magnétique et la suspension agitée doucement. La suspension est distribuée dans les puits des colonnes 2 à 11 des microplaques au moyen du distributeur automatique (Multidrop 384), à raison de 200 µL/puits. Les microplaques sont ensuite placées dans l'incubateur à 37 °C et 5% CO₂ pendant 3 jours.

Remarque : les canaux de la cassette de distribution sont manipulés le plus possible au moyen de la pince métallique de façon à limiter les contaminations

Dosage des ions iodures par détection spectrophotométrique

Cette méthode de dosage a été développée au laboratoire par Waltz & al.¹ Elle est basée sur la réaction d'oxydoréduction qui a lieu entre des sels cériques et l'acide arsénieux. Cette réaction, très lente en conditions normales, est catalysée par les ions iodures et la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration de ces ions quand ces concentrations sont faibles.

Les sels cériques étant jaunes et les sels cériques incolores, la réaction est suivie par spectrophotométrie. Les dosages se font dans des microplaques 96 puits (stériles ou non) dans lesquelles on peut doser jusqu'à 80 échantillons.

Préparation des solutions-mères :

Solution d'arsénite de sodium 4× (96 mM)

Dissoudre 4,75 g d'As₂O₃ (M = 197,8 g.mol⁻¹) dans 50 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium 2N dans une fiole jaugée de 500 mL, sur plaque chauffante (40 °C) et sous agitation magnétique (attendre la dissolution complète, parfois plusieurs heures). Laisser refroidir, ajouter 24 g de NaCl, attendre la dissolution complète puis compléter la solution à 500 mL avec de l'eau. Conserver à température ambiante et à l'abri de la lumière (6 mois maximum) et diluer par 4 avant d'effectuer les dosages.

Solution de sulfate de cérium (IV) et d'ammonium 4× (42 mM)

Dissoudre 12,53 g de Ce(SO₄)₄(NH₄)₄ · 2 H₂O (M = 632,6 g.mol⁻¹) dans 200 mL d'eau, dans une fiole jaugée de 500 mL et sous agitation magnétique. Placer la fiole dans un bain de glace, ajouter 50 mL d'acide sulfurique 98% et attendre une dizaine de minutes. Laisser la solution revenir à température ambiante puis attendre la dissolution complète. Compléter la solution à 500 mL avec de l'eau. Conserver à 4 °C et à l'abri de la lumière (6 mois maximum). Laisser la solution reposer à 4 °C pendant une semaine avant la première utilisation et diluer par 4 avant d'effectuer les dosages.

Solutions étalons d'iodure de sodium NaI (Conservées à température ambiante et à l'abri de la lumière)

Solution mère à 2 mM :

Dissoudre 29,95 mg d'iodure de sodium avec de l'eau milli Q dans une fiole jaugée de 100 mL et ajuster le volume.

Solution intermédiaire à 20 µM :

Prélever 1 mL de solution mère à 2 mM et ajuster le volume à 100 mL dans une fiole jaugée.

Gamme étalon (ajustements à la fiole jaugée avec de l'eau milli Q) :

	Etalon E ₁	Etalon E ₂	Etalon E ₃	Etalon E ₄	Etalon E ₅	Etalon E ₆	Etalon E ₇	Etalon E ₈
Concentration (nM)	0	100	200	300	400	500	600	700
Volume de solution intermédiaire (µL)	0	250	500	750	1000	1250	1500	1750
Volume total (mL)	50	50	50	50	50	50	50	50

Solutions nécessaires pour une journée de criblage (6 plaques / 48 composés) :

- composés à tester (stockés dans des piluliers à -20 °C à une concentration de 20 mM dans le DMSO)
- 2 L d'HEPES 10 mM dans du tampon HBSS
- 50 mL de NaI à 100 µM dans du tampon HBSS / HEPES 10 mM
- 100 mL de Ce^{IV} 1× (10,5 mM) et 100 mL d'As^{III} 1× (24 mM)

Préparation des plaques jumelles de composés 10× :

Les composés sont sortis du congélateur la veille et les plaques préparées le matin même à partir des solutions à 20 mM, dans des microplaques 96 puits transparentes dans le domaine de longueur d'onde utilisé (Costar 3628,

VWR ou Greiner 736-0119, VWR). Les dilutions sont effectuées dans du tampon HBSS / HEPES 10 mM avec une pipette à 8 canaux pour un volume final de 200 μL / puits:

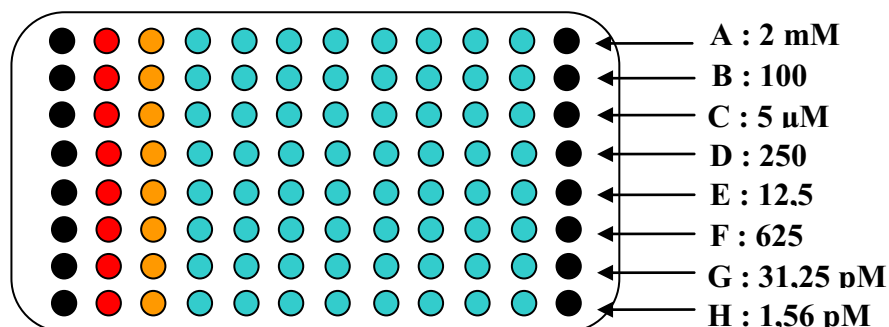
Plaque jumelle :

- vide

- **contrôle perchlorate**

- **contrôle ITB₉ / ITB₂**

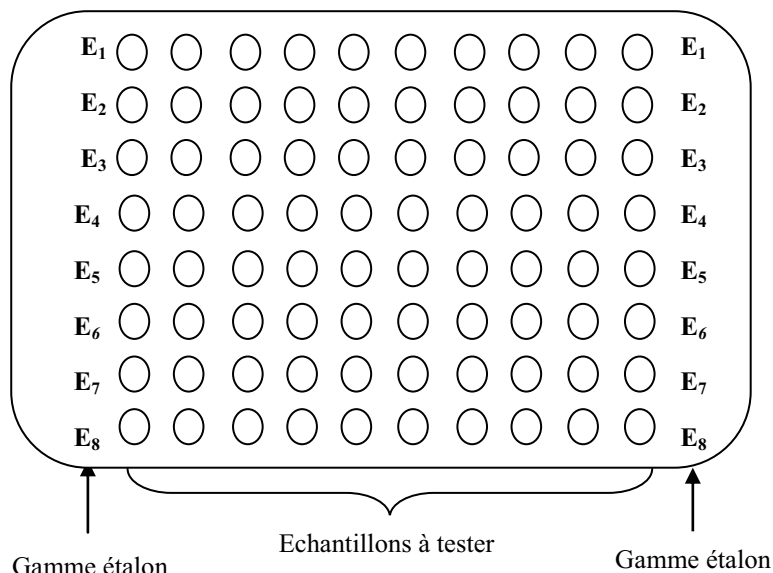
- **composés à tester**



Protocole de criblage :

- Remplacer, dans chaque puit, le milieu B par 80 μL de tampon HBSS / HEPES 10 mM à température ambiante grâce au laveur de plaques (Power Washer 384)
- Transférer 10 μL de composés depuis la plaque jumelle grâce au Liquidator 96, puis ajouter 10 μL de NaI 100 μM dans les colonnes 2 à 11 grâce à ce même appareil
- Laisser incuber 1 h à l'abri de la lumière. Lors d'une journée de criblage, l'ensemble de ces opérations est effectué sur plusieurs plaques avec un décalage de 5 min entre chaque plaque.
- Remplacer le surnageant par 80 μL de tampon HBSS/Hépès 10 mM à 4 °C grâce au laveur de plaques, et éliminer immédiatement le tampon en renversant la microplaque sur du papier absorbant
- Ajouter 100 μL d'eau dans les colonnes 2 à 11 grâce au distributeur automatique (Multidrop 384)
- Placer les solutions étalons de NaI par ordre croissant de concentration dans une colonne d'une plaque Deep Well, puis les distribuer dans les colonnes 1 et 12 des microplaques à l'aide d'une pipette multicanaux (100 μL / puits)
- Ajouter, avec le Multidrop 384, 100 μL / puits de solution de Ce^{IV} 1 \times (10,5 mM) dans toutes les plaques
- Laver les canaux de la cassette distributrice à l'eau mQ (environ 10 mL en fonction rinçage)
- Ajouter, avec le Multidrop 384, 100 μL / puits de solution d' As^{III} 1 \times (24 mM). Lors d'une journée de criblage, l'arsenic est ajouté avec un décalage de 40 secondes entre chaque plaque.
- Incuber pendant 30 minutes, puis mesurer l'absorbance à 420 nm (spectrophotomètre SPECTRAmax[®] GEMINI XS)

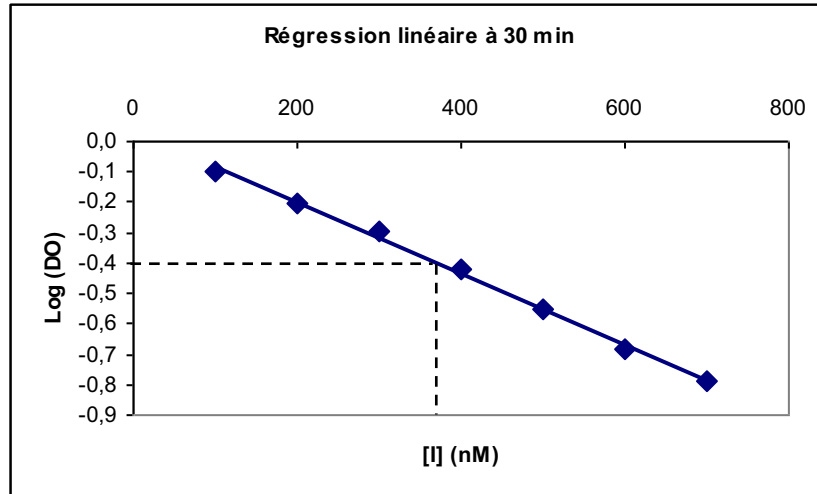
Plan final des microplaques :



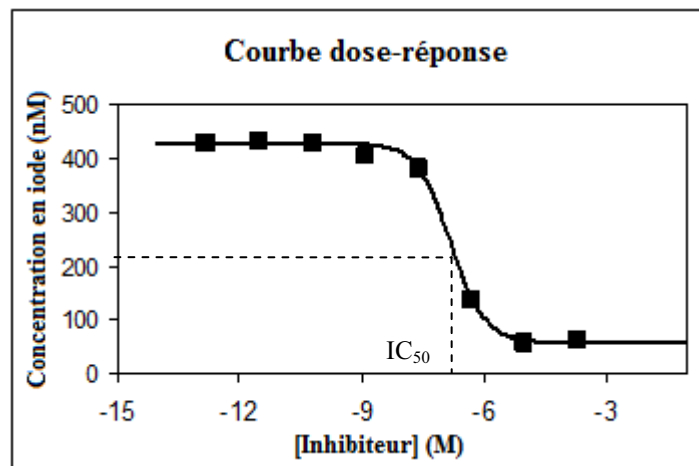
Courbe d'étalonnage

- Tracer la droite d'étalonnage : $\log \text{DO} = f([\text{I}^-])$ grâce à la fonction de régression linéaire du logiciel Microsoft Excel en moyennant les valeurs d'absorbance obtenues pour chacune des solutions étalons (colonnes 1 et 12)

- Déterminer, grâce à l'équation de la droite, la concentration en iodures de chaque échantillon inconnu (colonnes 2 à 11)



Le graphique : $[I] = f(\log[\text{inhibiteur}])$ est enfin tracé pour chaque composé afin de déterminer son IC_{50} .



Les IC_{50} sont calculées en utilisant une méthode de régression non-linéaire. Pour chaque inhibiteur, les données expérimentales sont ajustées à l'équation de Hill théorique par la méthode des moindres carrés. Le calcul a été réalisé par un classeur Excel "maison" :

Equation de Hill

$$[I^-] = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{10^{IC_{50}}}{10^{\log[X]}} \right)^n}$$

- $[I^-]$: concentration d' I^- expérimentale
 - max : concentration maximale d' I^-
 - min : concentration minimale d' I^-
 - $[X]$: concentration de l'inhibiteur X
 - n : nombre de Hill

Dosage des ions iodures par détection radioactive (RAIU)

Cette méthode de dosage a été utilisée alternativement pour mesurer notamment des IC₅₀ particulièrement faibles ou dont la corrélation entre données expérimentales et courbe de Hill est médiocre. Le test est basé sur le comptage de la radioactivité émise par les échantillons contenant une quantité plus ou moins importante d'iode 125.

Préparation des plaques de cellules FRTL-5 (une plaque 24 puits par composé)

Une plaque 24 puits estensemencée avec 300 000 cellules / puits (1,25 mL d'une solution à 250 000 cellules / mL) et incubée à 37 °C, 5% CO₂ jusqu'à atteindre une confluence d'environ 70-80%.

Solutions nécessaires :

- composés à tester (stockés dans des piluliers à -20 °C à une concentration de 20 mM dans le DMSO)
- HEPES 10 mM dans du tampon HBSS
- Solution de NaI à 100 µM dans HBSS / HEPES, à partir d'une solution-mère à 2 mM dans H₂O mQ
- Solution de [125-I]-NaI à 20 µCi / mL dans HBSS / HEPES, à partir de l'échantillon commercial dont le volume est ajusté avec de l'H₂O mQ pour atteindre 1 mCi / mL.
- Tampon de lyse : 0,1% SDS et 0,5% Triton X-100 dans H₂O mQ

Préparation des plaques jumelles

Les composés sont sortis du congélateur la veille et les plaques préparées à partir des solutions à 20 mM. Les dilutions sont effectuées dans du tampon HBSS / HEPES 10 mM, pour atteindre des concentrations égales à 1,10 fois les concentrations finales souhaitées.

Protocole

- Le jour du test, le milieu de culture est aspiré des puits de la microplaque ; 450 µL des solutions de la plaque jumelle sont ajoutés (6 concentrations testées en quadruplicat), puis 50 µL de la solution de [125-I]-NaI pour atteindre 1µCi / puits.
- Après 60 minutes d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, les surnageants sont retirés et les plaques sont lavées deux fois avec 500 µL de tampon HBSS / HEPES froid (+ 4 °C).
- 500 µL de tampon de lyse sont ensuite ajoutés et la plaque est agitée sur agitateur orbitalaire pendant 1 à 2 heures.
- Les surnageants sont collectés dans des tubes à scintillation, 4 mL de cocktail de scintillation sont ajoutés et la radioactivité est détectée à l'aide d'un compteur à scintillation (Wallac 1409).
- Les valeurs ainsi obtenues sont moyennées et les données expérimentales sont ajustées à l'équation de Hill théorique par la méthode des moindres carrés, au moyen d'un classeur Excel « maison ».

Test de cytotoxicité (MTT)

Le test MTT permet d'évaluer la cytotoxicité d'un composé sur des cellules à une concentration donnée.² Le réactif MTT est un sel de tétrazolium, qui peut être réduit par action de réductases mitochondriales des cellules vivantes, en formazan. Ce dernier forme un précipité violet caractéristique dans les mitochondries, et est ensuite dissous par un tampon de lyse. La mesure de l'absorbance à 570 nm permet d'évaluer la quantité de formazan formé, et donc la quantité de cellules vivantes. La cytotoxicité aiguë ou chronique d'un composé à une concentration donnée peut ainsi être évaluée. Les dosages se font dans des microplaques 96 puits dans lesquelles des cellules FRTL-5 ont été ensemencées au préalable.

Préparation des solutions :

Tampon de lyse

180 g de SDS sont dissous dans 600 mL d'eau distillée pour obtenir une solution à 30% w/v. Sont alors ajoutés successivement 330 mL de DMF, 25 mL d'acide acétique à 80% (v/v) et 25 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M. Le pH est ensuite ajusté à 4,7 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 10 M. Le volume est enfin ajusté à 1 L avec de l'eau distillée. Le tampon de lyse est stocké à température ambiante.

Solution de réactif MTT à 5 mg / mL

500 mg de bromure de méthylthiazolyldiphényl-tétrazolium (MTT) est suspendu dans 100 mL de PBS et agité fortement. La suspension est ensuite filtrée sur filtres 0,22 µm, puis la solution MTT est stockée en aliquots de 5 mL à -20 °C.

Solutions (pour une microplaque) :

- composés à tester (stockés dans des piluliers à -20 °C à une concentration de 20 mM dans le DMSO)
- 10 mM HEPES / HBSS
- 3 mL de réactif MTT
- 5 mL de tampon de lyse

Protocole de criblage :

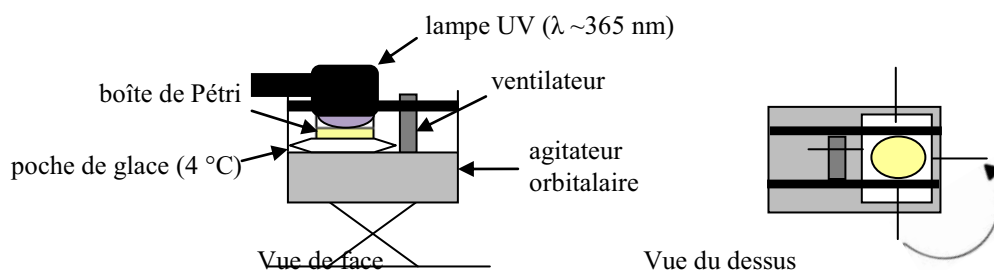
Des plaques jumelles sont préparées, comportant 100 µL / puits de solution de composé à 10 µM. A J+2, les plaques de cellules FRTL-5 sont sorties de l'incubateur, 110 µL de milieu de culture sont aspirés dans chaque puits et remplacés par 10 µL de solution de la plaque jumelle (Liquidator). Après 24 h d'incubation supplémentaire à 37 °C et 5% CO₂, les plaques sont lavées avec du PBS à +4 °C grâce au Plate Washer, de manière à ce que le volume résiduel de tampon soit de 80 µL. 25 µL de solution MTT sont alors ajoutées et les plaques sont incubées 3 heures à 37 °C.

Le surnageant est alors éliminé, puis 50 µL de tampon de lyse sont ajoutés et les plaques sont agitées 24 h à température ambiante sur agitateur orbitalaire. L'absorbance à 570 nm est alors mesurée. Toutes les expériences ont été effectuées au moins en duplicata.

Photomarquage sur cellules et lyse cellulaire

Les expériences de photomarquage sont réalisées dans des boîtes de Pétri 55 cm² ensemencées 3 jours auparavant de cellules FRTL-5 de sorte à atteindre entre 70 et 80% de confluence le jour de l'expérience. Les solutions de composés sont préparées le jour même dans du tampon HBSS (sans rouge de phénol) à partir de solutions mères à 20 mM dans le DMSO. L'exposition directe des échantillons (solutions de composés, cellules photomarquées) à la lumière est limitée au maximum.

Montage :



La lampe UV est allumée environ 5 min avant que les expériences ne débutent. La boîte de Pétri est placée sur une poche de glace et immobilisée entre les deux barres en caoutchouc d'un agitateur orbitaire. Un ventilateur d'ordinateur est placé à proximité pour éviter l'échauffement excessif des cellules. La lampe est posée sur les barres de l'agitateur, au-dessus de la boîte de Pétri, afin d'amener le centre de l'ampoule se trouve à une distance d'environ 5 cm de la solution. Pour un temps t de photomarquage, la lampe est tournée d'un $\frac{1}{4}$ de tour tous les $\frac{1}{4} t$ (cf. vue du dessus) pour que la dose d'UV reçue par les cellules soit aussi homogène que possible sur l'ensemble de la surface de la boîte de Pétri.

Photomarquage contrôle en absence de composé (1 boîte de Pétri) :

- **Solutions :**
 - tampon HBSS (sans rouge de phénol) : 10 mL
 - tampon PBS à 4 °C : 10 mL
- **Protocole :**
 - Retirer le milieu de culture avec une pipette sérologique, puis ajouter délicatement 10 mL de tampon HBSS en s'appuyant sur le rebord de la boîte
 - Immobiliser la boîte de Pétri sur la poche de glace et mettre en route l'agitateur
 - Placer la lampe et déclencher le chronomètre : photomarquer les cellules 4 min
 - Retirer le tampon avec une pipette sérologique
 - Ajouter 5 mL de PBS à 4 °C directement sur les cellules
 - Détacher les cellules au moyen d'un grattoir à cellules stérile
 - Transférer les cellules dans un tube falcon de 15 mL avec une pipette sérologique
 - Conserver le tube falcon dans de la glace

} 2 ×

Photomarquage en présence de sonde seule (1 boîte de Pétri) :

- **Solutions :**
 - solution de sonde à 5 μ M : 10 mL
 - tampon PBS à 4 °C : 10 mL
- **Protocole :**
 - Retirer le milieu de culture avec une pipette sérologique, puis ajouter délicatement 10 mL de sonde à 5 μ M en s'appuyant sur le rebord de la boîte

- Incuber 10 min à l'abri de la lumière et à température ambiante
- Placer la boîte de Pétri puis la lampe sur l'agitateur, déclencher le chronomètre : photomarquer les cellules 4 min
- Retirer la solution avec une pipette sérologique, puis gratter les cellules et les transférer dans un tube falcon de 15 mL grâce à 2 x 5 mL de PBS à 4 °C (comme ci-dessus)
- Conserver le tube falcon dans de la glace

Photomarquage en présence de sonde et de compétiteur (1 boîte de Pétri) :

- **Solutions :**
 - solution de sonde à 10 μM : 5 mL
 - solution de compétiteur à 500 μM : 5 mL
 - tampon PBS à 4 °C : 10 mL
- **Protocole :**
 - Retirer le milieu de culture avec une pipette sérologique, puis ajouter délicatement 5 mL de compétiteur à 500 μM
 - Incuber 10 min à l'abri de la lumière et à température ambiante
 - Ajouter délicatement 5 mL de sonde à 10 μM
 - Incuber 10 min supplémentaires à l'abri de la lumière et à température ambiante
 - Placer la boîte de Pétri et la lampe sur l'agitateur, déclencher le chronomètre : photomarquer les cellules 4 min
 - Retirer la solution de sonde et de compétiteur avec une pipette sérologique, puis gratter les cellules et les transférer dans un tube falcon de 15 mL grâce à 2 x 5 mL de PBS à 4 °C (comme ci-dessus)
 - Conserver le tube falcon dans de la glace

Lyse cellulaire (3 tubes falcon) :

Réaliser l'ensemble de la procédure à 4 °C.

- **Solutions :**
 - tampon PBS à 4 °C : 3 mL
 - tampon de lyse : 1 mL (10 μL de Tris-HCl 1M à pH 7,4, 20 μL d'EDTA 0,25 M à pH 8, 42 μL de NaCl 3 M, 100 μL de Triton X-100 à 10%, 10 μL de SDS 10%, 818 μL d'eau, 20 μL de cocktail d'inhibiteurs de protéases)
- **Protocole :**
 - Centrifuger les tubes falcon de 15 mL pendant 5 min à 4 °C et 1500 rpm
 - Retirer les surnageants, resuspendre les culots dans 1 mL de PBS à 4 °C et transférer dans des tubes eppendorf d'1,5 mL à fond conique
 - Centrifuger 5 min à 4 °C et 1500 rpm, retirer les surnageants avec une micropipette et resuspendre les culots dans 200 μL de tampon de lyse
 - Incuber 1 h à 4 °C en vortexant les échantillons toutes les 20 min
 - Centrifuger 5 min à 4 °C et 1500 rpm, puis transférer les surnageants dans des tubes eppendorf de 2 mL

Dosage protéique à l'acide bicinchoninique

Le dosage de protéines est réalisé en microplaque 96 puits (Greiner 736-0119, VWR). Il est basé sur la réduction d'ions Cu^{2+} par les liaisons peptidiques des protéines à 37 °C. A cette température, la réduction est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques. La réduction est suivie de la chélation de chaque ion Cu^{+} formé par 2 molécules d'acide bicinchoninique, les complexes produits absorbant à 562 nm. La concentration protéique des échantillons est donc déterminée par mesure de l'absorbance à 562 nm et à l'aide d'une gamme étalon d'albumine bovine traitée.

Solutions :

- solution étalon d'albumine bovine à 1 mg/mL
- solution R : 20 mL d'acide bicinchoninique + 400 µL de sulfate de cuivre

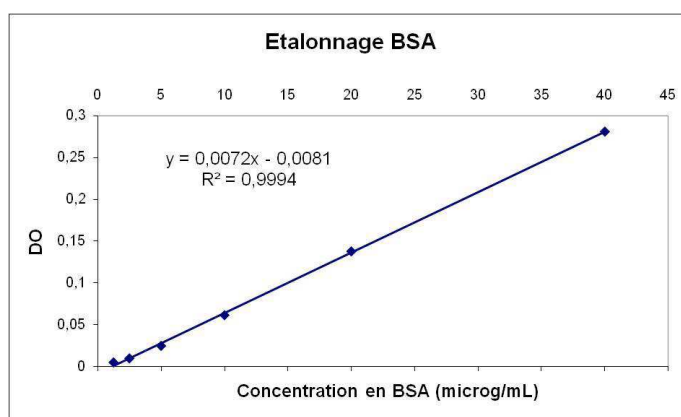
Protocole (1 microplaque, 1 échantillon) :

- Préparer la microplaque de la manière suivante :

	colonne 1 : eau	colonnes 2 et 3 : gamme BSA en duplicata (concentration en µg/mL)	colonnes 4 et 5 : échantillon en duplicata (facteur de dilution)
A	100 µL	16 µL à 1 mg/mL + 184 µL d'eau (80)	2 µL + 198 µL d'eau (100)
B	100 µL	100 µL de A + 100 µL d'eau (40)	100 µL de A + 100 µL d'eau (200)
C	100 µL	100 µL de B + 100 µL d'eau (20)	100 µL de B + 100 µL d'eau (400)
D	100 µL	100 µL de C + 100 µL d'eau (10)	
E	100 µL	100 µL de D + 100 µL d'eau (25)	
F	100 µL	100 µL de E + 100 µL d'eau (12,5)	

Remarque : 100 µL de solution sont éliminés dans la ligne F des colonnes 2 et 3 et dans la ligne C des colonnes 4 et 5 afin d'avoir dans tous les puits le même volume final de 100 µL.

- Ajouter 100 µL/puit de solution R avec une pipette à 8 canaux
- Incuber 30 min à 37 °C et mesurer l'absorbance à 562 nm (spectrophotomètre SPECTRAmax[®] GEMINI XS)
- Tracer la droite d'étalonnage : $\text{DO} = f([\text{BSA}])$ en moyennant les valeurs de DO obtenues
- Déterminer, grâce à l'équation de la droite, la concentration en protéines de l'échantillon : prendre pour le calcul la moyenne des deux valeurs de DO les plus élevées



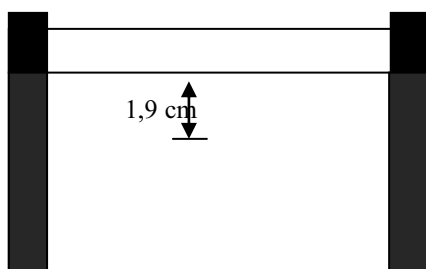
Electrophorèse sur gel SDS-PAGE

La préparation des gels ainsi que la migration des échantillons ont été réalisées grâce au système Miniprotean II de Bio-Rad. Les protocoles décrits ici sont adaptés aux expériences de migration des lysats protéiques de cellules FRTL-5 ayant subi ou non un photomarquage préalable.

Préparation d'un gel SDS-PAGE :

Montage

- Nettoyer le matériel avec du savon, rincer à l'eau puis à l'éthanol (plaques de verre, espaceurs, peignes)
- Réaliser un sandwich grande plaque – espaceurs – petite plaque de la manière suivante :



Superposer 2 espaceurs de 0,5 mm d'épaisseur pour obtenir un gel d'1 mm d'épaisseur

- Placer le sandwich dans l'un des supports à vis du Mini-Protean II, poser le tout perpendiculairement à la paillasse pour aligner le bas des plaques et des espaceurs puis serrer les vis
- Clipper le montage sur le support de coulée du Mini-Protean II
- Faire une marque à 1,9 du haut de la petite plaque selon les échantillons à déposer

Solutions

	Gel de concentration (5%)	Gel de séparation (12%)
H ₂ O milli Q	5,77 mL	3,35 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,50 mL	
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8		2,50 mL
Acrylamide-Bisacrylamide 30%	1,66 mL	4 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL
APS 10%	100 µL	100 µL
TEMED	20 µL	20 µL

Coulée

- Ajouter l'APS et le TEMED dans la solution de gel de séparation puis vortexer fortement
- Verser la solution entre les deux plaques de verre avec une pipette pasteur jusqu'à la marque
- Recouvrir d'isopropanol et laisser polymériser 15 min, puis retirer à l'aide de papier absorbant
- Ajouter de l'eau jusqu'en haut à l'aide d'une pipette puis retirer (3×)
- Absorber l'eau résiduelle insérée dans l'espace interplaque avec du papier Whatmann
- Ajouter l'APS et le TEMED dans le gel de concentration puis vortexer fortement
- Verser entre les deux plaques de verre jusqu'en haut, et insérer délicatement le ou les peigne(s) souhaité(s)
- Laisser polymériser 10 min
- Ajouter de la solution de gel de concentration (tant que celle-ci est suffisamment liquide) au fur et à mesure que le gel se rétracte entre les dents du ou des peigne(s)

Migration des échantillons :

Solutions

- Tampon de migration 10× (TrisBase : 15 g, glycine : 72 g, SDS : 5 g, eau : 500 mL)
- Laemmli 5× (400 mg de SDS, 2,4 g de glycérol, 364 µL de β-mercaptoéthanol, 9,8 mg de bleu de bromophénol, 1 mL de Tris-HCl 1M à pH 6,8, 707 µL d'eau) : à diluer avec de l'eau

Montage

- Retirer délicatement le ou les peigne(s)
- Remplir les puits d'eau puis retirer l'eau en retournant le support ; sécher les puits avec du papier Whatmann
- Retirer le montage du support de coulée et le placer sur le support à électrodes
- Placer de l'autre côté du support à électrodes soit un deuxième montage avec gel, soit un support à vis ne contenant qu'une petite plaque de verre, puis placer le tout dans la cuve de migration
- Préparer 350 mL de tampon de migration 1× et en remplir la chambre formée par les deux supports à vis jusqu'à ce que le tampon dépasse les petites plaques de verre de 2 cm ; verser le reste du tampon dans la cuve
- Retirer les bulles d'air du bas des plaques de verre par des mouvements de balancier

Dépôt des échantillons

- échantillons destinés à être transférés sur membrane :
 - * Additionner 5 µL de Laemmli 5× à la quantité souhaitée d'échantillon (20 µL max.)
 - * Compléter si nécessaire à 25 µL avec du tampon de lyse ou du PBS-SDS (0,1%)
 - * Chauffer 5 min à 95 °C puis laisser revenir à température ambiante
 - * Déposer dans les puits du gel avec des cônes gel loader
 - * Faire migrer 30 min à 15 mA, puis environ 1 h à 25 mA, jusqu'à ce que le Laemmli diffuse dans le tampon (doubler l'ampérage pour deux gels)

Transfert de protéines sur membrane PVDF et révélation par chimiluminescence

Transfert de protéines :

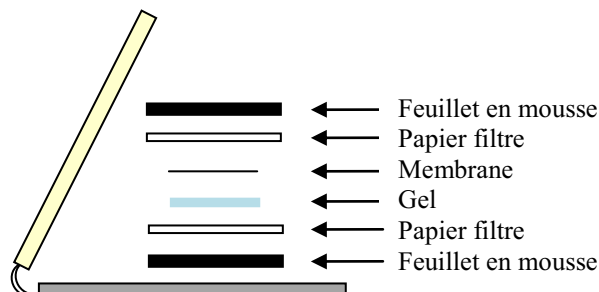
Les expériences de transfert ont été réalisées grâce au système Mini Trans-Blot de Bio-Rad.

Solutions

- Tampon de transfert 1× (TrisBase : 5,82 g, glycine : 2,93 g, eau : 1 L) à 4 °C
- Ethanol absolu

Protocole (pour 1 gel)

- Plonger 1 membrane PVDF (Bio-Rad 162-0174) dans de l'éthanol absolu quelques secondes
- Immerger la membrane dans une cuve contenant du tampon de transfert 1× (~300 mL)
- Ajouter dans la cuve le gel d'électrophorèse contenant les échantillons à transférer (éliminer au préalable les dents du gel de concentration au moyen d'un espaceur)
- Ajouter deux papiers filtres (Bio-Rad 170-3932) et deux feuillets en mousse noire
- Equilibrer 20 min
- Pendant ce temps, préparer le montage :
 - * placer la cuve de migration sur un agitateur magnétique et y ajouter un barreau aimanté
 - * placer le module à électrodes dans la cuve (borne négative au centre)
 - * remplir la cuve avec du tampon de transfert 1× à 4 °C
- Ouvrir une cassette face grise sur la paillasse et réaliser le sandwich suivant :



Remarques : la membrane doit être découpée aux dimensions exactes du gel, le gel est recouvert de tampon avant que la membrane ne soit déposée et une fois la membrane posée, les bulles d'air sont soigneusement éliminées.

- Fermer la cassette et la placer la cassette dans la cuve (face grise du côté de la borne négative, joint plastique en bas)
- Fermer la cuve et la relier à un générateur
- Transférer 1 h à 100 V sous agitation

Révélation par chimiluminescence :

Solutions

- PBS-Tween 0,1% : 350 mL
 - PBS-Tween 0,1% à 5% de BSA : 40 mL
 - Streptavidine-HRP 1 mg/ml
 - Luminol : 2 mL
 - Peroxyde d'hydrogène : 2 mL
 - Révélateur photo dilué par 5 : 500 mL
 - Fixateur photo dilué par 5 : 500 mL
- } Solutions du kit Pierce

Protocole (pour 1 membrane)

- Laver la membrane 5 min dans 40 mL de PBS-Tween 0,1%
- Incuber dans 40 mL de PBS-Tween 0,1% à 5% de BSA 1 nuit à 4 °C
- Laver 3 x 10 min dans 40 mL de PBS-Tween 0,1%
- Incuber 1 h dans une solution de Streptavidine-HRP préparée de la manière suivante : 40 µL de streptavidine-HRP sont dilués dans 40 mL de PBS-Tween 0,1% contenant 1% de BSA.
- Laver 3 x 10 min avec 40 mL de PBS-Tween 0,1%

Chambre noire :

- Préparer dans une boîte 4 mL d'une solution peroxyde d'hydrogène/luminol 50/50
- Transférer la membrane dans la boîte et l'imbiber de solution à l'aide d'une micropipette
- Egoutter la membrane sur du papier absorbant
- Envelopper la membrane dans une feuille de papier Saran
- Lisser la feuille à la main de sorte à éliminer les bulles d'air
- Placer le tout dans une cassette de révélation
- Eteindre la lumière et allumer la lumière rouge
- Sortir les films photo de leur emballage
- Recouvrir la membrane d'un film photo (Thermo Scientific)
- Fermer la cassette et compter entre 20 et 30 s
- Récupérer le film en faisant attention de ne pas le faire glisser
- Immerger dans le révélateur et agiter doucement jusqu'à apparition des bandes
- Rincer à l'eau
- Immerger dans le fixateur quelques minutes
- Ranger les films photos avant de rallumer la lumière
- Suspendre le film et laisser sécher plusieurs heures

Capture sur billes d'agarose-Streptavidine

Les expériences de capture sur billes d'agarose-Streptavidine reposent sur la forte affinité pour la Streptavidine de la biotine et de la desthiobiotine. Les constantes de dissociation sont de 10^{-15} M pour un complexe biotine - Streptavidine et de 10^{-12} M pour un complexe desthiobiotine - Streptavidine. Cette différence d'affinité implique que le traitement des échantillons soit adapté à la sonde utilisée lors des expériences de photomarquage.

Solutions :

- PBS 4 °C
- PBS-SDS (0,1%)
- NaCl 1M et NaCl 2M
- Laemmli 5× (400 mg de SDS, 2,4 g de glycérol, 364 µL de β-mercaptoéthanol, 9,8 mg de bleu de bromophénol, 1 mL de Tris-HCl 1M à pH 6,8, 707 µL d'eau) : à diluer avec de l'eau

Protocole :

Incubation :

- Prélever 10 µL de billes (10 à 30 µg de BSA biotinylée)
 - Transférer dans un tube eppendorf à fond conique
 - Ajouter 200 µL de PBS à 4 °C et vortexer 10 s
 - Centrifuger 5 min à 4 °C et 3000 RPM
 - Retirer le surnageant avec une micropipette
- } 3 ×
- Diluer le lysat cellulaire à une concentration de 1 µg/µL avec du PBS-SDS (0,1%) à 4 °C
 - Déposer 200 µg sur les billes d'agarose-streptavidine, puis faire tourner sur roue 1 nuit à 4 °C

Lavages :

- Centrifuger 5 min à 10 °C et 3000 RPM, puis retirer le surnageant
 - Transférer les billes dans un tube falcon de 15 mL avec à 5 x 1 mL de PBS-SDS (0,1%)
 - Incuber 10 min à température ambiante en vortexant l'échantillon toutes les 2 min
 - Centrifuger 5 min à 10 °C et 3000 RPM puis retirer le surnageant
 - Ajouter 5 mL de PBS-SDS (0,1%)
 - Incuber et centrifuger comme ci-dessus
- } 2×
- Ajouter 2 mL de NaCl 1M, incuber et centrifuger comme ci-dessus
 - Ajouter 2 mL de NaCl 2M, incuber et centrifuger comme ci-dessus
- Transférer les billes dans un tube eppendorf d'1,5 mL avec 4 x 200 µL de PBS-SDS (0,1%)
 - Incuber et centrifuger comme ci-dessus
 - Ajouter 400 µL de PBS-SDS (0,1%)
 - Incuber et centrifuger comme ci-dessus
 - Ajouter 200 µL de PBS-SDS (0,1%)
 - Incuber et centrifuger comme ci-dessus
- Ajouter 100 µL de Laemmli 1×
 - Fermer l'éppendorf avec du parafilm
 - Incuber 15 min à 40 °C
 - Centrifuger 5 min à 20 °C et 3000 RPM puis retirer le surnageant

Elution :

- Ajouter 100 µL de Laemmli 1×
- Fermer l'éppendorf avec du parafilm
- Incuber 15 min à 60 °C
- Conserver l'échantillon avec les billes à - 20 °C, puis déposer tel quel sur gel SDS-PAGE

¹ Waltz F, Pillette L, Ambroise Y, *Anal. Biochem* **2010**, 396, 91-95

² Mosmann T, *J. Immunol. Meth* **1983**, 1-2, 55-63

Chemistry & organic synthesis

Methods

- Thin-layer chromatography (TLC)

TLC were executed on 0.25 mm Merck® 60 F254 silica plates. Spots were revealed by UV irradiation at 254 nm or 310 nm, and/or appropriate revelators (phosphomolybdic acid, anisaldehyde or vanillin solutions in ethanol/sulphuric acid). When given, retardation factor (Rf) is followed by the composition of elution solvent.

- Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

NMR spectra were recorded on a BRUKER DPX 400 MHz spectrometer and an Avance calculator, and analyzed with MestReNOVA LITE V5.2.5. Resonance frequencies are respectively 400.13 MHz, 100.61 MHz and 160.05 MHz for ^1H , ^{13}C and ^{19}F . Chemical shifts (δ) are given in ppm relative to standard solvent:

Solvent	δ (^1H)	δ (^{13}C)	δ (^{19}F)
Chloroform	7.26 ppm	77.0 ppm	/
Dimethylsulfoxide	2.50 ppm	39.5 ppm	/
Methanol	3.31 ppm	49.0 ppm	/
Trichlorofluoromethane	/	/	0.0 ppm

Chemical shifts are indicated in ascending order, followed by signal mutiplicity, coupling constant (J , Hz), integration value and attribution of signals. Multiplicity is given as follows:

Abbreviation	Multiplicity
s	singlet
bs	broad singlet
d	doublet
dd	doublet of doublet
t	triplet
m	multiplet

Attribution of NMR signals was determined using NMR spectra simulators (ChemBioOffice 12.0 and ACDLABS 12.0), DEPT and 2D correlation experiments (COSY). Atoms are labeled with letters in alphabetical order, so that one can easily compare spectra of similar structures; thus, labeling does not respect IUPAC standard nomenclature.

- High-performance liquid chromatography (HPLC)

Analyzes were carried out using a CL-ESI-QUAD (Waters) equipped with a photodiode array (PDA) detector (UV 210-400 nm, Waters), evaporative light scattering detector (PL-ELS 1000, Polymer Laboratory), a positive and negative electrospray mass detector (ESI⁺/ESI⁻) MICROMASS ZQ (105-1000 UMA) and a CX-Bridge C18 3,5 μm x 4,6 mm x 100 mm column. Mobile phase flow was 1 mL/min and injected volume was 20 μL . Eluent system was a mix of solutions A (H_2O + 0.1% formic acid) and B (Acetonitrile + 0.1% formic acid).

- Mass Spectroscopy (MS)

MS spectra were recorded using a MARINER ESI-TOF (Perspective Biosystems); samples were ionized by electrospray and ions were analyzed with a time-of-flight (TOF) analyzer.

- High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS)

HRMS spectra were recorded by the Small Molecule Mass Spectroscopy Platform of IMAGIF, at Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, Gif-sur-Yvette), with a LCP premier XE mass spectrometer (Waters) using flow injection analysis mode.

- Silica gel chromatography (CombiFlash®)

Purification were carried out using a CombiFlash Rf RediSep system (Serlabo Technologies, Teledyn ISCO) and commercial RediSep (Teledyn ISCO) or SNAP (Biotage) silica cartridges.

- Anhydrous solvents

Anhydrous solvents were obtained by distillation under nitrogen atmosphere, using dessicants (CaH₂ for dichloromethane and Na/benzophenone for tetrahydrofuran).

- Microwaves

Microwave-assisted reactions were run on a Discover SP system (CEM) equipped with an explorer module.

- Circular dichroism (CD)

Circular dichroism spectra were recorded on a Jasco-815 (Jasco) equipped with a Peltier type thermostating accessory (CDF-426S, Jasco). Measurements were carried out at 20 °C using a 1-mm quartz cell in a volume of 300–350 µL. Compounds (200 µg) were dissolved in MeOH (500 µL)/DMSO (26–29 µL). The instrument settings were: bandwidth, 1.0 nm; data pitch, 0.2 nm; speed, 50 nm/min; accumulation, 2; wavelengths, 370–220 nm.

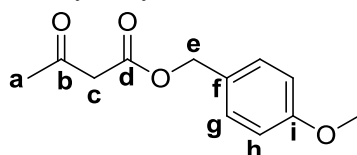
General procedure for the preparation of acetoacetates C1-C25 and C36.

2,2,6-trimethyl-4*H*-1,3-dioxin-4-one (1.0 mL, 7.7 mmol) and alcohol (5.9 mmol) were mixed with potassium acetate (241 mg, 2.9 mmol) in a microwave vial. The mixture was microwaved for 20 minutes at 130 °C. Direct chromatography on silica gel (cHex/AcOEt) afforded title compound in low to excellent yield.

General procedure for the preparation of β -ketoesters C26-C35 and C37.

To a stirred solution of Meldrum's acid (1.0 mmol), carboxylic acid (1.0 mmol) and DCC (1.1 mmol) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) was added DMAP (1.1 mmol) under argon atmosphere. After stirring one night at room temperature, DCU was filtered off and filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in 20 mL ethyl acetate and washed with 10 mL 1M aq. HCl, 5 mL water and 5 mL brine. Organic layers were then dried on MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was resuspended in 5 mL toluene and 4-methoxybenzyl alcohol (1.2 mmol) was added. The mixture was microwaved during 30 minutes at 100 °C. Evaporation of solvent and subsequent chromatography on silica gel (cHex/AcOEt) afforded title compound with moderate to good yields.

4-Methoxybenzyl 3-oxobutanoate (C1)

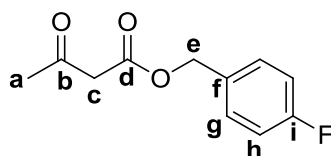


Yield : 73%
 Molecular formula : C₁₂H₁₄O₄
 MW : 222.24 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.16 (s, 3H_a), 3.64 (s, 2H_c), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 5.06 (s, 2H_e), 6.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H_h), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H_g)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.5 (C_a), 50.0 (C_c), 55.5 (OCH₃), 66.3 (C_e), 114.2 (C_h), 128.1 (C_f), 130.5 (C_g), 159.6 (C_i), 167.7 (C_d), 202.2 (C_b)

4-Fluorobenzyl 3-oxobutanoate (C2)



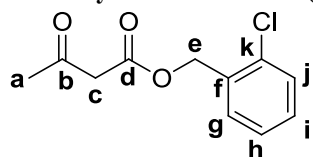
Yield : 54%
 Molecular formula : C₁₁H₁₁FO₃
 MW : 210.20 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.17 (s, 3H_a), 3.67 (s, 2H_c), 5.12 (s, 2H_e), 7.19-7.24 (m, 2H_f), 7.43 (dd, *J* = 5.6 Hz, 8.4 Hz, 2H_g)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.5 (C_a), 49.9 (C_c), 65.7 (C_e), 115.7 (d, *J* = 21.3 Hz, C_h), 130.8 (d, *J* = 8.3 Hz, C_g), 132.5 (d, *J* = 3.0 Hz, C_f), 162.3 (d, *J* = 242.4 Hz, C_i), 167.6 (C_d), 202.0 (C_b)

RMN ¹⁹F (160 MHz, CFCl₃) δ -114

2-Chlorobenzyl 3-oxobutanoate (C3)

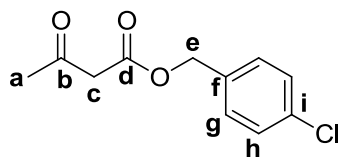


Yield : 79%
 Molecular formula : C₁₁H₁₁ClO₃
 MW : 226.66 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.19 (s, 3H_a), 3.71 (s, 2H_c), 5.21 (s, 2H_e), 7.35-7.41 (m, 2H), 7.49-7.55 (m, 2H)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.5 (C_a), 49.9 (C_c), 63.9 (C_e), 127.8, 129.8, 130.6, 130.8, 133.1, 133.6, 167.4 (C_d), 201.9 (C_b)

4-Chlorobenzyl 3-oxobutanoate (C4)

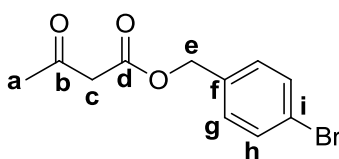


Yield : 81%
 Molecular formula : C₁₁H₁₁ClO₃
 MW : 226.66 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.18 (s, 3H_a), 3.69 (s, 2H_c), 5.13 (s, 2H_e), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_h), 7.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_g)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.6 (C_a), 49.9 (C_c), 65.6 (C_e), 128.9 (C_{g/h}), 130.3 (C_{g/h}), 133.2 (C_i), 135.3 (C_f), 167.6 (C_d), 202.0 (C_b)

4-Bromobenzyl 3-oxobutanoate (C5)

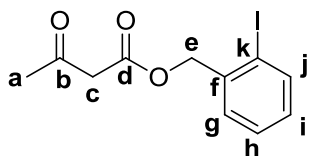


Yield : 74%
 Molecular formula : C₁₁H₁₁BrO₃
 MW : 271.11 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.18 (s, 3H_a), 3.69 (s, 2H_c), 5.11 (s, 2H_e), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_h), 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_g)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.6 (C_a), 49.9 (C_c), 65.6 (C_e), 121.7 (C_i), 130.6 (C_{g/h}), 131.8 (C_{g/h}), 135.8 (C_i), 167.6 (C_d), 202.0 (C_b)

2-Iodobenzyl 3-oxobutanoate (C6)

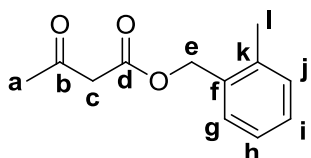


Yield : 97%
 Molecular formula : C₁₁H₁₁IO₃
 MW : 318.11 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.20 (s, 3H_a), 3.72 (s, 2H_c), 5.11 (s, 2H_e), 7.10-7.14 (m, 1H_i), 7.41-7.48 (m, 2H_{g-h}), 7.90 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_j)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.6 (C_a), 49.9 (C_c), 70.4 (C_e), 99.3 (C_k), 128.9, 130.1, 130.7, 138.2 (C_f), 139.6 (C_j), 167.4 (C_d), 201.8 (C_b)

2-Methylbenzyl 3-oxobutanoate (C7)

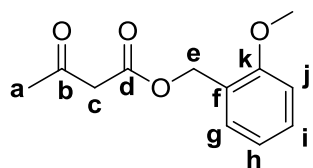


Yield : 86%
 Molecular formula : C₁₂H₁₄O₃
 MW : 206.24 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.17 (s, 3H_a), 2.29 (s, 3H_i), 3.68 (s, 2H_c), 5.13 (s, 2H_e), 7.19-7.26 (m, 3H_{g-h-i}), 7.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H_j)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.8 (C_i), 30.6 (C_a), 49.9 (C_c), 65.1 (C_e), 126.3, 128.9, 129.6, 130.6, 134.1 (C_k), 137.2 (C_f), 167.6 (C_d), 202.1 (C_b)

2-Methoxybenzyl 3-oxobutanoate (C8)

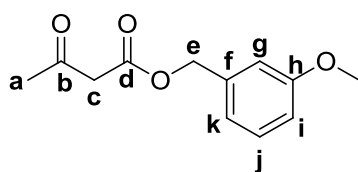


Yield : 89%
 Molecular formula : C₁₂H₁₄O₄
 MW : 222.24 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.18 (s, 3H_a), 3.66 (s, 2H_c), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 5.11 (s, 2H_e), 6.93-6.97 (m, 1H), 7.03 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.32-7.36 (m, 2H)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.5 (C_a), 50.0 (C_c), 55.9 (OCH₃), 62.1 (C_e), 111.3, 120.7, 123.8, 129.9, 130.2, 157.5 (C_k), 167.6 (C_d), 201.9 (C_b)

3-Methoxyphenethyl 3-oxobutanoate (C9)

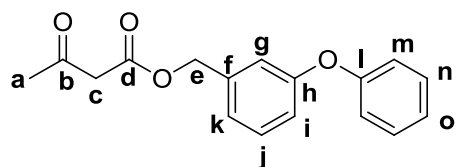


Yield : 87%
 Molecular formula : C₁₂H₁₄O₄
 MW : 222.24 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.24 (s, 3H_a), 3.49 (s, 2H_c), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 5.14 (s, 2H_e), 6.84-6.92 (m, 3H_{g-i}), 6.90 (m, 1H_j)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 30.4 (C_a), 50.2 (C_c), 55.5 (OCH₃), 67.2 (C_e), 113.9 (C_{g/i}), 114.2 (C_{g/i}), 120.6 (C_k), 129.9 (C_j), 137.0 (C_f), 160.0 (C_h), 167.1 (C_d), 200.5 (C_b)

3-Phenoxybenzyl 3-oxobutanoate (C10)

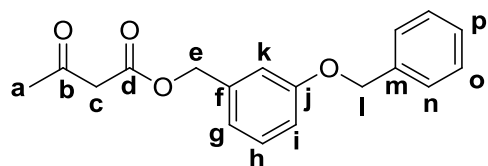


Yield : 84%
 Molecular formula : C₁₇H₁₆O₄
 MW : 284.31 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.27 (s, 3H_a), 3.52 (s, 2H_c), 5.16 (s, 2H_e), 6.97-7.16 (m, 6H), 7.32-7.37 (m, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 30.2 (C_a), 50.0 (C_c), 66.6 (C_e), 118.3 (C_{g/i}), 118.6 (C_{g/i}), 119.1 (C_m), 122.8 (C_{k/o}), 123.6 (C_{k/o}), 129.8 (C_n), 130.0 (C_j), 137.2 (C_f), 156.8 (C_{h/l}), 157.6 (C_{h/l}), 166.8 (C_d), 200.2 (C_b)

3-(Benzyloxy)benzyl 3-oxobutanoate (C11)

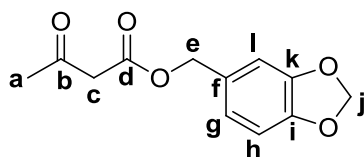


Yield : 75%
 Molecular formula : C₁₈H₁₈O₄
 MW : 298.33 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.18 (s, 3H_a), 3.69 (s, 2H_c), 5.11 (s, 4H_{e-i}), 6.94-6.99 (m, 2H_n), 7.04 (s, 1H_k), 7.27-7.45 (m, 6H_{g-h-i-o-p})

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.6 (C_a), 50.0 (C_c), 66.2 (C_e), 69.6 (C_i), 114.7 (C_{i-k}), 120.6 (C_g), 128.2, 128.3, 128.9, 130.0, 137.4 (C_{f/m}), 137.9 (C_{f/m}), 158.9 (C_j), 167.6 (C_d), 202.0 (C_b)

Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl 3-oxobutanoate (C12)

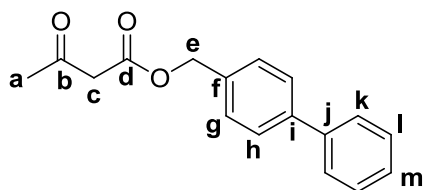


Yield : 91%
 Molecular formula : $C_{12}H_{12}O_5$
 MW : $236.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 Yellow liquid

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.24 (s, 3H_a), 3.48 (s, 2H_c), 5.07 (s, 2H_e), 5.97 (s, 2H_j), 6.77-6.85 (m, 3H_{g-h-l})

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 30.5 (C_a), 50.0 (C_c), 66.4 (C_e), 101.5 (C_j), 108.5 (C_{h/l}), 109.3 (C_{h/l}), 122.6 (C_g), 129.9 (C_f), 147.6 (C_{i/k}), 147.7 (C_{i/k}), 167.6 (C_d), 202.0 (C_b)

[1,1'-Biphenyl]-4-ylmethyl 3-oxobutanoate (C13)

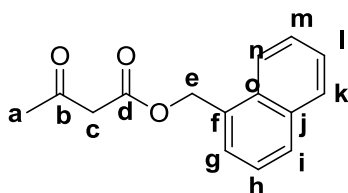


Yield : 93%
 Molecular formula : $C_{17}H_{16}O_3$
 MW : $268.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 Yellow liquid

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.19 (s, 3H_a), 3.70 (s, 2H_c), 5.18 (s, 2H_e), 7.36-7.39 (m, 1H_m), 7.45-7.49 (m, 4H), 7.67-7.69 (m, 4H)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 30.6 (C_a), 50.0 (C_c), 66.2 (C_e), 127.0 (C_{g/k}), 127.1 (C_{g/k}), 128.0 (C_m), 129.1 (C_{h/l}), 129.4 (C_{h/l}), 135.5 (C_f), 140.1 (C_{i/j}), 140.4 (C_{i/j}), 167.6 (C_d), 202.1 (C_b)

Naphtalen-1-ylmethyl 3-oxobutanoate (C14)

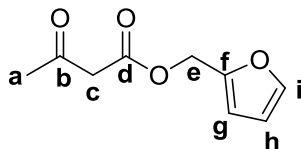


Yield : 81%
 Molecular formula : $C_{15}H_{14}O_3$
 MW : $242.27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 White powder

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.22 (s, 3H_a), 3.50 (s, 2H_c), 5.64 (s, 2H_e), 7.44-7.48 (m, 1H_g), 7.51-7.60 (m, 3H), 7.85-7.90 (m, 2H), 8.17 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H_n)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 30.5 (C_a), 50.0 (C_c), 65.0 (C_e), 124.1, 125.8, 126.5, 127.1, 127.9, 129.0, 129.5, 131.5, 131.7, 133.7, 167.7 (C_d), 202.0 (C_b)

Furan-2-ylmethyl 3-oxobutanoate (C15)

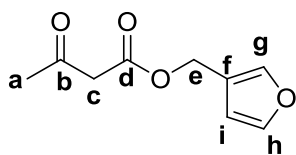


Yield : 67%
 Molecular formula : $C_9H_{10}O_4$
 MW : $182.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 Yellow liquid

RMN ^1H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.26 (s, 3H_a), 3.49 (s, 2H_c), 5.15 (s, 2H_e), 6.38-6.39 (m, 1H_h), 6.45 (d, $J = 3.2 \text{ Hz}$, 1H_g), 7.44 (s, 1H_i)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) δ 30.1 (C_a), 49.9 (C_c), 58.8 (C_e), 110.6 (C_{g/h}), 111.1 (C_{g/h}), 143.5 (C_i), 148.8 (C_f), 166.7 (C_d), 200.2 (C_b)

Furan-3-ylmethyl 3-oxobutanoate (C16)

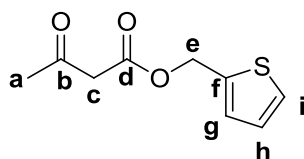


Yield : 78%
 Molecular formula : C₉H₁₀O₄
 MW : 182.17 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.26 (s, 3H_a), 3.49 (s, 2H_c), 5.07 (s, 2H_e), 6.45 (s, 1H_e), 7.42 (s, 1H_h), 7.51 (s, 1H_g)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 30.1 (C_a), 50.0 (C_c), 58.5 (C_e), 110.5 (C_i), 119.8 (C_f), 141.8 (C_g), 143.5 (C_h), 166.9 (C_d), 200.3 (C_b)

Thiophen-2-ylmethyl 3-oxobutanoate (C17)

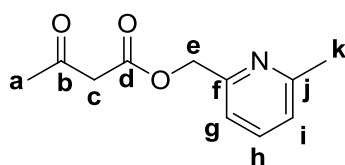


Yield : 91%
 Molecular formula : C₉H₁₀O₃S
 MW : 198.24 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.16 (s, 3H_a), 3.65 (s, 2H_c), 5.30 (s, 2H_e), 7.03 (dd, J₁ = 3.6 Hz, J₂ = 4.8 Hz, 1H_h), 7.18 (d, J = 3.2 Hz, 1H_g), 7.57 (d, J = 5.2 Hz, 1H_i)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.5 (C_a), 49.9 (C_c), 60.9 (C_e), 127.3, 128.1, 129.2, 137.9 (C_f), 167.5 (C_d), 201.8 (C_b)

(5-Methylpyridin-2-yl)methyl 3-oxobutanoate (C18)

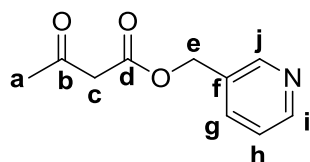


Yield : 28%
 Molecular formula : C₁₁H₁₃NO₃
 MW : 207.23 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.30 (s, 3H_a), 2.56 (s, 3H_k), 3.57 (s, 2H_c), 5.26 (s, 2H_e), 7.11 (d, J = 7.6 Hz, 1H_g), 7.19 (d, J = 7.6 Hz, 1H_i), 7.59-7.63 (m, 1H_h)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 24.3 (C_k), 30.6 (C_a), 50.0 (C_c), 67.0 (C_e), 118.9 (C_{g/i}), 122.8 (C_{g/i}), 137.6 (C_h), 155.1 (C_{f/j}), 158.0 (C_{f/j}), 167.5 (C_d), 202.0 (C_b)

Pyridin-3-ylmethyl 3-oxobutanoate (C19)

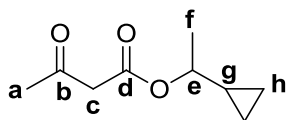


Yield : 67%
 Molecular formula : C₁₀H₁₁NO₃
 MW : 193.20 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.18 (s, 3H_a), 3.70 (s, 2H_c), 5.19 (s, 2H_e), 7.40-7.43 (dd, J₁ = 5.2 Hz, J₂ = 7.6 Hz, 1H_h), 7.80 (d, J = 7.6 Hz, 1H_g), 7.54 (d, J = 4.4 Hz, 1H_i), 8.61 (s, 1H_j)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.6 (C_a), 49.9 (C_c), 64.1 (C_e), 124.0 (C_h), 132.0 (C_f), 136.4 (C_g), 149.7 (C_{i/j}), 149.8 (C_{i/j}), 167.6 (C_d), 202.0 (C_b)

1-Cyclopropylethyl 3-oxobutanoate (C20)

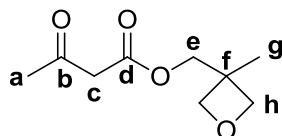


Yield : 87%
 Molecular formula : C₉H₁₄O₃
 MW : 170.21 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.23-0.29 (m, 1H_h), 0.37-0.41 (m, 1H_h), 0.49-0.57 (m, 2H_h), 0.97-1.02 (m, 1H_g), 1.33 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H_f), 2.28 (s, 3H_a), 3.44 (s, 2H_c), 4.36-4.41 (m, 1H_e)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 2.6 (C_h), 3.7 (C_h), 16.2 (C_f), 19.7 (C_g), 30.0 (C_a), 50.5 (C_e), 76.7 (C_e), 166.8 (C_d), 200.7 (C_b)

(3-Methyloxetan-3-yl)methyl 3-oxobutanoate (C21)

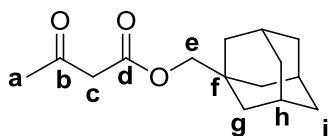


Yield : 77%
 Molecular formula : C₉H₁₄O₄
 MW : 186.21 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.36 (s, 3H_g), 2.30 (s, 3H_a), 3.54 (s, 2H_c), 4.26 (s, 3H_e), 4.40 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H_h), 4.53 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H_h)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 21.1 (C_g), 30.2 (C_a), 39.1 (C_f), 49.9 (C_e), 69.4 (C_e), 79.4 (C_h), 167.1 (C_d), 200.2 (C_b)

(3r, 5r, 7r)-Adamantan-1-ylmethyl 3-oxobutanoate (C22)

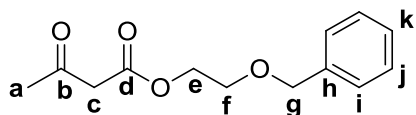


Yield : 91%
 Molecular formula : C₁₅H₂₂O₃
 MW : 250.33 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.55 (s, 6H_g), 1.70 (dd, *J*₁ = 12.4 Hz, *J*₂ = 34.4 Hz, 6H_i), 2.00 (s, 3H_h), 2.30 (s, 3H_a), 3.48 (s, 2H_c), 3.76 (s, 2H_e)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 28.0 (C_h), 30.2 (C_a), 33.2 (C_f), 36.9 (C_g), 39.2 (C_i), 50.1 (C_e), 74.9 (C_e), 167.3 (C_d), 200.6 (C_b)

2-(Benzyloxy)ethyl 3-oxobutanoate (C23)

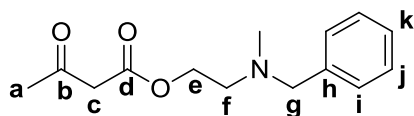


Yield : 28%
 Molecular formula : C₁₃H₁₆O₄
 MW : 236.26 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.29 (s, 3H_a), 3.51 (s, 2H_c), 3.71 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H_f), 4.35 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H_e), 4.58 (s, 2H_g), 7.34-7.38 (m, 5H_{i-k})

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 30.1 (C_a), 50.0 (C_e), 64.4 (C_e), 67.8 (C_f), 73.2 (C_g), 127.8 (C_{ij}), 128.4 (C_{ij}), 129.7 (C_k), 137.7 (C_h), 167.1 (C_d), 200.4 (C_b)

2-(Benzyl(methyl)amino)ethyl 3-oxobutanoate (C24)

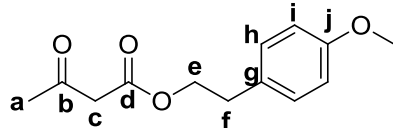


Yield : 26%
 Molecular formula : C₁₄H₁₉NO₃
 MW : 249.31 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.29 (s, 6H, 3H_a + NMe), 2.70 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H_f), 3.48 (s, 2H_e), 3.57 (s, 2H_g), 4.29 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H_c), 7.30-7.35 (m, 5H_{i-k})

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 30.1 (C_a), 42.5 (NMe), 50.1 (C_e), 55.2 (C_f), 62.5 (C_{e/g}), 63.1 (C_{e/g}), 127.1, 128.3, 129.0, 138.6 (C_h), 167.1 (C_d), 200.5 (C_b)

4-Methoxyphenethyl 3-oxobutanoate (C25)

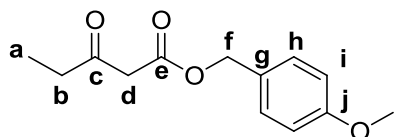


Yield : 89%
 Molecular formula : C₁₃H₁₆O₄
 MW : 236.26 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.14 (s, 3H_a), 2.81-2.84 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H_f), 3.57 (s, 2H_e), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 4.20-4.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H_c), 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_h)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.5 (C_a), 33.8 (C_f), 50.0 (C_e), 55.4 (OCH₃), 65.7 (C_e), 114.2 (C_i), 130.0 (C_g), 130.3 (C_h), 158.3 (C_j), 167.7 (C_d), 202.1 (C_b)

4-Methoxybenzyl 3-oxopentanoate (C26)

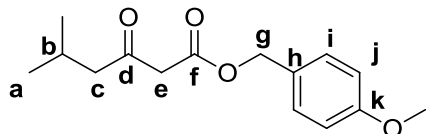


Yield : 72%
 Molecular formula : C₁₃H₁₆O₄
 MW : 236.26 g.mol⁻¹
 Colorless liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.08 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H_a), 2.55 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H_b), 3.48 (s, 2H_d), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 5.13 (s, 2H_f), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_h)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 7.5 (C_a), 36.3 (C_b), 49.0 (C_d), 55.3 (OCH₃), 67.0 (C_f), 114.0 (C_i), 127.4 (C_g), 130.2 (C_h), 159.8 (C_j), 167.2 (C_e), 203.2 (C_c)

4-Methoxybenzyl 5-methyl-3-oxohexanoate (C27)

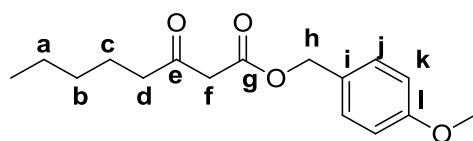


Yield : 66%
 Molecular formula : C₁₅H₂₀O₄
 MW : 264.32 g.mol⁻¹
 Colorless liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.91 (s, 3H_a), 0.93 (s, 3H_a), 2.12-2.17 (m, 1H_b), 2.39 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H_e), 3.45 (s, 2H_e), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 5.13 (s, 2H_f), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_i), 7.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_h)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 22.4 (C_a), 24.3 (C_b), 49.7 (C_e), 51.8 (C_e), 55.3 (OCH₃), 66.9 (C_g), 114.0 (C_j), 127.4 (C_h), 130.3 (C_i), 159.8 (C_k), 167.1 (C_f), 202.3 (C_d)

4-Methoxybenzyl 3-oxooctanoate (C28)

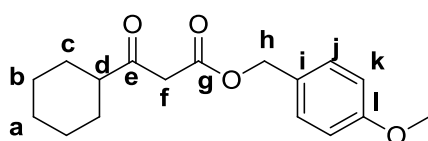


Yield : 70%
 Molecular formula : C₁₆H₂₂O₄
 MW : 278.34 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.24-1.30 (m, 4H_{a-b}), 1.56-1.60 (m, 2H_c), 2.50 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H_d), 3.47 (s, 2H_f), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 5.13 (s, 2H_h), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_k), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 13.9 (CH₃), 22.4 (C_{a/c}), 23.1 (C_{a/c}), 31.1 (C_b), 43.0 (C_d), 49.3 (C_f), 55.3 (OCH₃), 66.9 (C_h), 114.0 (C_k), 127.4 (C_i), 130.3 (C_j), 159.8 (C_l), 167.2 (C_g), 202.8 (C_e)

4-Methoxybenzyl 3-cyclohexyl-3-oxopropanoate (C29)

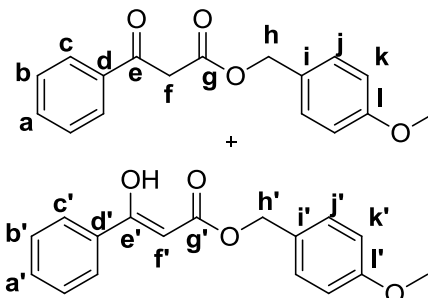


Yield : 65%
 Molecular formula : C₁₇H₂₂O₄
 MW : 290.35 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.20-1.30 (m, 5H_{a-b}), 1.66-1.69 (m, 1H_a), 1.77-1.84 (m, 4H_c), 2.37-2.44 (m, 1H_d), 3.52 (s, 2H_f), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 5.13 (s, 2H_h), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_k), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25.5 (C_b), 25.7 (C_a), 28.2 (C_e), 47.4 (C_d), 50.8 (C_f), 55.3 (OCH₃), 66.9 (C_h), 114.0 (C_k), 127.5 (C_i), 130.3 (C_j), 159.7 (C_l), 167.4 (C_g), 205.8 (C_c)

4-Methoxybenzyl 3-oxo-3-phenylpropanoate (C30)



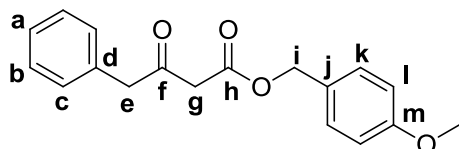
Yield : 51%
 Molecular formula : C₁₇H₁₆O₄
 MW : 284.31 g.mol⁻¹

Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 0.84H, OCH₃'), 4.04 (s, 2H_f), 5.16 (s, 2H_h), 5.21 (s, 0.52H, 2H_{h'}), 5.73 (s, 0.24H, 1H_{f'}), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_k), 6.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 0.55H, 2H_{k'}), 7.28 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j), 7.37-7.45 (m, 1.32H, 5H_{a'-b'-j'}), 7.47-7.50 (m, 2H_h), 7.59-7.63 (m, 1H_a), 7.78-7.80 (m, 0.52H, 2H_{c'}), 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j), 12.6 (s, 0.24H, 1OH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 46.0 (C_f), 55.3 (OCH₃), 67.1 (C_h), 113.9 (C_k), 128.5 (C_{b/c}), 128.6 (C_i), 128.8 (C_{b/c}), 130.2 (C_j), 133.7 (C_a), 135.9 (C_d), 159.7 (C_l), 167.4 (C_g), 192.4 (C_e)

4-Methoxybenzyl 3-oxo-4-phenylbutanoate (C31)

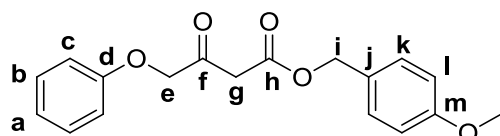


Yield : 66%
 Molecular formula : C₁₈H₁₈O₄
 MW : 298.33 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3.49 (s, 2H_g), 3.82 (s, 2H_e), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 5.11 (s, 2H_i), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_l), 7.18 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H_c), 7.30-7.34 (m, 5H_{a-b-k})

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 48.3 (C_{e/g}), 50.0 (C_{e/g}), 55.3 (OCH₃), 67.0 (C_i), 114.0 (C_l), 127.3 (C_{a/j}), 127.4 (C_{a/j}), 128.6 (C_{b/c}), 128.9 (C_{b/c}), 130.3 (C_k), 133.1 (C_d), 159.8 (C_m), 167.0 (C_h), 200.3 (C_f)

4-Methoxybenzyl 3-oxo-4-phenoxybutanoate (C32)

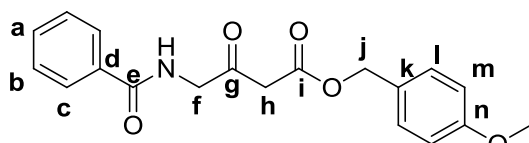


Yield : 75%
 Molecular formula : $C_{18}H_{18}O_5$
 MW : 314.33 $g \cdot mol^{-1}$
 Colorless liquid

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.69 (s, 2H_g), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 4.62 (s, 2H_e), 5.14 (s, 2H_i), 6.84-6.88 (m, 4H_c), 7.03 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H_a), 7.27-7.33 (m, 4H_{b-k})

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 46.2 (C_g), 55.3 (OCH₃), 67.2 (C_i), 72.4 (C_e), 114.0 (C_i), 114.5 (C_c), 122.0 (C_a), 127.2 (C_j), 129.7 (C_h), 130.3 (C_k), 157.3 (C_d), 159.8 (C_m), 166.7 (C_h), 200.5 (C_f)

4-Methoxybenzyl 4-benzamido-3-oxobutanoate (C33)

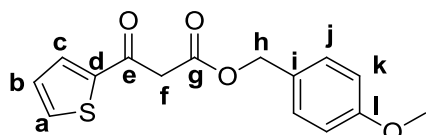


Yield : 50%
 Molecular formula : $C_{19}H_{19}NO_5$
 MW : 341.36 $g \cdot mol^{-1}$
 Yellow liquid

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.73 (s, 2H_h), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.20 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H_f), 5.06 (s, 2H_j), 6.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H_m), 7.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H_i), 7.47-7.51 (m, 3H_{a-b}), 7.87 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H_c), 8.86 (t, $J = 5.6$ Hz, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 46.6 (C_h), 49.3 (C_f), 55.3 (OCH₃), 66.2 (C_i), 114.0 (C_m), 127.5 (C_c), 127.8 (C_k), 128.6 (C_b), 130.2 (C_l), 131.7 (C_a), 133.8 (C_d), 159.4 (C_n), 166.7 (C_{e/i}), 167.1 (C_{e/i}), 200.2 (C_g)

4-Methoxybenzyl 3-oxo-3-(thiophen-2-yl)propanoate (C34)

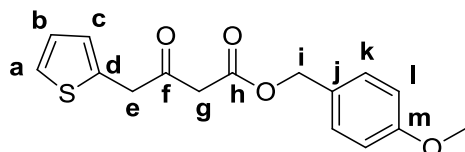


Yield : 60%
 Molecular formula : $C_{15}H_{14}O_4S$
 MW : 290.33 $g \cdot mol^{-1}$
 Yellow liquid

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 2H_f), 5.15 (s, 2H_h), 6.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H_k), 7.14 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H_b), 7.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H_j), 7.71 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H_{a-c})

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 46.5 (C_f), 55.3 (OCH₃), 67.2 (C_h), 113.9 (C_k), 127.4 (C_i), 128.3 (C_b), 130.2 (C_j), 133.2 (C_c), 134.9 (C_a), 143.2 (C_d), 159.7 (C_l), 166.9 (C_g), 184.7 (C_e)

4-Methoxybenzyl 3-oxo-4-(thiophen-2-yl)butanoate (C35)

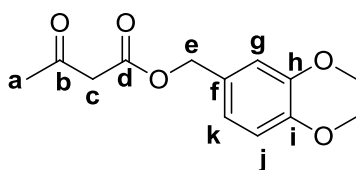


Yield : 62%
 Molecular formula : $C_{16}H_{16}O_4S$
 MW : 304.36 $g \cdot mol^{-1}$
 Yellow liquid

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.54 (s, 2H_g), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 4.02 (s, 2H_e), 5.12 (s, 2H_i), 6.88-6.93 (m, 3H_c), 6.98-7.00 (m, 1H_b), 7.25 (dd, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, 1H_a), 7.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H_k)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 43.6 (C_e), 47.9 (C_g), 55.3 (OCH₃), 67.1 (C_i), 114.0 (C_l), 125.6, 127.2, 127.3, 127.4, 130.2 (C_k), 134.1 (C_d), 159.8 (C_m), 166.9 (C_h), 199.0 (C_f)

3,4-dimethoxyphenethyl 3-oxobutanoate (C36)

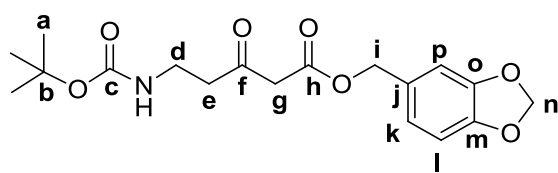


Yield : %
 Molecular formula : C₁₃H₁₆O₅
 MW : 252.26 g.mol⁻¹
 Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.24 (s, 3H_a), 3.48 (s, 2H_c), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 5.19 (s, 2H_e), 6.78-6.83 (m, 2H_{j-k}), 6.90 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H_g)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 30.3 (C_a), 50.3 (C_c), 56.0 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 62.8 (C_e), 111.8 (C_{g/j/k}), 114.4 (C_{g/j/k}), 115.9 (C_{g/j/k}), 124.7 (C_f), 151.9 (C_{h/i}), 153.7 (C_{h/i}), 167.2 (C_d), 200.7 (C_b)

Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl 5-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-oxopentanoate (C37)



Yield : 52%
 Molecular formula : C₁₈H₂₃NO₇
 MW : 365.38 g.mol⁻¹
 Yellow liquid
R_f :

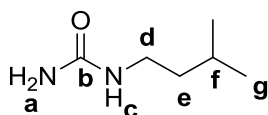
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (s, 9H_a), 2.77 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H_e), 3.38-3.40 (m, 2H_d), 3.50 (s, 2H_g), 4.98 (sl, 1H, NH), 5.09 (s, 2H_i), 5.99 (s, 2H_n), 6.80-6.87 (m, 3H_{k-l-p})

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 28.4 (C_a), 35.0 (C_d), 43.1 (C_e), 49.3 (C_g), 67.2 (C_i), 79.4 (C_b), 101.2 (C_n), 108.3 (C_{l/p}), 109.2 (C_{l/p}), 122.6 (C_k), 128.9 (C_j), 147.9 (C_{m-o}), 155.8 (C_c), 166.7 (C_f), 202.0 (C_f)

General procedure for the preparation of ureas U1-U6

Urea (9.6 mmol) was dissolved in 3 M aqueous HCl, then the amine (2.4 mmol) was added and the mixture was refluxed for 14 hours. The mixtures were cooled to 0 °C until white solid precipitated. Subsequent filtration and drying afforded monosubstituted ureas U1-U6 in moderate to high yields. In some cases, further purification by chromatography on silica gel was performed (cHex/AcOEt 1:9 to 0:10).

1-Isopentylurea (U1)



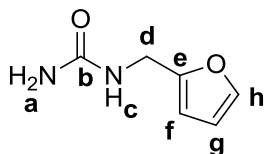
Yield : 38%
 Molecular formula : C₆H₁₄N₂O
 MW : 130.19 g.mol⁻¹
 White needles

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0.86 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H_g), 1.22-1.27 (m, 2H_e), 1.53-1.58 (m, 1H_f), 2.94-2.99 (m, 2H_d), 5.32 (sl, 2H_a), 5.84 (sl, 1H_c)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 22.9 (C_g), 25.5 (C_f), 37.8 (C_e), 39.5 (C_d), 159.1 (C_b)

MS : 131 *m/z* ([M+H]⁺)

1-(Furan-2-ylmethyl)urea (U2)



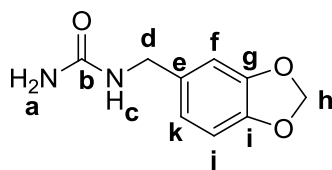
Yield : 38%
 Molecular formula : C₆H₈N₂O₂
 MW : 140.14 g.mol⁻¹
 Brown solid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 4.15 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H_a), 5.52 (sl, 2H_a), 6.18 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H_f), 6.32 (sl, 1H_e), 6.37 (dd, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 2.8 Hz, 1H_g), 7.55 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H_g)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 36.7 (C_d), 106.5 (C_f), 110.8 (C_g), 142.3 (C_h), 154.1 (C_e), 158.7 (C_b)

MS : 141 *m/z* ([M+H]⁺)

1-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)urea (U3)



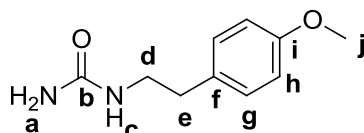
Yield : 84%
 Molecular formula : C₉H₁₀N₂O₃
 MW : 194.19 g.mol⁻¹
 Ochre solid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 4.07 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H_a), 5.49 (sl, 2H_a), 5.97 (s, 2H_h), 6.34 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H_e), 6.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_j), 6.80-6.85 (m, 3H_{f,k})

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 43.0 (C_d), 101.2 (C_h), 108.1 (C_{fj}), 108.4 (C_{fi}), 120.5 (C_k), 135.4 (C_e), 146.3 (C_{g/i}), 147.6 (C_{g/i}), 159.0 (C_b)

MS : 195 *m/z* ([M+H]⁺)

1-(4-Methoxyphenethyl)urea (U4)



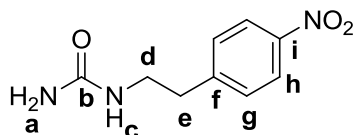
Yield : 57%
 Molecular formula : C₁₀H₁₄N₂O₂
 MW : 194.23 g.mol⁻¹
 White powder

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.60 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H_e), 3.12-3.17 (m, 2H_d), 3.72 (s, 3H_j), 5.41 (sl, 2H_a), 5.87 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H_e), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_h), 7.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_g)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 35.7 (C_e), 40.4 (C_d), 55.4 (C_j), 114.2 (C_h), 130.0 (C_g), 132.0 (C_f), 158.0 (C_b), 159.0 (C_i)

MS : 195 *m/z* ([M+H]⁺)

1-(4-Nitrophenethyl)urea (U5)



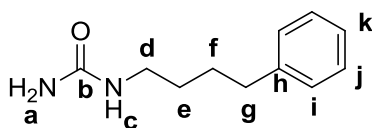
Yield : 84%
 Molecular formula : C₉H₁₁N₃O₃
 MW : 209.20 g.mol⁻¹
 Ochre solid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.82 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H_e), 3.23-3.28 (m, 2H_d), 5.44 (sl, 2H_a), 5.96 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H_e), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_h), 8.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_g)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 36.4 (C_e), 40.2 (C_d), 123.8 (C_h), 130.5 (C_g), 146.4 (C_{fi}), 148.8 (C_{fi}), 159.0 (C_b)

MS : 251 *m/z* ([M+H+CH₃CN]⁺)

1-(1-Phenylbutyl)urea (U6)



Yield : 60%
 Molecular formula : C₁₁H₁₆N₂O
 MW : 192.26 g.mol⁻¹
 White powder

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.33-1.40 (m, 2H_{e/f}), 1.50-1.56 (m, 2H_{e/f}), 2.57 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H_g), 2.94-2.99 (m, 2H_d), 5.33 (sl, 2H_a), 5.89 (sl, 1H_c), 7.15-7.20 (m, 3H_{i-k}), 7.25-7.29 (m, 2H_j)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 28.9 (C_f), 30.1 (C_e), 35.3 (C_g), 40.4 (C_d), 126.1 (C_k), 128.7 (C_i), 128.7 (C_j), 142.7 (C_h), 159.1 (C_b)

MS : 193 *m/z* ([M+H]⁺)

General procedure for the preparation of ITB₂ analogues

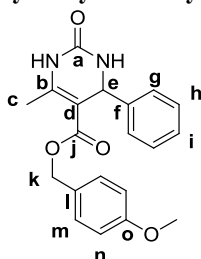
Method A (compounds 12-76, 78-101, 103-113, 122 and 126) :

β-Ketoester (0.50 mmol), aldehyde (0.60 mmol), urea (0.75 mmol) and Yb(OTf)₃ (5 mol%) were heated at 100 °C for 45 minutes. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature. Ethanol (2.5 mL) was then added and the resulting mixture was left to stand at 0–4 °C for 3 days. In most cases, the precipitate that was formed was collected by filtration. When the solid did not meet the purity standard of >95% (LC-MS), it was further chromatographed (SiO₂). In a few cases no precipitate was formed. Solvents and volatiles were then evaporated under reduced pressure and the resulting residue was purified by silica-gel chromatography to afford title compound.

Method B (compounds 114-121, 128-138 and 153) :

β-Ketoester (0.50 mmol), aldehyde (0.60 mmol), urea (0.75 mmol) and Zn(OTf)₂ (10 mol%) were dissolved in acetonitrile and refluxed for 2–16 h. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was chromatographed on silica gel or purified by preparative HPLC to afford title compound.

4-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (ITB₂)



Yield : 55%
 Molecular formula : C₂₀H₂₀N₂O₄
 MW : 352.38 g.mol⁻¹
 White solid
R_f : 0.24 (cHex/AcOEt 1/1)
M_p : 162-164 °C

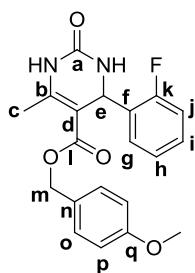
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.95 (s, 2H_k), 5.13 (s, 1H_e), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 7.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.15-7.20 (m, 2H), 7.24-7.30 (m, 3H_{h-i}), 7.74 (s, 1H, NH), 9.24 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.3 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_k), 99.4 (C_d), 114.1 (C_n), 126.7, 127.8, 128.8, 128.9, 130.0 (C_m), 145.1 (C_f), 149.4 (C_b), 152.5 (C_a), 159.4 (C_o), 165.6 (C_j)

HPLC : *t_R* = 14.9 min. **MS** : *m/z* 353 ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 351.1345 found 351.3161 ([M-H]⁻)

Compound ITB₂ (8 batches of 0.48 mg each) was applied to a 250 × 4.6 mm Chiralcel OD column (DAICEL) equilibrated with nHex/EtOH = 92/8. (*S*)-ITB₂ (1.70 mg, *t_R* = 23.9 min) and (*R*)-ITB₂ (1.85 mg, *t_R* = 28.3 min) were isolated and further HPLC analysis of separated enantiomers showed > 99% purity. (*S*)-ITB₂ and (*R*)-ITB₂ did not racemize after 5 months at -20 °C in 20 mM DMSO.

4-Methoxybenzyl 4-(2-fluorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (12)



Yield :	58%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ FN ₂ O ₄
MW :	370.37 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.32 (cHex/AcOEt 4/6)
M _p :	181-183 °C

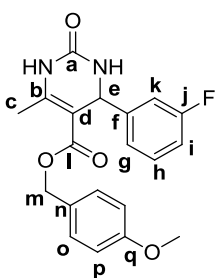
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H_c), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.89 (s, 2H_m), 5.43 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 6.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_p), 7.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_o), 7.10-7.14 (m, 2H_{g-h}), 7.18-7.22 (m, 1H_{ij}), 7.28-7.33 (m, 1H_{ij}), 7.71 (s, 1H, NH), 9.30 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 17.8 (C_c), 48.6 (C_e), 55.0 (OCH₃), 64.6 (C_m), 97.0 (C_d), 113.6 (C_p), 115.5 (d, *J* = 21.8 Hz, C_j), 124.5 (d, *J* = 3.2 Hz, C_g), 128.3 (C_n), 128.8 (d, *J* = 3.9 Hz, C_i), 129.3 (C_h), 129.4 (C_o), 131.3 (d, *J* = 13.7 Hz, C_f), 149.6 (C_b), 151.5 (C_a), 158.8 (C_q), 159.4 (d, *J* = 245.5 Hz, C_k), 164.8 (C_l)

RMN ¹⁹F (160 MHz, CFCl₃) δ -119.0

HPLC : t_R = 15.5 min. **MS** : *m/z* 371 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(3-fluorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (13)



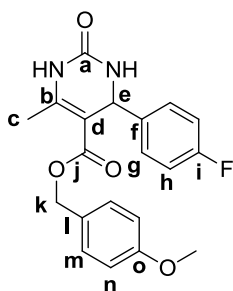
Yield :	58%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ FN ₂ O ₄
MW :	403.43 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.29 (cHex/AcOEt 4:6)
M _p :	173-174 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.26 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.93 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 4.99 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 5.15 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_p), 6.92 (m, 1H_g), 7.03-7.11 (m, 2H_{i-k}), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_o), 7.33-7.36 (m, 1H_h), 7.80 (s, 1H, NH), 9.31 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 53.9 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_m), 98.8 (C_d), 113.4 (d, *J* = 21.3 Hz, C_{i/k}), 114.1 (C_p), 114.5 (d, *J* = 20.9 Hz, C_{i/k}), 122.6 (d, *J* = 2.3 Hz, C_g), 128.7 (C_n), 130.0 (d, *J* = 8.0 Hz, C_h), 130.1 (C_o), 147.9 (d, *J* = 5.9 Hz, C_f), 150.0 (C_b), 152.4 (C_a), 159.4 (C_q), 162.5 (d, *J* = 242.6 Hz, C_j), 165.5 (C_l)

RMN ¹⁹F (160 MHz, CFCl₃) δ -113.1

HPLC : t_R = 15.0 min. **MS** : *m/z* 371 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4-fluorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (14)

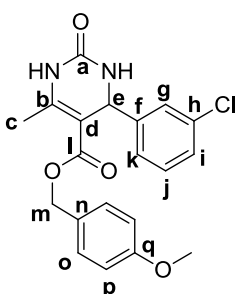
Yield :	87%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ FN ₂ O ₄
MW :	370.37 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.27 (cHex/AcOEt 1/1)
M _p :	172-175 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.93 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 4.98 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 5.13 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.09-7.14 (m, 4H_{g-m}), 7.18-7.22 (m, 2H_h), 7.76 (s, 1H, NH), 9.28 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 53.7 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_k), 99.2 (C_d), 114.1 (C_n), 115.5, 115.7, 128.7, 128.8, 130.0 (C_m), 141.3, 141.4, 149.6 (C_b), 152.3 (C_a), 159.4 (C_o), 165.5 (C_j)

RMN ¹⁹F (160 MHz, CFCl₃) δ -115.4

HPLC : t_R = 15.4 min. **MS** : *m/z* 371 ([M+H]⁺)

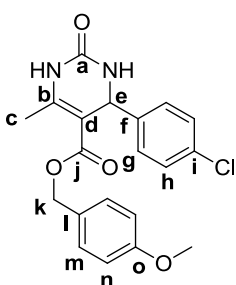
4-Methoxybenzyl 4-(3-chlorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (15)

Yield :	56%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₂ O ₄
MW :	386.83 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.26 (cHex/AcOEt 1/1)
M _p :	180-181 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.26 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.92 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 5.00 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 5.13 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_p), 7.12-7.15 (m, 4H_{j/k/o}), 7.32-7.35 (m, 2H_{g-i}), 7.78 (bs, 1H, NH), 9.30 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.0 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.3 (C_m), 98.7 (C_d), 114.1 (C_p), 125.3 (C_k), 126.7 (C_{g/i}), 127.7 (C_{g/i}), 128.7 (C_n), 130.1 (C_o), 131.0 (C_j), 133.4 (C_h), 147.5 (C_f), 150.0 (C_b), 152.3 (C_a), 159.4 (C_q), 165.4 (C_i)

HPLC : t_R = 16.9 min. **MS** : *m/z* 387 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (16)

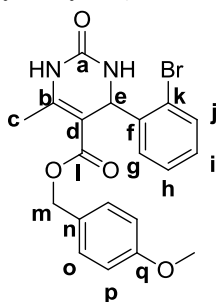
Yield :	53%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ ClN ₂ O ₄
MW :	386.83 g.mol ⁻¹
White solid	
R _f :	0.18 (cHex/AcOEt 1/1)
M _p :	189-191 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.91 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 4.98 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 5.12 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_g), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_h), 7.78 (s, 1H, NH), 9.29 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 53.8 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_k), 98.9 (C_d), 114.1 (C_n), 128.6, 128.7, 128.9, 130.0 (C_m), 132.3, 144.0 (C_f), 149.7 (C_b), 152.3 (C_a), 159.4 (C_o), 165.4 (C_j)

HPLC : t_R = 17.1 min. **MS** : *m/z* 387 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(2-bromophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (17)



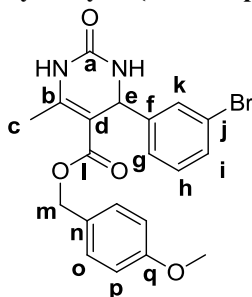
Yield :	38%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ BrN ₂ O ₄
MW :	431.28 g.mol ⁻¹
White powder	
Rf :	0.30 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	190-192 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.30 (s, 3H_c), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 4.85 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 4.90 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 5.61 (s, 1H_e), 6.78 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_p), 6.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_o), 7.18-7.38 (m, 3H_{g-h-i}), 7.54-7.56 (m, 1H_i), 7.68 (s, 1H, NH), 9.32 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.0 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_m), 98.2 (C_d), 114.1 (C_p), 117.0, 126.1, 128.7, 130.0 (C_o), 136.1 (C_f), 149.2 (C_b), 150.2 (C_k), 152.2 (C_a), 159.4 (C_q), 165.3 (C_i)

HPLC : t_R = 16.8 min. **MS** : *m/z* 472, 474 ([M+H+CH₃CN]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(3-bromophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (18)



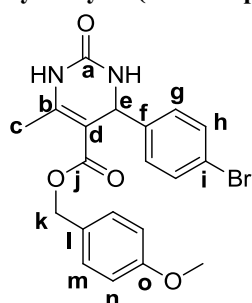
Yield :	61%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ BrN ₂ O ₄
MW :	431.28 g.mol ⁻¹
White powder	
Rf :	0.23 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	164-166 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.26 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.92 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 4.99 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 5.12 (s, 1H_e), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_p), 7.13 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_o), 7.19 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_g), 7.26-7.31 (m, 2H_{h-k}), 7.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_i), 7.78 (s, 1H, NH), 9.32 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.0 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.3 (C_m), 98.7 (C_d), 114.2 (C_p), 122.0, 125.7, 128.7, 129.6, 130.0 (C_o), 130.6, 131.3, 147.8 (C_b), 150.0 (C_j), 152.2 (C_a), 159.4 (C_q), 165.4 (C_i)

HPLC : t_R = 17.3 min. **MS** : *m/z* 472, 474 ([M+H+CH₃CN]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4-bromophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (19)



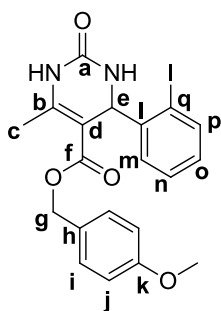
Yield :	80%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ BrN ₂ O ₄
MW :	431.28 g.mol ⁻¹
White solid	
Rf :	0.20 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	184-187 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.91 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_k), 4.98 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 5.12 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.11 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H_m), 7.13 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H_g), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_h), 7.78 (s, 1H, NH), 9.29 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 53.9 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_k), 98.9 (C_d), 114.1 (C_n), 120.8, 128.7, 129.0, 130.0 (C_m), 131.8, 144.4 (C_f), 149.8 (C_b), 152.2 (C_a), 159.3 (C_o), 165.4 (C_j)

HPLC : t_R = 17.6 min. **MS** : *m/z* 472, 474 ([M+H+CH₃CN]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(2-iodophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (20)



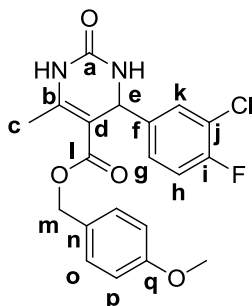
Yield :	45%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ IN ₂ O ₄
MW :	478.28 g.mol ⁻¹
Yellow powder	
R _f :	0.26 (cHex/AcOEt 4:6)
M _p :	195-198 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.29 (s, 3H_c), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 4.85 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 4.91 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.95 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H_e), 6.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_j), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_i), 7.00-7.04 (m, 1H_o), 7.25-7.27 (m, 1H_n), 7.36-7.39 (m, 1H_m), 7.64 (s, 1H, NH), 7.81 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H_p), 9.31 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 55.5 (OCH₃), 59.4 (C_e), 64.8 (C_g), 98.9 (C_d), 100.0 (C_q), 114.0 (C_j), 128.3, 128.9, 129.7 (C_i), 129.7, 129.9, 139.8 (C_p), 146.8 (C_b), 150.2 (C_l), 151.5 (C_a), 159.2 (C_k), 165.1 (C_f)

HPLC : t_R = 17.5 min. **MS** : *m/z* 479 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(3-chloro-4-fluorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (21)



Yield :	69%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₈ ClFN ₂ O ₄
MW :	404.82 g.mol ⁻¹
White solid	
R _f :	0.46 (cHex/AcOEt 35:65)
M _p :	193-195 °C

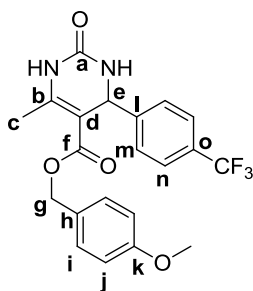
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.26 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.90 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 5.01 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 5.13 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_p), 7.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_o), 7.15-7.19 (m, 1H_h), 7.26 (dd, *J*₁ = 2.4 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, 1H_g), 7.32-7.37 (m, 1H_k), 7.78 (s, 1H, NH), 9.34 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 17.9 (C_c), 53.1 (C_e), 55.0 (OCH₃), 64.8 (C_m), 98.1 (C_d), 113.6 (C_p), 117.0 (d, *J* = 20.9 Hz, C_h), 119.1 (d, *J* = 17.7 Hz, C_j), 128.2 (C_{g/k}), 128.4 (C_n), 126.8 (d, *J* = 7.5 Hz, C_{g/k}), 129.6 (C_o), 142.5 (d, *J* = 3.7 Hz, C_f), 149.7 (C_b), 151.6 (C_a), 156.3 (d, *J* = 244.7 Hz, C_i), 159.0 (C_q), 164.9 (C_l)

RMN ¹⁹F (160 MHz, CFCl₃) δ -118.3

HPLC : t_R = 17.3 min. **MS** : *m/z* 405 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4-trifluoromethylphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (22)



Yield :	38%
Molecular formula :	C ₂₁ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄
MW :	420.38 g.mol ⁻¹
White powder	
Rf :	0.20 (cHex/AcOEt 4:6)
Mp :	204-206 °C

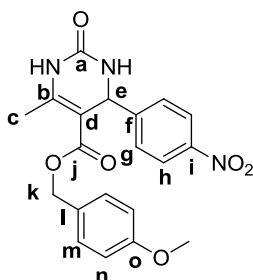
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H_c), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.91 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.01 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.22 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H_m), 7.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.83 (s, 1H, NH), 9.34 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.2 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_g), 98.6 (C_d), 114.1 (C_j), 125.9, 125.9, 127.6, 128.7, 130.0 (C_i), 149.5 (C_i), 150.1 (C_b), 152.2 (C_a), 159.4 (C_k), 165.4 (C_f)

RMN ¹⁹F (160 MHz, CFCl₃) δ - 60.8

HPLC : t_R = 18.2 min. **MS** : *m/z* 421 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4-nitroxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (23)



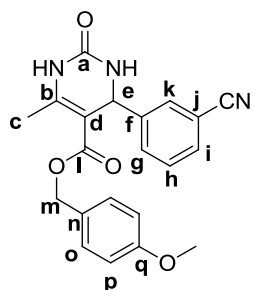
Yield :	54%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₆
MW :	397.38 g.mol ⁻¹
Yellow powder	
Rf :	0.39 (cHex/AcOEt 35:65)
Mp :	205-208 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H_c), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.91 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H_k), 5.04 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 5.46 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H_e), 6.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 7.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.34 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_g), 8.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_h), 8.26 (s, 1H, NH), 9.39 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.4 (C_c), 54.1 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_k), 98.3 (C_d), 114.1 (C_n), 124.2, 128.1, 128.6, 130.2 (C_m), 147.1 (C_b), 150.4 (C_f), 152.0 (C_{a/i}), 152.2 (C_{a/i}), 159.4 (C_o), 165.3 (C_j)

HPLC : t_R = 15.4 min. **MS** : *m/z* 439 ([M+H+CH₃CN]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(3-cyanophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (24)



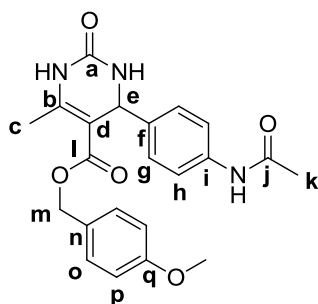
Yield :	35%
Molecular formula :	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₄
MW :	377.39 g.mol ⁻¹
White powder	
Rf :	0.11 (cHex/AcOEt 4:6)
Mp :	216-218 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.28 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.89 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 5.00 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 5.19 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_p), 7.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_o), 7.50-7.55 (m, 3H_{g-h-i}), 7.73 (s, 1H_k), 7.80 (s, 1H, NH), 9.36 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.1 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.3 (C_m), 98.2 (C_d), 111.7 (C_j), 114.1 (C_p), 119.1 (CN), 128.6 (C_n), 130.1 (C_o), 130.4 (C_{g-i-k}), 131.7 (C_{g-i-k}), 131.7 (C_{g-i-k}), 146.6 (C_f), 150.4 (C_b), 152.1 (C_a), 159.4 (C_q), 165.3 (C_i)

HPLC : t_R = 15.0 min. **MS** : *m/z* 419 ([M+H+CH₃CN]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4-acetamidophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (25)



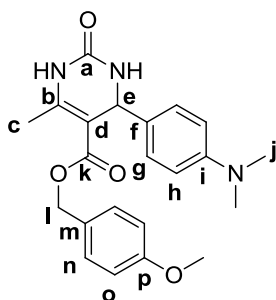
Yield :	59%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₅
MW :	409.44 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.21 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	252-255 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.05 (s, 3H_k), 2.28 (s, 3H_c), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 4.92 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 4.97 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 5.08 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_p), 7.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_{g/o}), 7.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_{g/o}), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_h), 7.71 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, NH), 9.95 (s, 1H, CONH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 24.4 (C_k), 53.9 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_m), 99.4 (C_d), 114.1 (C_p), 119.5, 127.1, 128.8, 130.0 (C_o), 138.8, 139.8 (C_f), 149.2 (C_b), 152.4 (C_a), 159.3 (C_q), 165.6 (C_i), 168.6 (C_j)

HPLC : t_R = 9.0 min. **MS** : *m/z* 410 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4-dimethylaminophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (26)



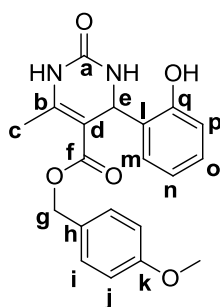
Yield :	21%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₄
MW :	395.45 g.mol ⁻¹
Yellow solid	
R _f :	0.12 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	191-193 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.23 (s, 3H_c), 2.85 (s, 6H_j), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.95 (s, 2H_f), 5.03 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_g), 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_o), 6.99 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_g), 7.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.60 (s, 1H, NH), 9.14 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 40.7 (C_j), 53.7 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.0 (C_f), 100.0 (C_d), 112.7, 114.1 (C_o), 127.4, 128.9, 129.9 (C_n), 133.0, 148.6 (C_b), 150.2 (C_i), 152.6 (C_a), 159.3 (C_p), 165.7 (C_k)

HPLC : t_R = 15.9 min. **MS** : *m/z* 396 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(2-hydroxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (27)



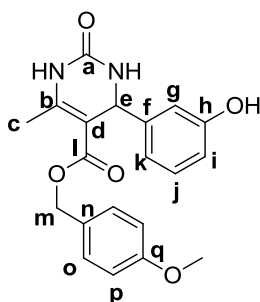
Yield :	38%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₅
MW :	368.38 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.26 (cHex/AcOEt 4:6)
Mp :	196-199 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.73 (s, 3H_c), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 4.47-4.49 (m, 1H_e), .10 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 5.15 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 10 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 5.15 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 6.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_p), 6.88-6.91 (m, 1H_n), 6.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_j), 7.17-7.20 (m, 2H_{m/o}), 7.24 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, NH), 7.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_j), 7.63 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 24.5 (C_c), 44.4 (C_e), 55.6 (OCH₃), 66.3 (C_g), 83.5 (C_d), 114.3 (C_j), 117.0 (C_p), 120.9 (C_n), 125.8 (C_i), 128.1, 129.1, 129.7, 130.2, 151.1 (C_b), 155.0 (C_a), 159.6 (C_k), 168.8 (C_f)

HPLC : t_R = 14.4 min. **MS** : *m/z* 369 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(3-hydroxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (28)



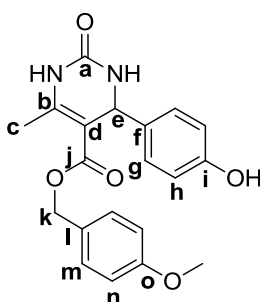
Yield :	64%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₅
MW :	368.38 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.12 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	87-90 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.24 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.97 (s, 2H_m), 5.06 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.62-6.65 (m, 3H_{g-i,k}), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_p), 7.07 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H_j), 7.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H_o), 7.68 (bs, 1H, NH), 9.19 (bs, 1H, NH), 9.36 (s, 1H, OH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.2 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_m), 99.4 (C_d), 113.5 (C_{g/i}), 114.1 (C_p), 114.7 (C_{g/i}), 117.4 (C_k), 128.8 (C_n), 129.8 (C_j), 129.9 (C_o), 146.5 (C_f), 149.2 (C_b), 152.5 (C_a), 157.9 (C_h), 159.3 (C_q), 165.6 (C_i)

HPLC : t_R = 10.7 min. **MS** : *m/z* 369 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4-hydroxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (29)



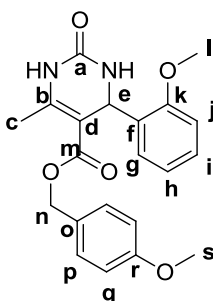
Yield :	56%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₅
MW :	368.38 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.31 (DCM/MeOH 95/5)
Mp :	192-193 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.23 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.92 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 4.96 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_k), 5.03 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H_g), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 6.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_h), 7.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.63 (s, 1H, NH), 9.16 (s, 1H, NH), 9.34 (s, 1H, OH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 53.8 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_k), 99.8 (C_d), 114.1 (C_n), 115.4, 127.9, 128.8, 130.0 (C_m), 135.7 (C_f), 148.8 (C_b), 152.5 (C_a), 157.0 (C_i), 159.3 (C_o), 165.7 (C_j)

HPLC : t_R = 10.0 min. **MS** : *m/z* 369 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(2-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (30)



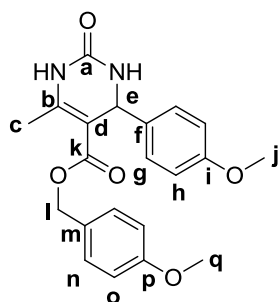
Yield :	68%
Molecular formula :	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅
MW :	382.41 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.40 (cHex/AcOEt 3:7)
Mp :	202-204 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.29 (s, 3H_c), 3.73 (s, 6H_{t,s}), 4.89 (s, 2H_n), 5.52 (s, 1H_e), 6.81-6.88 (m, 3H), 6.97-7.04 (m, 4H), 7.24-7.28 (m, 2H), 9.16 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 49.1 (C_e), 55.5 (C_{l/s}), 55.8 (C_{l/s}), 64.9 (C_n), 97.7 (C_d), 111.6 (C_j), 114.0 (C_q), 120.7 (C_h), 127.4, 128.7, 128.9, 129.5, 131.9 (C_f), 150.0 (C_b), 152.5 (C_a), 156.9 (C_k), 159.2 (C_r), 165.6 (C_m)

HPLC : t_R = 15.6 min. **MS** : *m/z* 383 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (31)



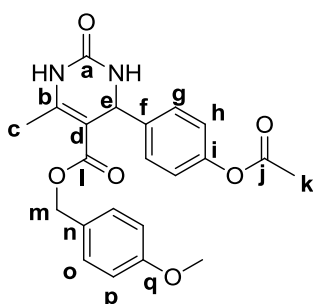
Yield :	61%
Molecular formula :	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅
MW :	382.41 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.24 (cHex/AcOEt 4:6)
Mp :	179-182 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.24 (s, 3H_c), 3.72 (s, 3H_j), 3.74 (s, 3H_q), 4.92 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_i), 4.96 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_i), 5.08 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_{h/o}), 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_{h/o}), 7.09 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_{g/n}), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_{g/n}), 7.66 (s, 1H, NH), 9.19 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 53.7 (C_e), 55.5 (C_j), 55.5 (C_q), 65.1 (C_i), 99.7 (C_d), 114.1 (C_o), 114.2 (C_h), 127.9 (C_m), 128.8 (C_g), 130.0 (C_n), 137.3 (C_f), 149.1 (C_b), 152.5 (C_a), 158.9 (C_{i/p}), 159.3 (C_{i/p}), 165.6 (C_k)

HPLC : t_R = 14.6 min. **MS** : *m/z* 383 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4-acetoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (32)



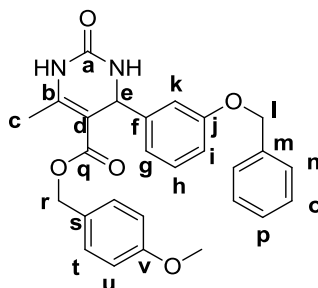
Yield :	50%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₆
MW :	410.42 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.12 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	146-148 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H_c), 2.27 (s, 3H_k), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.93 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 5.00 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 5.15 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_p), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_h), 7.11 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_o), 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_g), 7.77 (s, 1H, NH), 9.28 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 21.3 (C_k), 53.9 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_m), 99.2 (C_d), 114.1 (C_p), 122.3, 127.8, 128.8, 130.0, 142.6 (C_f), 149.6 (C_{b/i}), 150.0 (C_{b/i}), 152.4 (C_a), 159.3 (C_q), 165.5 (C_i), 169.7 (C_i)

HPLC : t_R = 14.2 min. **MS** : *m/z* 411 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(3-benzyloxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (33)



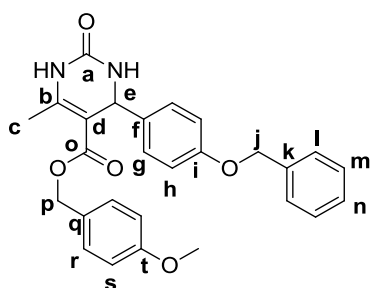
Yield :	52%
Molecular formula :	C ₂₇ H ₂₆ N ₂ O ₅
MW :	458.51 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.40 (DCM/MeOH 95/5)
Mp :	68-71 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.33 (s, 3H_c), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.94-5.04 (m, 4H_{i,r}), 5.35 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H_e), 6.24 (s, 1H, NH), 6.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_u), 6.87 (m, 3H_{o-p}), 7.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_t), 7.20-7.22 (m, 1H), 7.32-7.43 (m, 5H), 8.79 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 18.6 (C_c), 55.2 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.7 (C_r), 69.9 (C_i), 100.6 (C_d), 113.3 (C_i), 113.8 (C_u), 114.1, 119.1, 127.6 (C_n), 128.0, 128.1, 128.6 (C_o), 129.8 (C_t), 136.9 (C_m), 145.3 (C_f), 147.4 (C_b), 153.7 (C_a), 159.0 (C_{j/v}), 159.4 (C_{j/v}), 165.5 (C_q)

HPLC : t_R = 15.0 min. **MS** : *m/z* 459 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4-benzyloxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (34)



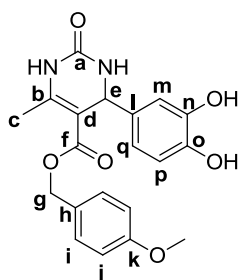
Yield :	45%
Molecular formula :	C ₂₇ H ₂₆ N ₂ O ₅
MW :	458.51 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.46 (cHex/AcOEt 3:7)
M _p :	198-199 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.24 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.92 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_p), 4.96 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_p), 5.08 (s, 3H_{e-j}), 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_s), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.09 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_g), 7.13 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_r), 7.31-7.45 (m, 5H_{i-m-n}), 7.66 (s, 1H, NH), 9.19 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_e), 53.7 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_p), 69.6 (C_j), 99.6 (C_d), 114.1 (C_s), 115.0 (C_h), 127.9, 128.1, 128.3, 128.8, 128.9 (C_g), 130.0 (C_r), 137.6 (C_f), 149.1 (C_b), 152.5 (C_a), 158.0 (C_i), 159.4 (C_t), 165.6 (C_o)

HPLC : t_R = 20.0 min. **MS** : *m/z* 459 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (35)



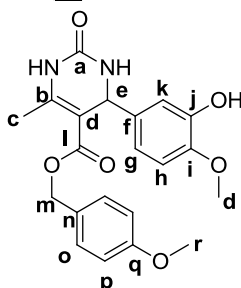
Yield :	16%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₆
MW :	384.38 g.mol ⁻¹
Brown crystals	
R _f :	0.63 (cHex/AcOEt 0:1)
M _p :	132-134 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.23 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.95 (s, 2H_g), 4.98 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H_e), 6.44 (dd, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H_q), 6.61-6.64 (m, 2H_{m-p}), 6.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j), 7.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.60 (s, 1H, NH), 8.80 (s, 1H, OH), 8.88 (s, 1H, OH), 9.14 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_e), 53.9 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.0 (C_g), 99.9 (C_d), 114.1 (C_i), 114.1, 115.6, 117.7, 128.9 (C_h), 129.8 (C_i), 136.2 (C_i), 145.0 (C_{n/o}), 145.5 (C_{n/o}), 148.6 (C_b), 152.5 (C_a), 159.3 (C_k), 165.7 (C_f)

HPLC : t_R = 8.2 min.. **MS** : *m/z* 385 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (36)



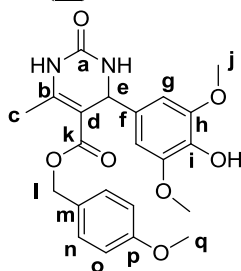
Yield :	53%
Molecular formula :	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₆
MW :	398.41 g.mol ⁻¹
Orange powder	
R _f :	0.21 (cHex/AcOEt 35:65)
M _p :	176-177 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.24 (s, 3H_c), 3.74 (s, 6H_{d-r}), 4.96 (s, 2H_m), 5.02 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.56 (dd, *J* = 1.8, 8.0 Hz, 1H_g), 6.68 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H_k), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H_h), 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_p), 7.13 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_o), 7.64 (s, 1H, NH), 8.95 (s, 1H, OH), 9.17 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_e), 53.9 (C_e), 55.5 (C_r), 56.1 (C_d), 65.0 (C_m), 99.7 (C_d), 112.5 (C_k), 114.1 (C_p), 114.1 (C_h), 117.4 (C_g), 128.9 (C_n), 129.9 (C_o), 137.9 (C_f), 146.8 (C_{ij}), 147.4 (C_{ij}), 148.9 (C_b), 152.5 (C_a), 159.3 (C_q), 165.7 (C_l)

HPLC : t_R = 10.5 min. **MS** : *m/z* 399 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (37)



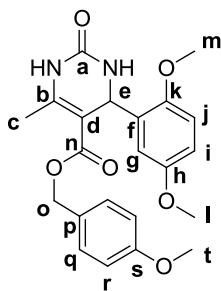
Yield :	47%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₇
MW :	413.38 g.mol ⁻¹
Brown powder	
R _f :	0.11 (cHex/AcOEt 35:65)
M _p :	187-190 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.26 (s, 3H_c), 3.61 (s, 6H_j), 3.74 (s, 3H_q), 4.94 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_i), 4.99 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_i), 5.07 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 6.41 (s, 2H_g), 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_o), 7.15 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 7.65 (s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, OH), 9.19 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 54.2 (C_e), 55.5 (C_q), 56.3 (C_j), 65.1 (C_i), 99.5 (C_d), 104.2 (C_g), 114.1 (C_o), 128.9 (C_m), 129.9 (C_n), 135.3, 135.4, 148.2 (C_h), 149.2 (C_b), 152.6 (C_a), 159.4 (C_p), 165.7 (C_k)

HPLC : t_R = 9.3 min. **MS** : *m/z* 429 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(2,5-dimethoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (38)



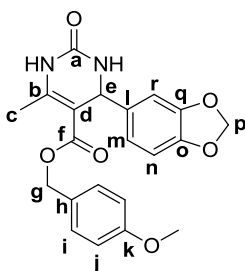
Yield :	56%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₆
MW :	412.44 g.mol ⁻¹
Yellow powder	
R _f :	0.14 (cHex/AcOEt 4/6)
M _p :	179-181 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.28 (s, 3H_c), 3.62 (s, 3H_{l/m}), 3.67 (s, 3H_{l/m}), 3.73 (s, 3H_t), 4.90 (s, 2H_o), 5.46 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 6.54 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_g), 6.80-6.82 (m, 3H_{i-r}), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H_j), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_q), 7.29 (s, 1H, NH), 9.19 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 49.4 (C_e), 55.5 (C_t), 55.7 (C_{l/m}), 56.3 (C_{l/m}), 64.9 (C_o), 97.6 (C_d), 112.5 (C_{ij}), 112.6 (C_{ij}), 114.0 (C_r), 114.4 (C_g), 128.9 (C_p), 129.5 (C_q), 133.1 (C_f), 150.0, 151.1, 152.5, 153.4, 159.2 (C_s), 165.5 (C_n)

HPLC : t_R = 15.0 min. **MS** : *m/z* 413 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (39)



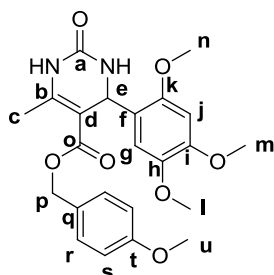
Yield :	63%
Molecular formula :	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₆
MW :	396.39 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.30 (cHex/AcOEt 4:6)
M _p :	188-190 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.92 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 4.96 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 5.06 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 5.98 (s, 2H_p), 6.64 (dd, *J*₁ = 1.2 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H_m), 6.68 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H_r), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_n), 6.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_j), 7.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_i), 7.68 (s, 1H, NH), 9.21 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.1 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_g), 99.4 (C_d), 101.4 (C_p), 107.2 (C_{n/r}), 108.5 (C_{n/r}), 114.1 (C_j), 119.8 (C_m), 128.8 (C_h), 130.0 (C_i), 139.2 (C_i), 146.8 (C_{o/q}), 147.7 (C_{o/q}), 149.4 (C_b), 152.4 (C_a), 159.4 (C_k), 165.6 (C_f)

HPLC : t_R = 14.3 min. **MS** : *m/z* 397 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (40)



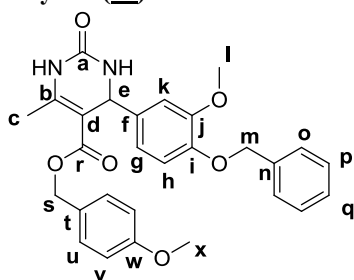
Yield :	52%
Molecular formula :	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₇
MW :	442.46 g.mol ⁻¹
Ochre solid	
R _f :	0.19 (cHex/AcOEt 35:65)
M _p :	182-185 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.28 (s, 3H_c), 3.52 (s, 3H_{l/m/n}), 3.70 (s, 3H_{l/m/n}), 3.73 (s, 3H_u), 3.78 (s, 3H_{l/m/n}), 4.90 (s, 2H_p), 5.40 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H_e), 6.55 (s, 1H_j), 6.66 (s, 1H_g), 6.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_s), 7.06 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_r), 7.23 (s, 1H, NH), 9.15 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 49.6 (C_e), 55.5 (C_u), 56.3 (C_{l/m/n}), 56.6 (C_{l/m/n}), 56.9 (C_{l/m/n}), 64.8 (C_p), 97.9 (C_j), 99.0 (C_d), 113.2 (C_g), 114.0 (C_s), 123.9 (C_t), 129.0 (C_q), 129.6 (C_r), 142.6 (C_h), 149.5 (C_{i/k}), 149.7 (C_{i/k}), 151.7 (C_b), 152.5 (C_a), 159.2 (C_t), 165.6 (C_o)

HPLC : t_R = 15.0 min. **MS :** *m/z* 443 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(3-methoxy-4-benzyloxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (41)



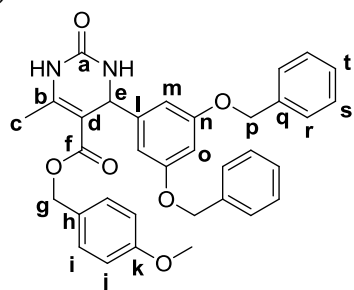
Yield :	51%
Molecular formula :	C ₂₈ H ₂₈ N ₂ O ₆
MW :	488.53 g.mol ⁻¹
Yellow solid	
R _f :	0.33 (cHex/AcOEt 4/6)
M _p :	172-173 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H_c), 3.62 (s, 3H_l), 3.73 (s, 3H_x), 4.96 (s, 2H_s), 5.05 (s, 2H_m), 5.09 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 6.67 (dd, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H_g), 6.78 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H_k), 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_v), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H_h), 7.15 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_u), 7.32-7.44 (m, 5H_{o-p-q}), 7.68 (s, 1H, NH), 9.21 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 53.9 (C_e), 55.5 (C_{l/x}), 55.8 (C_{l/x}), 65.1 (C_s), 70.4 (C_m), 99.4 (C_d), 111.2 (C_g), 113.9 (C_k), 114.1 (C_v), 118.3 (C_h), 128.2, 128.3 (C_p), 128.9 (C_u), 130.0 (C_o), 137.6 (C_{f/n}), 138.1 (C_{f/n}), 147.4 (C_i), 149.2 (C_i), 149.3 (C_b), 152.6 (C_a), 159.4 (C_w), 165.7 (C_r)

HPLC : t_R = 15.0 min. **MS :** *m/z* 530 ([M+H+CH₃CN]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(3,5-dibenzyloxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (42)



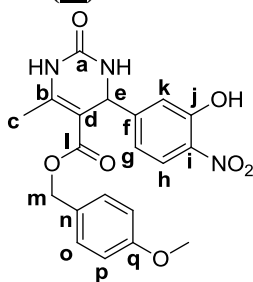
Yield :	36%
Molecular formula :	C ₃₄ H ₃₂ N ₂ O ₆
MW :	564.63 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.50 (cHex/AcOEt 1/1)
M _p :	179-182 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.24 (s, 3H_c), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 4.92-4.99 (m, 6H_{g-p}), 5.08 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 6.42 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H_m), 6.57-6.58 (m, 1H_o), 6.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_j), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.33-7.41 (m, 10H_{r-t}), 7.72 (s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.2 (C_e), 55.4 (OCH₃), 65.2 (C_g), 69.7 (C_p), 99.0 (C_d), 100.6 (C_o), 105.9 (C_m), 114.1 (C_j), 128.3 (C_r), 128.3 (C_t), 128.8 (C_h), 128.9 (C_s), 130.0 (C_i), 137.3 (C_q), 149.2 (C_i), 149.7 (C_b), 152.5 (C_a), 159.3 (C_k), 159.9 (C_n), 165.6 (C_j)

HPLC : t_R = 23.9 min. **MS :** *m/z* 565 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl
carboxylate (43)



4-(3-hydroxy-4-nitrophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-

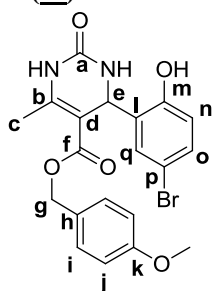
Yield :	12%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₇
MW :	413.38 g.mol ⁻¹
Yellow powder	
R _f :	0.39 (cHex/AcOEt 35:65)
M _p :	228-231 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.26 (s, 3H_c), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.93 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 5.01 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 5.13 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 6.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H_g), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_p), 6.95 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H_k), 7.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_o), 7.81-7.83 (s, 2H, 1H_h + NH), 9.35 (s, 1H, NH), 10.96 (bs, 1H, OH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 54.4 (C_e), 55.5 (OCH₃), 64.9 (C_m), 98.3 (C_d), 114.0 (C_p), 122.9 (C_g), 128.8, 128.9, 129.1, 129.7, 129.9 (C_o), 133.2 (C_j), 143.6 (C_f), 150.4 (C_b), 151.7 (C_a), 159.2 (C_q), 165.2 (C_i)

HPLC : t_R = 14.7 min. **MS** : *m/z* 414 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl
carboxylate (44)



4-(5-bromo-2-hydroxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-

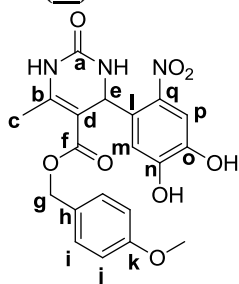
Yield :	29%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ BrN ₂ O ₅
MW :	447.28 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.21 (cHex/AcOEt 4:6)
M _p :	149-152 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.73 (s, 3H_c), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 4.54 (dd, *J*₁ = 3.2 Hz, *J*₂ = 4.0 Hz, 1H_e), 5.10 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.14 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 6.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H_n), 6.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_j), 7.22 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, NH), 7.33-7.38 (m, 4H_{i-o,q}), 7.72 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 49.9 (C_e), 55.5 (OCH₃), 64.9 (C_g), 97.1 (C_d), 110.2 (C_p), 114.1 (C_j), 118.2 (C_o), 128.9 (C_h), 129.6 (C_k), 130.3, 131.4, 132.7, 150.1 (C_b), 152.4 (C_a), 154.7 (C_m), 159.2 (C_k), 165.5 (C_f)

HPLC : t_R = 17.5 min.. **MS** : *m/z* 448, 450 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl
carboxylate (45)



4-(3,4-dihydroxy-6-nitrophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-

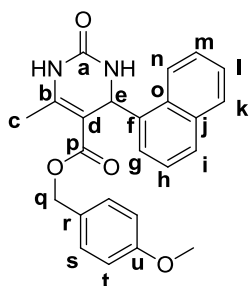
Yield :	37%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₈
MW :	429.38 g.mol ⁻¹
Yellow powder	
R _f :	0.26 (DCM/MeOH 95/5)
M _p :	220-223 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.30 (s, 3H_c), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 4.81 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 4.85 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 5.95 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H_e), 6.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_j), 6.82 (s, 1H_m), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_i), 7.38-7.41 (m, 1H_p, 1H, NH), 9.35 (s, 1H, NH), 9.85-10.55 (bs, 2H, OH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 49.6 (C_e), 55.5 (OCH₃), 64.9 (C_g), 98.3 (C_d), 112.2 (C_p), 114.0 (C_j), 114.8 (C_m), 128.8 (C_h), 129.4 (C_i), 132.9 (C_l), 138.8 (C_q), 145.2 (C_b), 150.2 (C_o), 151.8 (C_n), 152.0 (C_a), 159.2 (C_k), 165.1 (C_f)

HPLC : t_R = 10.0 min. **MS** : *m/z* 430 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-4-(1-naphtyl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**46**)



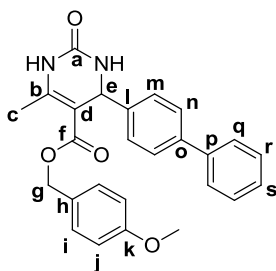
Yield :	48%
Molecular formula :	C ₂₄ H ₂₂ N ₂ O ₄
MW :	402.44 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.20 (cHex/AcOEt 4:6)
M _p :	250-252 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.37 (s, 3H_c), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 4.79 (s, 2H_q), 6.07 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 6.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_t), 6.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_s), 7.39 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H_g), 7.45-7.54 (m, 3H), 7.77 (s, 1H, NH), 7.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_i), 7.95-7.98 (m, 1H), 8.23-8.25 (m, 1H_n), 9.30 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 50.1 (C_e), 55.4 (OCH₃), 64.9 (C_q), 99.1 (C_d), 113.8 (C_t), 124.0, 124.5, 126.1, 126.1, 126.5, 128.4, 128.6, 128.9, 129.4 (C_s), 130.5 (C_{j/o}), 134.0 (C_{j/o}), 140.5 (C_f), 149.9 (C_b), 152.0 (C_a), 159.1 (C_u), 165.5 (C_p)

HPLC : t_R = 17.5 min. **MS** : *m/z* 403 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**47**)



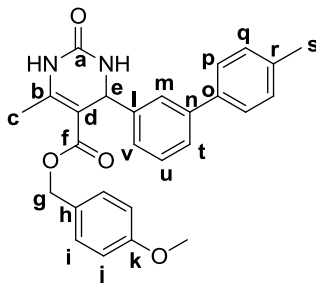
Yield :	47%
Molecular formula :	C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₄
MW :	428.48 g.mol ⁻¹
Pale yellow powder	
R _f :	0.49 (cHex/AcOEt 35:65)
M _p :	228-231 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H_c), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 4.94 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.00 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.19 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j), 7.13 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_i), 7.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H_n), 7.34-7.38 (m, 1H_s), 7.45-7.49 (m, 2H_r), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.64 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H_q), 7.78 (s, 1H, NH), 9.28 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.1 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_g), 99.3 (C_d), 114.1 (C_i), 127.1, 127.2, 127.3, 127.9, 128.8, 129.4, 130.0 (C_i), 139.7 (C_{o/p}), 140.3 (C_{o/p}), 144.3 (C_l), 149.5 (C_b), 152.5 (C_a), 159.3 (C_k), 165.6 (C_f)

HPLC : t_R = 19.8 min. **MS** : *m/z* 429 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(4'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**48**)

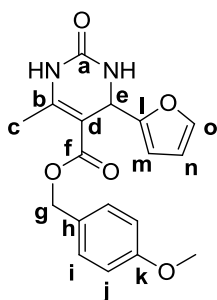


Yield :	34%
Molecular formula :	C ₂₇ H ₂₆ N ₂ O ₄
MW :	442.51 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.53 (cHex/AcOEt 1/1)
M _p :	149-152 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.28 (s, 3H_c), 2.35 (s, 3H_s), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 4.92 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 4.97 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 5.21 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 6.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_j), 7.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.17 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_v), 7.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H_q), 7.36-7.41 (m, 4H_{m-p-u}), 7.51 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_t), 7.79 (s, 1H, NH), 9.28 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 21.1 (C_s), 54.5 (C_e), 55.4 (OCH₃), 65.2 (C_g), 99.3 (C_d), 114.1 (C_j), 125.2, 125.2, 125.9, 126.9 (C_p), 128.7, 129.6, 129.9 (C_q), 130.0 (C_i), 137.2 (C_{n/r}), 137.7 (C_{n/r}), 140.6 (C_o), 145.8 (C_l), 149.6 (C_b), 152.5 (C_a), 159.3 (C_k), 165.6 (C_f)

HPLC : t_R = 21.3 min.. **MS** : *m/z* 443 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(furan-2-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**49**)

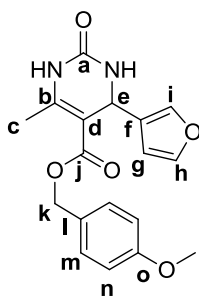
Yield :	40%
Molecular formula :	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₅
MW :	342.35 g.mol ⁻¹
Ochre powder	
R _f :	0.26 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	158-159 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.23 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.99 (s, 2H_g), 5.20 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.04 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_m), 6.35 (dd, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 3.2 Hz, 1H_n), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j), 7.20 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.55 (s, 1H_o), 7.76 (s, 1H, NH), 9.29 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 48.1 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_g), 96.9 (C_d), 105.8 (C_m), 110.8 (C_n), 114.2 (C_j), 128.9 (C_h), 129.9 (C_i), 142.6 (C_o), 150.4 (C_b), 152.8 (C_a), 156.3 (C_f), 159.4 (C_k), 165.5 (C_f)

HPLC : t_R = 13.1 min. **MS** : *m/z* 343 ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 341.1137 found 341.1141 ([M-H]⁻)

Compound **49** (10 batches of 0.36 mg each) was applied to a 250 × 4.6 mm Chiralcel OD column (DAICEL) equilibrated with nHex/EtOH = 90/10. (*S*)-**49** (1.64 mg, t_R = 27.6 min) and (*R*)-**49** (1.65 mg, t_R = 30.4 min) were isolated and further HPLC analysis of separated enantiomers showed > 99% purity. (*S*)-**49** and (*R*)-**49** did not racemize after 4 months at -20 °C in 20 mM DMSO.

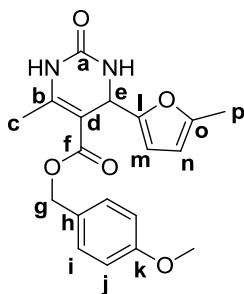
4-Methoxybenzyl 4-(furan-3-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**50**)

Yield :	72%
Molecular formula :	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₅
MW :	342.35 g.mol ⁻¹
Beige solid	
R _f :	0.47 (cHex/AcOEt 35:65)
Mp :	157-159 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.21 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.03 (s, 2H_k), 5.08 (s, 1H_e), 6.30 (s, 1H_g), 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.25 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_m), 7.30 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.66 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2, 46.3, 55.5, 65.2, 99.1, 109.5, 114.2, 128.9, 129.4, 130.1, 139.0, 144.0, 149.6, 153.1, 159.4, 165.5

HPLC : t_R = 12.9 min. **MS** : *m/z* 343 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-4-(5-methylfuran-2-yl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**51**)

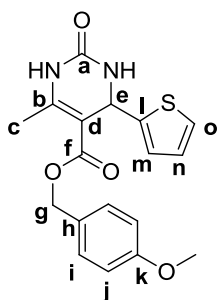
Yield :	52%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₁₉ N ₂ O ₅
MW :	356.37 g.mol ⁻¹
Ochre powder	
R _f :	0.29 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	157-159 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.20 (s, 3H_p), 2.23 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.97 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.01 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 5.13 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 5.88 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_m), 5.94 (m, 1H_n), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j), 7.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_i), 7.72 (s, 1H_o), 7.76 (s, 1H, NH), 9.24 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 13.8 (C_p), 18.2 (C_c), 48.2 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_g), 97.1 (C_d), 106.5 (C_{m/n}), 106.8 (C_{m/n}), 114.2 (C_j), 129.0 (C_h), 129.9 (C_i), 150.2 (C_b), 151.1 (C_a), 152.7 (C_{f/o}), 154.7 (C_{f/o}), 159.4 (C_k), 165.3 (C_f)

HPLC : t_R = 12.9 min. **MS** : *m/z* 357 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-(thiophen-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (52)



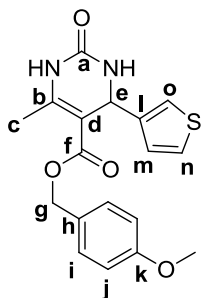
Yield :	59%
Molecular formula :	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₄ S
MW :	358.41 g.mol ⁻¹
Ochre powder	
R _f :	0.32 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	152-154 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.23 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.02 (s, 2H_g), 5.40 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_e), 6.84 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_m), 6.89 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H_j), 6.91-6.94 (m, 1H_n), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.35 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H_o), 7.90 (s, 1H, NH), 9.35 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 49.7 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.3 (C_g), 99.9 (C_d), 114.2 (C_j), 124.0 (C_o), 125.1 (C_{m/n}), 127.1 (C_{m/n}), 128.8 (C_h), 130.0 (C_i), 149.2 (C_b), 149.7 (C_i), 152.6 (C_a), 159.4 (C_k), 165.3 (C_f)

HPLC : t_R = 14.6 min. **MS** : *m/z* 359 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-(thiophen-3-yl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (53)



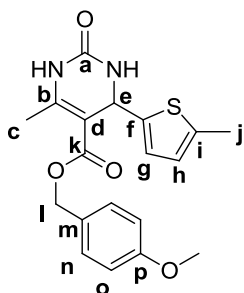
Yield :	70%
Molecular formula :	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₄ S
MW :	358.41 g.mol ⁻¹
Ochre powder	
R _f :	0.26 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	156-158 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.22 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.99 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.03 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 5.20 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_e), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j), 6.95 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H_m), 7.09 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H_o), 7.20 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.45 (dd, *J*₁ = 2.8 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, 1H_n), 7.76 (s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 49.8 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_g), 99.6 (C_d), 114.2 (C_j), 121.3 (C_o), 126.6 (C_{m/n}), 127.1 (C_{m/n}), 128.9 (C_h), 130.0 (C_i), 146.1 (C_i), 149.5 (C_b), 153.0 (C_a), 159.4 (C_k), 165.6 (C_f)

HPLC : t_R = 14.3 min. **MS** : *m/z* 359 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-4-(5-methylthiophen-2-yl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (54)



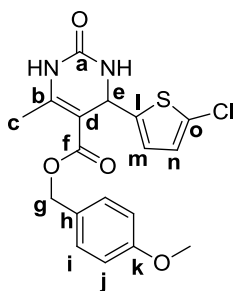
Yield :	56%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₄ S
MW :	372.44 g.mol ⁻¹
Brown powder	
R _f :	0.24 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	174-175 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.21 (s, 3H_c), 2.36 (s, 3H_j), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.99 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_l), 5.03 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_l), 5.30 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.59 (m, 2H_{g-h}), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_o), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.84 (s, 1H, NH), 9.33 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 15.4 (C_j), 18.2 (C_c), 49.9 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_i), 99.9 (C_d), 114.2 (C_o), 123.8 (C_h), 125.1 (C_g), 128.8 (C_m), 130.1 (C_n), 138.4 (C_i), 146.6 (C_f), 149.5 (C_b), 152.6 (C_a), 159.4 (C_p), 165.3 (C_k)

HPLC : t_R = 16.0 min. **MS** : *m/z* 373 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(5-chlorothiophen-2-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (55)



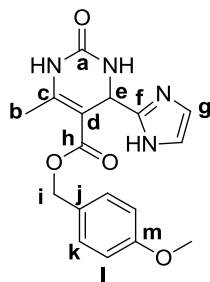
Yield :	34%
Molecular formula :	C ₁₈ H ₁₇ ClN ₂ O ₄ S
MW :	392.86 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.23 (cHex/AcOEt 1/1)
M _p :	146-149 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.32 (s, 3H_c), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 5.05 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.10 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.55 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.47 (s, 1H, NH), 6.65 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H_{m/n}), 6.69 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_{m/n}), 6.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_i), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 8.57 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 18.2 (C_c), 50.0 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.4 (C_g), 99.2 (C_d), 114.2 (C_j), 123.8 (C_m), 126.8, 127.1, 128.7 (C_h), 130.2 (C_i), 148.1 (C_b), 150.2 (C_l), 152.4 (C_a), 159.5 (C_k), 165.1 (C_f)

HPLC : t_R = 17.2 min. **MS** : *m/z* 393 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(imidazol-2-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (56)



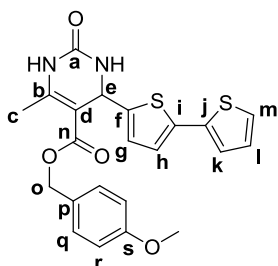
Yield :	18%
Molecular formula :	C ₁₇ H ₁₈ N ₄ O ₄
MW :	342.35 g.mol ⁻¹
Ochre solid	
R _f :	0.26 (DCM/MeOH 95/5)
M _p :	200-202 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.23 (s, 3H_b), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.97 (s, 2H_i), 5.24 (s, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_i), 6.88 (bs, 2H_g), 7.11 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_k), 7.61 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, NH), 11.68 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 18.5 (C_b), 48.9 (C_e), 55.5 (OCH₃), 64.9 (C_i), 96.8 (C_d), 114.1 (C_j), 115.0 (C_g), 129.1 (C_j), 129.6 (C_k), 149.5 (C_f), 150.4 (C_c), 152.4 (C_a), 159.2 (C_m), 165.5 (C_h)

HPLC : t_R = 13.1 min. **MS** : *m/z* 343 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-([2,2'-bithiophen]-5-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (57)



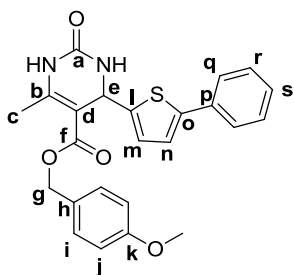
Yield :	18%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₄ S ₂
MW :	440.54 g.mol ⁻¹
Ochre powder	
R _f :	0.23 (cHex/AcOEt 1/1)
M _p :	197-199 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.24 (s, 3H_c), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 5.02 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_o), 5.08 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_o), 5.38 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_e), 6.77 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_g), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_r), 7.05-7.09 (m, 2H_h), 7.20-7.22 (m, 1H_i), 7.23 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_q), 7.48 (dd, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 5.2 Hz, 1H_m), 7.96 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 18.2 (C_c), 49.9 (C_e), 55.4 (OCH₃), 65.3 (C_o), 99.5 (C_d), 114.1 (C_r), 123.8, 124.2, 125.1, 125.7, 128.7, 128.8, 130.2 (C_q), 135.6, 136.9, 148.3, 149.9 (C_b), 152.5 (C_a), 159.4 (C_s), 165.2 (C_n)

HPLC : t_R = 19.0 min. **MS** : *m/z* 441 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-(5-phenylthiophen-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (58)



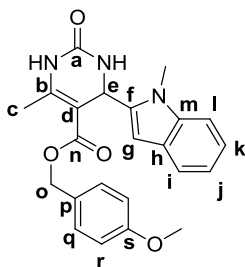
Yield :	10%
Molecular formula :	C ₂₄ H ₂₂ N ₂ O ₄ S
MW :	434.51 g.mol ⁻¹
Yellow powder	
R _f :	Degradation
M _p :	211-214 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H_c), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 5.02 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 5.09 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.41 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.83 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_m), 6.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_j), 7.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.28-7.31 (m, 2H_{n-s}), 7.37-7.41 (m, 2H_r), 7.55 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H_q), 7.96 (s, 1H, NH), 9.41 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_e), 50.0 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.3 (C_g), 99.6 (C_d), 114.1 (C_j), 123.5 (C_{m/n}), 125.3 (C_{m/n}), 125.5 (C_q), 128.0, 128.8, 129.5 (C_r), 130.2 (C_i), 134.1 (C_p), 142.3 (C_o), 148.7 (C_b), 149.9 (C_l), 152.5 (C_a), 159.4 (C_k), 165.2 (C_f)

HPLC : t_R = 19.6 min.. **MS :** *m/z* 435 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-4-(1-methyl-1H-indol-2-yl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (59)



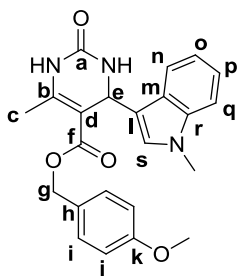
Yield :	12%
Molecular formula :	C ₂₃ H ₂₁ N ₃ O ₄
MW :	405.45 g.mol ⁻¹
Ochre solid	
R _f :	0.12 (cHex/AcOEt 1/1)
M _p :	236-238 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.35 (s, 3H_c), 3.66 (s, 3H, NCH₃), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 4.84 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_o), 4.94 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_o), 5.46 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.23 (s, 1H_g), 6.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_r), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_q), 7.01 (m, 1H), 7.14 (m, 1H), 7.42-7.49 (m, 2H_{k-l}), 7.89 (s, 1H, NH), 9.34 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.1 (C_e), 29.7 (NCH₃), 46.5 (C_e), 55.4 (OCH₃), 64.9 (C_o), 98.2 (C_{d/g}), 99.0 (C_{d/g}), 110.3 (C_i), 113.9 (C_r), 119.6 (C_{i/j/k}), 120.6 (C_{i/j/k}), 121.5 (C_{i/j/k}), 127.3 (C_h), 128.7 (C_p), 129.4 (C_q), 137.4 (C_m), 143.2 (C_f), 149.9 (C_b), 152.2 (C_a), 159.1 (C_s), 165.3 (C_n)

HPLC : t_R = 17.3 min. **MS :** *m/z* 406 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (60)



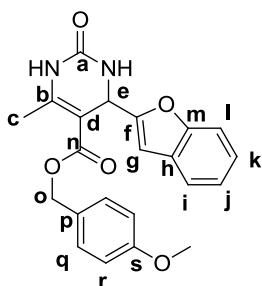
Yield :	20%
Molecular formula :	C ₂₃ H ₂₃ N ₃ O ₄
MW :	405.45 g.mol ⁻¹
Orange powder	
R _f :	0.58 (cHex/AcOEt 1/1)
M _p :	188-190 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H_c), 3.69 (s, 3H, NCH₃), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.92 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 4.96 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 5.46 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j), 6.96 (s, 1H_s), 6.99-7.02 (m, 1H_o), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.13-7.16 (m, 1H_p), 7.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 9.21 (s, 1H)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_e), 32.7 (NCH₃), 47.4 (C_e), 55.5 (OCH₃), 64.9 (C_g), 99.5 (C_d), 110.2 (C_q), 114.0 (C_j), 114.6, 117.9, 119.2, 119.7, 121.6, 125.8, 127.6 (C_h), 129.9 (C_i), 137.4 (C_r), 148.5 (C_b), 152.8 (C_a), 159.3 (C_k), 165.7 (C_f)

HPLC : t_R = 16.1 min. **MS :** *m/z* 406 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-(benzofuran-2-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**61**)



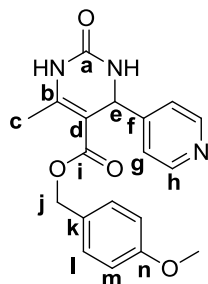
Yield :	27%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₅
MW :	392.40 g.mol ⁻¹
White powder	
Rf :	0.43 (cHex/AcOEt 4:6)
Mp :	174-175 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.31 (s, 3H_c), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.97 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_b), 5.05 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_b), 5.37 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.55 (s, 1H_g), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_r), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_q), 7.25-7.33 (m, 2H_{j-k}), 7.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_i), 7.60 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H_i), 7.98 (s, 1H, NH), 9.44 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 48.7 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_o), 96.3 (C_d), 102.7 (C_g), 111.6 (C_i), 114.1 (C_r), 121.6, 123.3, 124.7, 128.3, 128.8, 130.0 (C_q), 151.0 (C_b), 152.6 (C_a), 154.5 (C_f), 159.0 (C_m), 159.4 (C_s), 165.2 (C_n)

HPLC : t_R = 16.9 min. **MS** : *m/z* 393 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-(4-pyridin-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**62**)



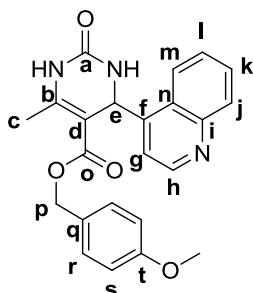
Yield :	19%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₄
MW :	353.37 g.mol ⁻¹
Orange powder	
Rf :	0.34 (DCM/MeOH 95/5)
Mp :	158-161 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.94 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_j), 4.99 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_j), 5.13 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_e), 6.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.15-7.18 (m, 4H_{g-i}), 7.87 (s, 1H, NH), 8.47 (s, 1H_h), 8.48 (s, 1H_h), 9.37 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 53.4 (C_e), 55.4 (OCH₃), 65.3 (C_j), 98.1 (C_d), 114.2 (C_m), 121.7 (C_g), 128.7 (C_k), 130.1 (C_i), 150.3 (C_h), 150.5 (C_h), 152.4 (C_b), 153.0 (C_a), 159.4 (C_n), 165.4 (C_i)

HPLC : t_R = 8.9 min. **MS** : *m/z* 354 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-(4-quinolin-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**63**)



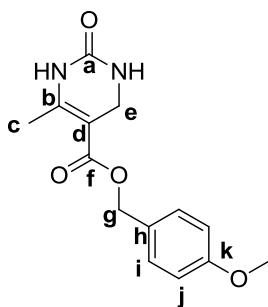
Yield :	20%
Molecular formula :	C ₂₃ H ₂₁ N ₃ O ₄
MW :	403.43 g.mol ⁻¹
Ochre powder	
Rf :	0.34 (DCM/MeOH 95/5)
Mp :	202-204 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.38 (s, 3H_c), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 4.75 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_p), 4.80 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_p), 6.06 (s, 1H_e), 6.63 (d, *J* = 8 Hz, 2H_s), 6.76 (d, *J* = 8 Hz, 2H_r), 7.32 (d, *J* = 4 Hz, 1H_g), 7.57-7.59 (m, 1H), 7.75-7.77 (m, 1H), 7.89 (s, 1H, NH), 8.05 (d, *J* = 8 Hz, 1H_{j/m}), 8.28 (d, *J* = 8 Hz, 1H_{j/m}), 8.84 (d, *J* = 4 Hz, 1H_h), 9.42 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 49.7 (C_e), 55.4 (OCH₃), 65.1 (C_p), 98.0 (C_d), 113.8 (C_s), 119.2, 124.3, 125.5, 127.1, 128.3, 129.5, 129.7, 129.9 (C_r), 148.3 (C_f), 149.7 (C_i), 150.8 (C_h), 151.1 (C_b), 151.8 (C_a), 159.1 (C_t), 165.3 (C_o)

HPLC : t_R = 11.1 min. **MS** : *m/z* 404 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (64)



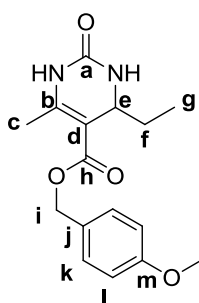
Yield : 26%
Molecular formula : C₁₄H₁₆N₂O₄
MW : 276.29 g.mol⁻¹

White powder

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.15 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 2H_e), 5.01 (s, 2H_g), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_j), 7.02 (bs, 1H, NH), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 8.90 (bs, 1H, NH)

HPLC : t_R = 9.7 min. **MS** : *m/z* 277 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-ethyl-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (65)



Yield : 13%
Molecular formula : C₁₆H₂₀N₂O₄
MW : 304.34 g.mol⁻¹

White powder

R_f : 0.21 (cHex/AcOEt 1/1)

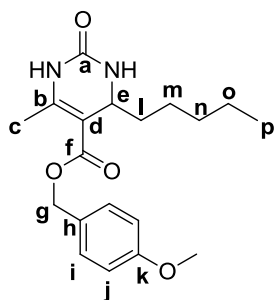
M_p : 163-164 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0.76 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H_g), 1.36-1.43 (m, 2H_f), 2.17 (s, 3H_e), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.00-4.03 (m, 1H_e), 4.99 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_i), 5.03 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_i), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_k), 7.28-7.30 (m, 3H, 2H_i + NH), 8.96 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 8.93 (C_g), 18.2 (C_e), 30.1 (C_f), 51.8 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_i), 98.9 (C_d), 114.2 (C_i), 129.0 (C_j), 130.1 (C_k), 149.4 (C_b), 153.2 (C_a), 159.4 (C_m), 165.8 (C_h)

HPLC : t_R = 12.5 min. **MS** : *m/z* 305 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-pentyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (66)



Yield : 19%
Molecular formula : C₁₉H₂₆N₂O₆
MW : 346.42 g.mol⁻¹

White powder

R_f : 0.37 (cHex/AcOEt 4:6)

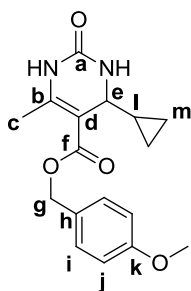
M_p : 149-150 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0.80 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H_p), 1.13-1.40 (m, 8H_{l-m-n-o}), 2.16 (s, 3H_e), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.00-4.05 (m, 1H_e), 4.97 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.06 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.32 (s, 1H, NH), 8.97 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 14.3 (C_p), 18.2 (C_e), 22.5, 23.8, 31.4, 37.2 (C_i), 50.5 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_g), 99.6 (C_d), 114.2 (C_j), 128.9 (C_h), 130.2 (C_i), 149.2 (C_b), 153.1 (C_a), 159.5 (C_k), 165.7 (C_f)

HPLC : t_R = 18.8 min. **MS** : *m/z* 347 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-cyclopropyl-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (67)



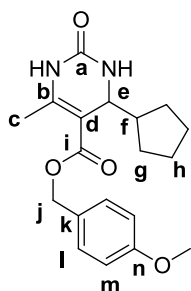
Yield :	68%
Molecular formula :	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₄
MW :	316.35 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.36 (DCM/MeOH 95/5)
M _p :	158-160 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0.12-0.28 (m, 4H_m), 0.89-0.94 (m, 1H_i), 2.17 (s, 3H_c), 3.63-3.66 (m, 1H_e), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.99 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.04 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j), 7.30-7.32 (m, 2H_i, 1H, NH), 9.04 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 1.71 (C_{l/m}), 2.42 (C_{l/m}), 18.2 (C_e), 53.1 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_g), 99.7 (C_d), 114.2 (C_j), 128.9 (C_h), 130.4 (C_i), 149.1 (C_b), 153.4 (C_a), 159.5 (C_k), 166.0 (C_f)

HPLC : t_R = 13.2 min. **MS** : *m/z* 317 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-cyclopentyl-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (68)



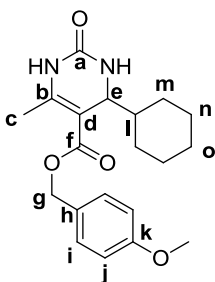
Yield :	18%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄
MW :	344.40 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.46 (cHex/AcOEt 3:7)
M _p :	173-175 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.24-1.52 (m, 8H_{g-h}), 1.95-1.99 (m, 1H_f), 2.20 (s, 3H_c), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 4.06 (s, 1H_e), 5.06 (s, 2H_j), 6.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.40 (s, 1H, NH), 8.99 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_e), 25.0 (C_h), 27.9 (C_g), 47.3 (C_f), 53.1 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_j), 99.6 (C_d), 114.2 (C_m), 128.9 (C_k), 130.2 (C_i), 149.1 (C_b), 153.6 (C_a), 159.5 (C_n), 166.1 (C_i)

HPLC : t_R = 16.6 min. **MS** : *m/z* 345 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-cyclohexyl-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (69)



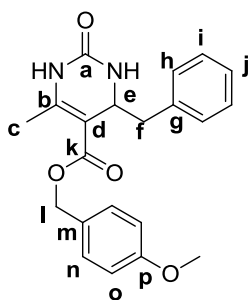
Yield :	22%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₄
MW :	358.43 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.46 (cHex/AcOEt 4:6)
M _p :	194-195 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0.88-1.68 (m, 11H_{l-m-n-o}), 2.21 (s, 3H_c), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 1H_e), 4.97 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_g), 5.07 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_g), 6.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j), 7.32-7.34 (m, 3H, 2H_i + NH), 8.94 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_e), 26.1, 26.3, 26.4, 29.0, 45.3 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_g), 98.1 (C_d), 114.2 (C_j), 129.0 (C_h), 130.2 (C_i), 149.4 (C_b), 153.5 (C_a), 159.4 (C_k), 166.0 (C_f)

HPLC : t_R = 16.6 min. **MS** : *m/z* 345 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-benzyl-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (70)



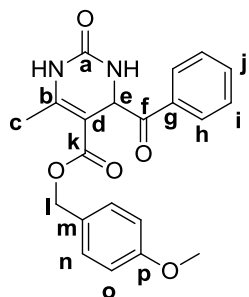
Yield :	22%
Molecular formula :	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₄
MW :	366.41 g.mol ⁻¹
Ochre powder	
Rf :	0.61 (cHex/AcOEt 1:3)
Mp :	149-151 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.28 (s, 3H_c), 2.65-2.69 (m, 1H_f), 2.88-2.92 (m, 1H_f), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.40-4.45 (m, 1H_e), 5.10 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_i), 5.16 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_i), 5.37 (s, 1H, NH), 6.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_o), 7.08 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H_n), 7.23-7.28 (m, 3H_{h-i}), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 8.18 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 18.5 (C_e), 43.1 (C_f), 53.5 (C_e), 55.2 (OCH₃), 65.8 (C_i), 100.6 (C_d), 114.0 (C_o), 126.6 (C_j), 128.2, 128.4, 129.5, 129.9 (C_n), 136.8 (C_g), 147.9 (C_b), 154.0 (C_a), 159.6 (C_p), 165.5 (C_k)

HPLC : t_R = 16.2 min. **MS** : *m/z* 408 ([M+H+CH₃CN]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-benzoyl-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (71)



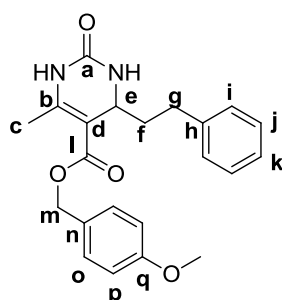
Yield :	13%
Molecular formula :	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₅
MW :	380.39 g.mol ⁻¹
Yellow crystals	
Rf :	0.55 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	189-191 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.21 (s, 3H_c), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.82 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_i), 4.90 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_i), 5.64 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_o), 7.08 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 7.46-7.48 (m, 2H), 7.62-7.65 (m, 2H), 7.89 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H_h), 9.28 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 18.2 (C_e), 53.9 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.3 (C_i), 95.2 (C_d), 114.1 (C_o), 128.5 (C_m), 129.0, 129.2, 130.2, 133.8, 135.1, 151.6 (C_b), 152.7 (C_a), 159.4 (C_p), 165.2 (C_k), 198.0 (C_f)

HPLC : t_R = 14.1 min. **MS** : *m/z* 381 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-4-phenethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (72)



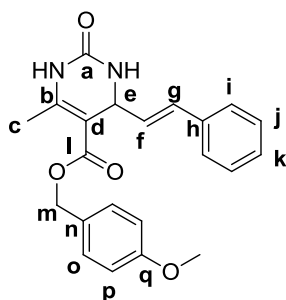
Yield :	19%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄
MW :	380.44 g.mol ⁻¹
White powder	
Rf :	0.28 (cHex/AcOEt 4:6)
Mp :	123-125 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.64-1.67 (m, 2H_f), 2.17 (s, 3H_c), 2.41-2.64 (m, 2H_g), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.09-4.11 (m, 1H_e), 4.94 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 5.04 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_p), 7.08-7.26 (m, 7H), 7.50 (s, 1H, NH), 9.05 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 18.2 (C_e), 26.8 (C_g), 30.5 (C_f), 50.5 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.0 (C_m), 99.2 (C_d), 114.2 (C_p), 126.1 (C_k), 128.6 (C_{ij}), 128.7 (C_{ij}), 128.8 (C_n), 129.0 (C_o), 142.0 (C_h), 149.6 (C_b), 153.1 (C_a), 159.4 (C_q), 165.6 (C_i)

HPLC : t_R = 15.0 min. **MS** : *m/z* 381 ([M+H]⁺)

(E)-4-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-styryl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (73)



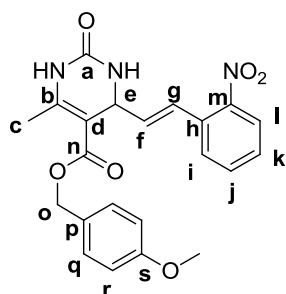
Yield :	24%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₄
MW :	378.42 g.mol ⁻¹
Yellow crystals	
R _f :	0.54 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	172-174 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.20 (s, 3H_c), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.71-4.72 (m, 1H_e), 4.99 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 5.12 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 6.15 (dd, *J* = 6.0 Hz, 15.6 Hz, 1H_f), 6.27 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H_g), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_p), 7.22-7.24 (m, 1H_k), 7.52-7.33 (m, 6H_{i-j-o}), 7.54 (s, 1H, NH), 9.19 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 52.3 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_m), 97.8 (C_d), 114.2 (C_p), 126.8, 128.0, 128.6, 129.0, 129.1, 130.3, 130.3, 136.6 (C_h), 149.5 (C_b), 152.9 (C_a), 159.4 (C_q), 165.4 (C_i)

HPLC : t_R = 17.4 min. **MS** : *m/z* 379 ([M+H]⁺)

(E)-4-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-(2-nitrostyryl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (74)



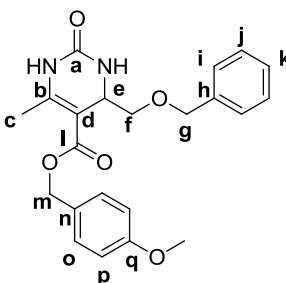
Yield :	14%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₁ N ₃ O ₅
MW :	423.42 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.11 (cHex/AcOEt 4:6)
Mp :	191-193 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.21 (s, 3H_c), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 4.74-4.76 (m, 1H_e), 5.03 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_o), 5.08 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_o), 6.27 (dd, *J*₁ = 5.6 Hz, *J*₂ = 15.6 Hz, 1H_f), 6.64 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H_g), 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_r), 7.29 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_q), 7.79-7.53 (m, 1H), 7.61 (s, 1H, NH), 7.63-7.70 (m, 2H), 7.91-7.94 (m, 1H), 9.25 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 52.1 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_o), 97.3 (C_d), 114.1 (C_r), 122.8, 124.7, 128.5 (C_p), 129.8 (C_q), 130.2, 131.0, 132.2, 133.7, 135.7 (C_h), 148.3 (C_b), 150.0 (C_m), 152.8 (C_a), 159.4 (C_s), 165.3 (C_n)

HPLC : t_R = 16.9 min. **MS** : *m/z* 424 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-((benzyloxy)methyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (75)



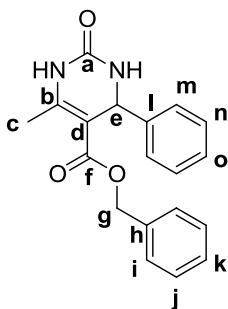
Yield :	66%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₅
MW :	396.44 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.35 (cHex/AcOEt 4:6)
Mp :	172-174 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.17 (s, 3H_c), 3.40-3.47 (m, 2H_f), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.22-4.24 (m, 1H_e), 4.38-4.48 (m, 2H_g), 4.97 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 5.01 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_p), 7.25-7.34 (m, 8H), 9.09 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 51.0 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_m), 72.4 (C_{f/g}), 73.1 (C_{f/g}), 95.8 (C_d), 114.2 (C_p), 127.6 (C_i), 127.7 (C_k), 128.6 (C_j), 128.9 (C_n), 130.2 (C_o), 138.8 (C_h), 151.0 (C_b), 153.0 (C_a), 159.4 (C_q), 165.5 (C_i)

HPLC : t_R = 15.0 min. **MS** : *m/z* 397 ([M+H]⁺)

Benzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (76)



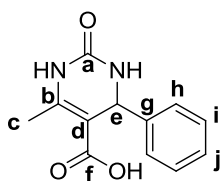
Yield :	88%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₃
MW :	322.36 g.mol ⁻¹
White solid	
R _f :	0.35 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	174-175 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H_c), 5.00 (d, J = 12.8 Hz, 1H_g), 5.06 (d, J = 12.8 Hz, 1H_g), 5.17 (d, J = 2.8 Hz, 1H_e), 7.14-7.32 (m, 10H_{i-j-k-m-n-o}), 7.77 (s, 1H, NH), 9.28 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.4 (C_e), 65.3 (C_g), 99.2 (C_d), 126.7 (C_m), 127.8 (C_o), 128.0 (C_i), 128.2 (C_k), 128.7 (C_j), 128.9 (C_n), 137.0 (C_h), 145.1 (C_i), 149.7 (C_b), 152.4 (C_a), 165.5 (C_f)

HPLC : t_R = 15.2 min. **MS** : m/z 323 ([M+H]⁺)

6-Methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylic acid (77)



Yield :	79%
Molecular formula :	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃
MW :	232.24 g.mol ⁻¹
White powder	
Mp :	230-232 °C

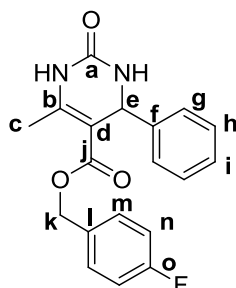
To a solution of **76** (21.4 mmol) in methanol (60.0 mL), under hydrogen atmosphere is added Pd/C (10% w/w, 2.14 mmol). The mixture is then stirred at room temperature for 3 h 30. Excess solvent is removed *in vacuo* and the residue is suspended in 100 mL 0.5 M KOH solution. After vigorous stirring for 3 h at room temperature and filtration on a Celite pad, 15 mL HCl 37% are added to the filtrate. The resulting precipitate is collected and air-dried to afford title compound.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.24 (s, 3H_c), 5.11 (d, J = 3.2 Hz, 1H_e), 7.24-7.34 (m, 5H_{h-i-j}), 7.68 (s, 1H, NH), 9.09 (s, 1H, NH), 11.89 (bs, COOH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 54.4 (C_e), 100.3 (C_d), 126.7 (C_h), 127.6 (C_j), 128.8 (C_i), 145.3 (C_g), 148.2 (C_b), 152.8 (C_a), 167.6 (C_f)

HPLC : t_R = 3.9 min. **MS** : m/z 233 ([M+H]⁺)

4-Fluorobenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (78)



Yield :	66%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₁₇ FN ₂ O ₃
MW :	340.35 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.60 (cHex/AcOEt 25/75)
Mp :	196-197 °C

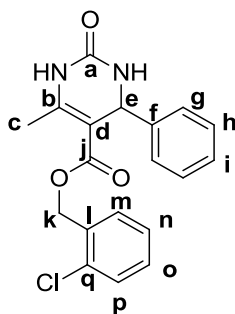
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H_c), 4.99 (d, J = 12.8 Hz, 1H_k), 5.06 (d, J = 12.8 Hz, 1H_k), 5.16 (d, J = 3.2 Hz, 1H_e), 7.09-7.32 (m, 9H_{g-h-i-m-n}), 7.75 (s, 1H, NH), 9.27 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.4 (C_e), 64.6 (C_k), 99.1 (C_d), 115.5 (d, J = 21.2 Hz, C_n), 126.7 (C_g), 127.8 (C_i), 128.9 (C_h), 130.3 (d, J = 8.3 Hz, C_m), 133.2 (d, J = 3.0 Hz, C_j), 145.1 (C_f), 149.8 (C_b), 152.4 (C_a), 162.1 (d, J = 242.3 Hz, C_o), 165.5 (C_j)

RMN ¹⁹F (160 MHz, CFCl₃) δ - 114.5

HPLC : t_R = 15.6 min. **MS** : m/z 341 ([M+H]⁺)

2-Chlorobenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (79)



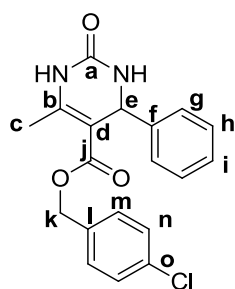
Yield :	73%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₃
MW :	356.80 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.64 (cHex/AcOEt 25/75)
Mp :	193-195 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H_c), 5.05-5.17 (m, 3H_{e-k}), 7.10-7.13 (m, 1H), 7.19-7.31 (m, 7H), 7.45 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_p), 7.79 (s, 1H, NH), 9.32 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.4 (C_e), 62.7 (C_k), 98.9 (C_d), 126.7 (C_g), 127.6, 127.8, 128.9 (C_h), 129.7, 130.2, 130.3, 132.8 (C_q), 134.3 (C_i), 145.0 (C_f), 150.2 (C_b), 152.4 (C_a), 165.3 (C_j)

HPLC : t_R = 17.7 min. **MS :** *m/z* 357 ([M+H]⁺)

4-Chlorobenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (80)



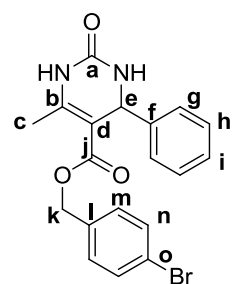
Yield :	58%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₃
MW :	356.80 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.49 (cHex/AcOEt 25/75)
Mp :	216-217 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H_c), 4.97 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.02 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H_k), 5.17 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 7.14-7.35 (m, 9H_{g-h-i-m-n}), 7.78 (s, 1H, NH), 9.30 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.4 (C_e), 64.4 (C_k), 99.0 (C_d), 126.8 (C_g), 127.8 (C_i), 128.7 (C_h), 128.9 (C_n), 129.9 (C_m), 132.7 (C_o), 136.0 (C_i), 145.1 (C_f), 150.0 (C_b), 152.3 (C_a), 165.4 (C_j)

HPLC : t_R = 17.4 min. **MS :** *m/z* 357 ([M+H]⁺)

4-Bromobenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (81)



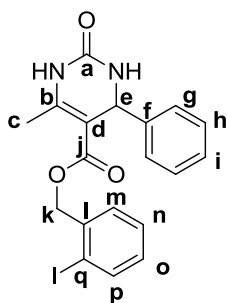
Yield :	61%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₁₇ BrN ₂ O ₃
MW :	401.25 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.57 (cHex/AcOEt 25/75)
Mp :	215-216 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H_c), 4.95 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.04 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H_k), 5.17 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 7.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.20 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H_g), 7.26-7.31 (m, 3H_{h-i}), 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.78 (s, 1H, NH), 9.30 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 17.9 (C_c), 54.0 (C_e), 64.0 (C_k), 98.5 (C_d), 120.8 (C_o), 126.3 (C_g), 127.3 (C_i), 128.4 (C_h), 129.7 (C_m), 131.1 (C_n), 136.0 (C_i), 144.6 (C_f), 149.5 (C_b), 151.9 (C_a), 164.9 (C_j)

HPLC : t_R = 18.2 min. **MS :** *m/z* 442, 444 ([M+H+CH₃CN]⁺)

2-Iodobenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (82)



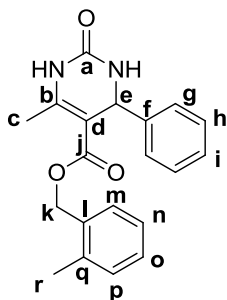
Yield :	65%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₁₇ IN ₂ O ₃
MW :	448.25 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.57 (cHex/AcOEt 25/75)
M _p :	200-202 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.28 (s, 3H_c), 4.96 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H_k), 5.04 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.19 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 7.05-7.08 (m, 2H_{m-o}), 7.20-7.29 (m, 6H_{g-h-i-n}), 7.79 (s, 1H, NH), 7.86 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_p), 9.31 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.4 (C_c), 54.3 (C_e), 69.2 (C_k), 98.9 (C_{d/q}), 99.1 (C_{d/q}), 126.8 (C_g), 127.8 (C_i), 128.8, 128.9 (C_h), 129.7, 130.4, 138.9 (C_{l/p}), 139.5 (C_{l/p}), 145.0 (C_f), 150.2 (C_b), 152.4 (C_a), 165.2 (C_j)

HPLC : t_R = 18.6 min. **MS** : *m/z* 449 ([M+H]⁺)

2-Methylbenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (83)



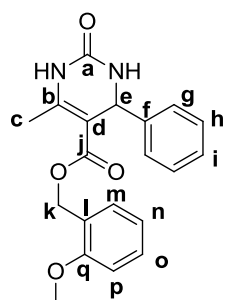
Yield :	54%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃
MW :	336.38 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.69 (cHex/AcOEt 25/75)
M _p :	157-159 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.12 (s, 3H_r), 2.27 (s, 3H_c), 4.99 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.06 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.14 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 7.06-7.26 (m, 9H), 7.73 (s, 1H, NH), 9.25 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 18.7 (C_r), 54.3 (C_e), 63.7 (C_k), 99.1 (C_d), 126.1, 126.7 (C_g), 127.8 (C_i), 128.4, 128.9 (C_h), 129.0, 130.4, 134.8 (C_q), 136.7 (C_i), 145.0 (C_f), 149.8 (C_b), 152.4 (C_a), 165.5 (C_j)

HPLC : t_R = 16.8 min. **MS** : *m/z* 337 ([M+H]⁺)

2-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (84)



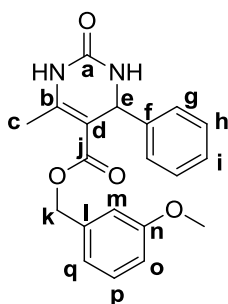
Yield :	56%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ N ₂ O ₄
MW :	352.38 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.50 (cHex/AcOEt 25/75)
M _p :	222-223 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.26 (s, 3H_c), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.97 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.07 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.16 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.81-6.85 (m, 1H), 6.98-7.00 (m, 2H), 7.20 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H_g), 7.24-7.28 (m, 4H_{h-i-m}), 7.74 (s, 1H, NH), 9.24 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 54.3 (C_e), 55.8 (OCH₃), 60.9 (C_k), 99.4 (C_d), 111.1 (C_n), 120.5 (C_i), 124.5, 126.7 (C_g), 127.7 (C_i), 128.8 (C_h), 129.3, 129.8, 145.1 (C_f), 149.4 (C_b), 152.6 (C_a), 157.4 (C_q), 165.6 (C_j)

HPLC : t_R = 15.7 min. **MS** : *m/z* 353 ([M+H]⁺)

3-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (85)



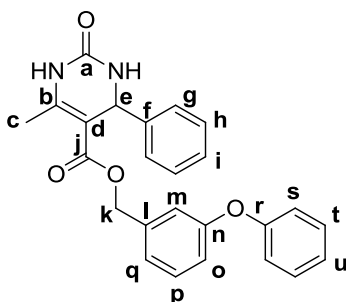
Yield :	63%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₉ N ₂ O ₄
MW :	312.32 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.35 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	73-75 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.28 (s, 3H_c), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 5.00 (s, 1H_k), 5.01 (s, 1H_k), 5.17 (d, J = 2.8 Hz, 1H_e), 6.72 (d, J = 7.6 Hz, 1H_o), 6.77 (s, 1H_m), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 1H_q), 7.18-7.30 (m, 6H_{g-h-i-p}), 7.77 (s, 1H, NH), 9.28 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_e), 54.3 (C_e), 55.4 (OCH₃), 65.2 (C_k), 99.1 (C_d), 113.4 (C_{m/o}), 113.7 (C_{m/o}), 120.0 (C_q), 126.7 (C_h), 127.8 (C_i), 128.9 (C_g), 129.9 (C_p), 138.5 (C_l), 145.0 (C_f), 149.8 (C_b), 152.5 (C_a), 159.6 (C_n), 165.5 (C_j)

HPLC : t_R = 15.1 min. **MS** : m/z 394 ([M+H+CH₃CN]⁺)

3-Phenoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (86)



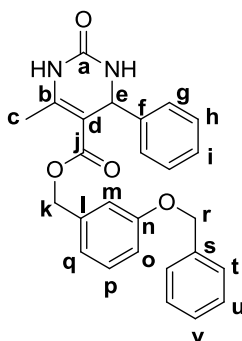
Yield :	58%
Molecular formula :	C ₂₅ H ₂₂ N ₂ O ₄
MW :	414.45 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.37 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	160-163 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H_c), 5.00 (d, J = 13.2 Hz, 1H_k), 5.05 (d, J = 12.8 Hz, 1H_k), 5.15 (d, J = 3.2 Hz, 1H_e), 6.83 (s, 1H_m), 6.90-6.93 (m, 2H), 6.98 (d, J = 7.6 Hz, 2H_s), 7.14-7.32 (m, 7H), 7.38-7.42 (m, 2H_t), 7.76 (s, 1H, NH), 9.27 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_e), 55.4 (C_e), 64.8 (C_k), 99.0 (C_d), 118.0 (C_{m/o}), 118.3 (C_{m/o}), 119.0 (C_s), 122.9 (C_{q/u}), 124.0 (C_{q/u}), 126.7 (C_g), 127.8 (C_i), 128.8 (C_h), 130.4 (C_t), 130.5 (C_p), 139.2 (C_l), 145.0 (C_f), 149.9 (C_b), 152.4 (C_a), 156.9 (C_{n/r}), 157.0 (C_{n/r}), 165.4 (C_j)

HPLC : t_R = 20.5 min. **MS** : m/z 456 ([M+H+CH₃CN]⁺)

3-Benzyloxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (87)



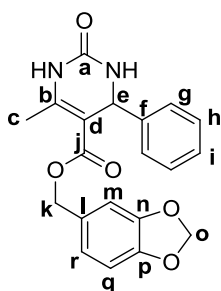
Yield :	77%
Molecular formula :	C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₄
MW :	428.48 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.61 (cHex/AcOEt 25/75)
Mp :	171-173 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H_c), 4.97-5.03 (m, 4H_{k-r}), 5.18 (d, J = 3.2 Hz, 1H_e), 6.74 (d, J = 7.6 Hz, 1H_o), 6.84 (s, 1H_m), 6.92 (d, J = 8.0 Hz, 1H_q), 7.19-7.42 (m, 11H), 7.77 (s, 1H, NH), 9.27 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_e), 54.3 (C_e), 65.1 (C_k), 69.6 (C_r), 99.1 (C_d), 114.3 (C_{m/o}), 114.4 (C_{m/o}), 120.3 (C_q), 126.7 (C_g), 127.8 (C_i), 128.1 (C_l), 128.3 (C_v), 128.9 (C_{h/u}), 129.9 (C_p), 137.4 (C_{l/s}), 138.6 (C_{l/s}), 145.0 (C_f), 149.8 (C_b), 152.5 (C_a), 158.7 (C_n), 165.5 (C_j)

HPLC : t_R = 20.5 min. **MS** : m/z 429 ([M+H]⁺)

Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (88)



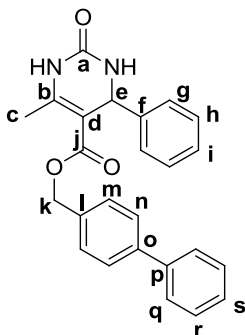
<i>Yield</i> :	59%
<i>Molecular formula</i> :	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₅
<i>MW</i> :	366.37 g.mol ⁻¹
	White powder
<i>R_f</i> :	0.54 (cHex/AcOEt 25/75)
<i>Mp</i> :	186-187 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.26 (s, 3H_c), 4.89 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 4.94 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_k), 5.18 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.00 (s, 2H_o), 6.68-6.71 (m, 2H_{m-r}), 6.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_q), 7.19 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H_g), 7.24-7.28 (m, 3H_{h-i}), 7.74 (s, 1H, NH), 9.24 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.3 (C_e), 65.3 (C_k), 99.3 (C_d), 101.4 (C_o), 108.4 (C_{m/q}), 108.9 (C_{m/q}), 122.1 (C_r), 126.7 (C_g), 127.8 (C_i), 128.8 (C_h), 130.6 (C_i), 145.1 (C_f), 147.3 (C_{n/p}), 147.6 (C_{n/p}), 149.6 (C_b), 152.5 (C_a), 165.5 (C_j)

HPLC : t_R = 14.4 min. **MS** : *m/z* 367 ([M+H]⁺)

4-Phenylbenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (89)



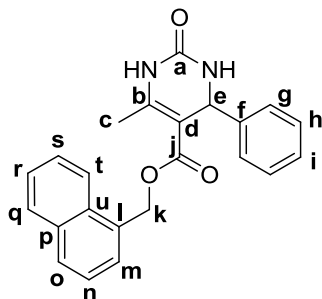
<i>Yield</i> :	86%
<i>Molecular formula</i> :	C ₂₅ H ₂₂ N ₂ O ₅
<i>MW</i> :	398.45 g.mol ⁻¹
	White powder
<i>R_f</i> :	0.63 (cHex/AcOEt 25/75)
<i>Mp</i> :	187-189 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.29 (s, 3H_c), 5.05 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.11 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.20 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 7.22-7.39 (m, 8H), 7.47 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H_r), 7.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H_m), 7.65 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H_q), 7.77 (s, 1H, NH), 9.28 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.4 (C_e), 65.0 (C_k), 99.2 (C_d), 126.8 (C_{g/m/q}), 127.0 (C_{g/m/q}), 127.1 (C_{g/m/q}), 127.8 (C_{i/s}), 128.0 (C_{i/s}), 128.7 (C_{h/n/r}), 128.9 (C_{h/n/r}), 129.4 (C_{h/n/r}), 136.2 (C_i), 140.0 (C_{o/p}), 140.2 (C_{o/p}), 145.1 (C_f), 149.8 (C_b), 152.4 (C_a), 165.5 (C_j)

HPLC : t_R = 20.7 min. **MS** : *m/z* 399 ([M+H]⁺)

1-Naphtylmethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (90)



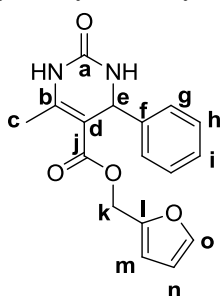
<i>Yield</i> :	75%
<i>Molecular formula</i> :	C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O ₃
<i>MW</i> :	372.42 g.mol ⁻¹
	White powder
<i>R_f</i> :	0.63 (cHex/AcOEt 25/75)
<i>Mp</i> :	214-215 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.24 (s, 3H_c), 5.10 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_e), 5.49 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.53 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 7.10-7.13 (m, 2H), 7.20-7.22 (m, 3H), 7.35-7.45 (m, 2H), 7.50-7.56 (m, 2H_{r-s}), 7.71 (s, 1H, NH), 7.90-7.97 (m, 3H_{o-q-t}), 9.25 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.3 (C_e), 63.6 (C_k), 99.3 (C_d), 124.0 (C_f), 125.7, 126.4, 126.6 (C_g), 126.9, 127.3, 127.7 (C_i), 128.8 (C_h), 128.9, 129.2, 131.4 (C_i), 132.4 (C_{p/u}), 133.6 (C_{p/u}), 145.0 (C_f), 149.7 (C_b), 152.5 (C_a), 165.5 (C_j)

HPLC : t_R = 18.5 min. **MS** : *m/z* 373 ([M+H]⁺)

Furan-2-ylmethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (91)



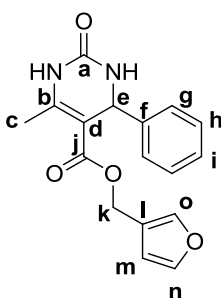
Yield :	51%
Molecular formula :	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₄
MW :	312.32 g.mol ⁻¹
White powder	
Rf :	0.37 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	135-137 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.23 (s, 3H_c), 5.01 (s, 2H_k), 5.11 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.40 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_m), 6.43-6.44 (m, 1H_n), 7.16 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H_g), 7.22-7.30 (m, 3H_{h-i}), 7.66 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H_o), 7.75 (s, 1H, NH), 9.27 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.2 (C_e), 57.3 (C_k), 99.3 (C_d), 110.7 (C_{m/n}), 111.1 (C_{m/n}), 126.5 (C_g), 127.7 (C_i), 128.8 (C_h), 143.9 (C_{f/o}), 145.1 (C_{f/o}), 149.6 (C_{b/l}), 150.1 (C_{b/l}), 152.6 (C_a), 165.2 (C_j)

HPLC : t_R = 12.4 min. **MS** : *m/z* 354 ([M+H+CH₃CN]⁺)

Furan-3-ylmethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (92)



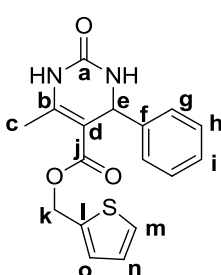
Yield :	58%
Molecular formula :	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₄
MW :	312.32 g.mol ⁻¹
White powder	
Rf :	0.29 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	155-156 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.26 (s, 3H_c), 4.86 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_k), 4.91 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_k), 5.14 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.34 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H_m), 7.20-7.32 (m, 5H_{g-h-i}), 7.55 (s, 1H_o), 7.60 (m, 1H_n), 7.75 (s, 1H, NH), 9.24 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.3 (C_e), 57.2 (C_k), 99.3 (C_d), 111.0 (C_m), 121.4 (C_i), 126.7 (C_g), 127.7 (C_i), 128.9 (C_h), 141.7 (C_o), 144.1 (C_n), 145.1 (C_i), 149.5 (C_b), 152.5 (C_a), 165.6 (C_j)

HPLC : t_R = 12.2 min. **MS** : *m/z* 354 ([M+H+CH₃CN]⁺)

Thiophen-2-ylmethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (93)



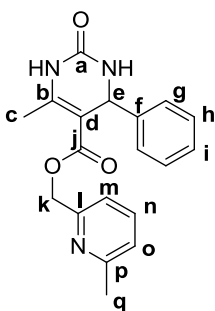
Yield :	29%
Molecular formula :	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₃ S
MW :	328.39 g.mol ⁻¹
White powder	
Rf :	0.70 (cHex/AcOEt 25/75)
Mp :	148-149 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.26 (s, 3H_c), 5.13 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_e), 5.19 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H_k), 5.22 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H_k), 6.97-6.99 (dd, *J* = 3.2 Hz, *J* = 5.8 Hz, 1H_n), 7.06 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_o), 7.19-7.30 (m, 5H_{g-h-i}), 7.52 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H_m), 7.77 (s, 1H, NH), 9.28 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.4 (C_c), 54.2 (C_e), 60.0 (C_k), 99.2 (C_d), 126.6 (C_g), 127.2, 127.5, 127.7, 128.3, 128.8 (C_h), 138.9 (C_i), 145.0 (C_i), 149.8 (C_b), 152.5 (C_a), 165.4 (C_j)

HPLC : t_R = 14.3 min. **MS** : *m/z* 329 ([M+H]⁺)

(6-Methylpyridin-2-yl)methyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (94)



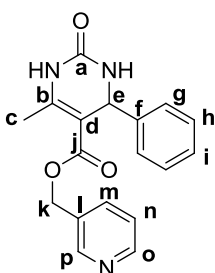
Yield :	49%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₃
MW :	337.37 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.11 (cHex/AcOEt 25/75)
Mp :	163-165 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.30 (s, 3H_c), 2.43 (s, 3H_q), 5.01 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H_k), 5.10 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H_k), 5.22 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.75 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_m), 7.13 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_o), 7.23-7.33 (m, 5H_{g-h-i}), 7.54 (dd, *J*₁ = 7.6 Hz, *J*₂ = 7.6 Hz, 1H_n), 7.78 (s, 1H, NH), 9.30 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.4 (C_c), 24.3 (C_q), 54.3 (C_e), 66.0 (C_k), 99.0 (C_d), 118.3 (C_{m/o}), 122.5 (C_{m/o}), 126.8 (C_g), 127.8 (C_i), 128.9 (C_h), 137.4 (C_n), 145.1 (C_f), 150.1 (C_b), 152.4 (C_a), 155.9 (C_l), 157.8 (C_p), 165.4 (C_j)

HPLC : t_R = 9.2 min. **MS** : *m/z* 338 ([M+H]⁺)

Pyridin-3-ylmethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (95)



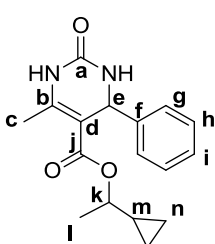
Yield :	62%
Molecular formula :	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₃
MW :	323.35 g.mol ⁻¹
Colorless crystals	
R _f :	0.23 (cHex/AcOEt 25/75)
Mp :	194-195 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H_c), 5.03 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.11 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.20 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 7.19-7.31 (m, 6H_{g-h-i-n}), 7.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_m), 7.77 (s, 1H, NH), 8.42 (s, 1H_p), 8.48 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H_o), 9.29 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.4 (C_e), 63.0 (C_k), 98.9 (C_d), 123.9 (C_n), 126.7 (C_g), 127.8 (C_i), 128.9 (C_h), 132.6 (C_l), 136.0 (C_m), 145.1 (C_f), 149.4 (C_o), 149.4 (C_p), 150.1 (C_b), 152.3 (C_a), 165.4 (C_j)

HPLC : t_R = 7.1 min. **MS** : *m/z* 324 ([M+H]⁺)

1-Cyclopropylethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (97)



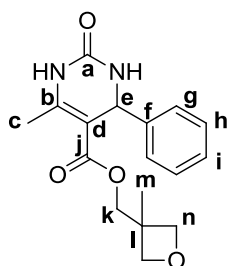
Yield :	42%
Molecular formula :	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₃
MW :	300.35 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.42 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	279-280 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (mix of diastereomers) -0.03-0.02 (m, 0.5H_{m/n}), 0.05-0.09 (m, 0.5H_{m/n}), 0.22-0.25 (m, 1.5H_{m/n}), 0.32-0.39 (m, 0.5H_{m/n}), 0.40-0.47 (m, 1H_{m/n}), 0.84-0.90 (m, 0.5H_{m/n}), 0.93-0.98 (m, 0.5H_{m/n}), 0.99 (d, *J* = 6.4 Hz, 1.5H_l), 1.21 (d, *J* = 6.4 Hz, 1.5H_l), 2.25 (s, 3H_c), 4.21-4.28 (m, 1H_k), 5.14-5.16 (m, 1H_e), 7.24-7.34 (m, 5H_{g-h-i}), 7.72 (s, 1H, NH), 9.16 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 2.4/2.5 (C_n), 3.6/3.7 (C_n), 16.4/16.6 (C_l), 18.1 (C_c), 19.8/20.3 (C_m), 54.4/54.5 (C_e), 73.5/73.8 (C_k), 99.9 (C_d), 126.7/126.7 (C_g), 127.6 (C_i), 128.7 (C_h), 145.3/145.4 (C_f), 148.6 (C_b), 152.5 (C_a), 165.3 (C_j)

HPLC : t_R = 14.9 min. **MS** : *m/z* 301 ([M+H]⁺)

(3-Methyloxetan-3-yl)methyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (98)



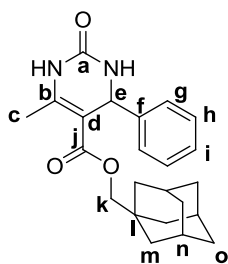
Yield : 54%
 Molecular formula : $C_{17}H_{20}N_2O_4$
 MW : 316.35 g.mol⁻¹
 White powder
 Rf :
 Mp : 279-280 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.06 (s, 3H_m), 2.30 (s, 3H_c), 3.99 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H_k), 4.04 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H_k), 4.09-4.14 (m, 3H_n), 4.25 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H_n), 5.16 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 7.21-7.27 (m, 3H_{g/h/i}), 7.31-7.35 (m, 2H_{g/h/i}), 7.74 (s, 1H, NH), 9.25 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 21.2 (C_m), 38.9 (C_l), 54.6 (C_e), 68.3 (C_k), 78.8 (C_n), 78.9 (C_n), 99.0 (C_d), 126.7 (C_h), 127.8 (C_i), 128.9 (C_g), 145.1 (C_f), 149.9 (C_b), 152.2 (C_a), 165.7 (C_d)

HPLC : t_R = 7.3 min. **MS** : *m/z* 317 ([M+H]⁺)

(1r, 3r, 5s)-Adamantan-1-ylmethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (99)



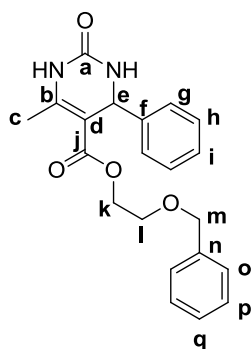
Yield : 76%
 Molecular formula : $C_{23}H_{28}N_2O_3$
 MW : 380.48 g.mol⁻¹
 White powder
 Rf : 0.60 (cHex/AcOEt 25/75)
 Mp : 279-280 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.24 (d, *J* = 12.0 Hz, 3H_o), 1.30 (d, *J* = 12.0 Hz, 3H_o), 1.49 (d, *J* = 11.2 Hz, 3H_m), 1.61 (d, *J* = 11.2 Hz, 3H_m), 1.82 (s, 3H_n), 2.31 (s, 3H_c), 3.42 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H_k), 3.64 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H_k), 5.16 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 7.23-7.26 (m, 3H_{g/h/i}), 7.32-7.35 (m, 2H_{g/h/i}), 7.71 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 27.8 (C_n), 33.2 (C_l), 36.8 (C_o), 38.9 (C_m), 54.4 (C_e), 73.1, 99.0 (C_d), 126.8 (C_h), 127.8 (C_i), 128.9 (C_g), 144.8 (C_f), 149.6 (C_b), 152.3 (C_a), 165.7 (C_j)

HPLC : t_R = 24.5 min. **MS** : *m/z* 381 ([M+H]⁺)

2-(Benzyloxy)ethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (100)



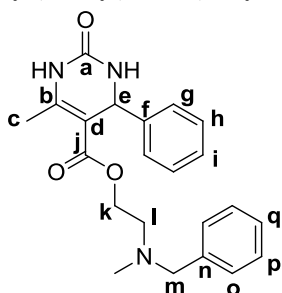
Yield : 55%
 Molecular formula : $C_{21}H_{22}N_2O_4$
 MW : 366.41 g.mol⁻¹
 White powder
 Rf : 0.28 (cHex/EtOAc 4/6)
 Mp : 124-126 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.24 (s, 3H_c), 3.54-3.60 (m, 2H_l), 4.12 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H_k), 4.45 (s, 2H_m), 5.16 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 7.20-7.37 (m, 10H), 7.76 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 54.3 (C_e), 63.0 (C_k), 68.2 (C_l), 72.4 (C_m), 99.6 (C_d), 126.6 (C_g), 127.7 (2C_{i/q}), 127.9 (C_o), 128.7 (C_h), 128.8 (C_p), 138.7 (C_n), 145.2 (C_f), 149.2 (C_b), 152.7 (C_a), 165.7 (C_j)

HPLC : t_R = 15.3 min. **MS** : *m/z* 367 ([M+H]⁺)

2-(Benzyl(methyl)amino)ethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (101)



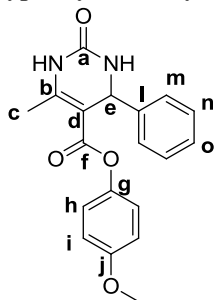
Yield :	24%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₃
MW :	379.45 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.14 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	146-147 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.08 (s, 3H, NMe), 2.25 (s, 3H_c), 3.44 (s, 2H_m), 4.05-4.10 (m, 2H_k), 5.16 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 7.22-7.32 (m, 10H), 7.76 (s, 1H, NH), 9.20 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 42.3 (NMe), 54.2 (C_e), 55.6 (C_i), 61.4 (C_k), 62.0 (C_m), 99.6 (C_d), 126.7 (C_g), 127.3 (C_i), 127.7 (C_q), 128.5 (C_{h/o/p}), 128.7 (C_{h/o/p}), 129.0 (C_{h/o/p}), 139.4 (C_n), 145.2 (C_f), 149.1 (C_b), 152.6 (C_a), 165.8 (C_j)

MS : *m/z* 380 ([M+H]⁺)

4-methoxyphenyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (102)



Yield :	37%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄
MW :	338.36 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.31 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	265-268 °C

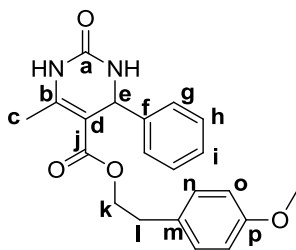
In a 10 mL microwave vial, acid **77** (0.42 mmol), 4-methoxyphenol (0.84 mmol), EDCI.HCl (0.63 mmol) and DMAP (0.42 mmol) were dissolved in dimethylacetamide (2.0 mL). The mixture was then microwaved for 1 h at 120 °C. Excess solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in 10 mL ethyl acetate and washed twice with 5 mL 1 M aqueous HCl and once with 5 mL water. Organic layer was concentrated *in vacuo* and the residue triturated in ethanol to afford title compound.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.31 (s, 3H_c), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 5.31 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 6.79 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H_i), 6.89 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H_h), 7.29-7.39 (m, 5H_{m-n-o}), 7.89 (s, 1H, NH), 9.45 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.5 (C_c), 54.6 (C_e), 55.8 (OCH₃), 98.4 (C_d), 114.7 (C_i), 123.0, 126.8, 127.9, 129.0 (C_m), 144.2 (C_{g/l}), 145.2 (C_{g/l}), 151.3 (C_b), 152.0 (C_a), 157.0 (C_j), 164.6 (C_f)

HPLC : *t_R* = 13.7 min. **MS :** *m/z* 339 ([M+H]⁺)

4-Methoxyphenethyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (103)



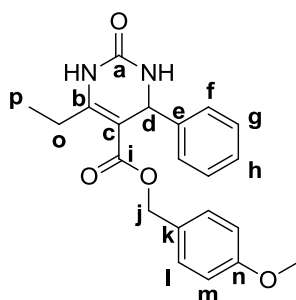
Yield :	85%
Molecular formula :	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₄
MW :	366.41 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.56 (cHex/AcOEt 25/75)
Mp :	191-193 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.19 (s, 3H_c), 2.75 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H_l), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 4.11-4.16 (m, 2H_k), 5.08 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_o), 7.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.14 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H_g), 7.23-7.29 (m, 3H_{h-i}), 7.72 (s, 1H, NH), 9.18 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.3 (C_c), 33.9 (C_l), 54.2 (C_e), 55.4 (OCH₃), 64.7 (C_k), 99.5 (C_d), 114.2 (C_o), 126.6 (C_g), 127.7 (C_i), 128.8 (C_n), 130.1 (C_n), 130.5 (C_m), 145.1 (C_f), 149.1 (C_b), 152.6 (C_a), 158.2 (C_p), 165.4 (C_j)

HPLC : *t_R* = 15.7 min. **MS :** *m/z* 367 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-ethyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (104)



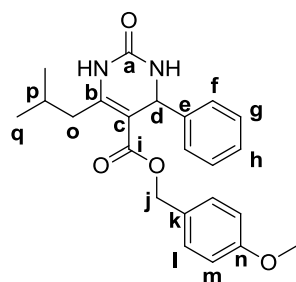
Yield :	66%
Molecular formula :	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₄
MW :	366.41 g.mol ⁻¹
White powder	
Mp :	62-65 °C
Rf :	0.26 (cHex/AcOEt 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.09 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H_p), 2.56-2.62 (m, 1H_o), 2.68-2.74 (m, 1H_o), 3.74 (s, OCH₃), 4.96 (s, 2H_j), 5.12 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_d), 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_l), 7.17-7.30 (m, 5H_{f-g-h}), 7.72 (s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 13.5 (C_p), 24.5 (C_o), 54.3 (C_d), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_i), 98.5 (C_e), 114.1 (C_m), 126.7 (C_f), 127.7 (C_h), 128.7 (C_k), 128.9 (C_g), 130.0 (C_l), 145.1 (C_e), 152.7 (C_b), 154.9 (C_a), 159.4 (C_n), 165.2 (C_i)

HPLC : t_R = 16.4 min. **MS** : *m/z* 367 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 2-oxo-6-isobutyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (105)



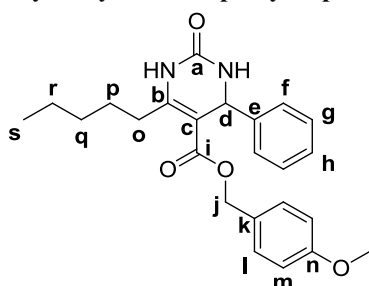
Yield :	23%
Molecular formula :	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄
MW :	394.46 g.mol ⁻¹
White powder	
Mp :	190-192 °C
Rf :	0.34 (cHex/AcOEt 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0.81 (d, *J* = 2.0 Hz, 3H_q), 0.82 (d, *J* = 2.4 Hz, 3H_q), 1.87-1.93 (m, 1H_p), 2.47-2.60 (m, 2H_o), 3.74 (s, OCH₃), 4.93 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_j), 4.97 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_j), 5.16 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_d), 6.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_m), 7.16-7.28 (m, 7H_{f-g-h-l}), 7.73 (s, 1H, NH), 9.14 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 22.3 (C_q), 22.5 (C_q), 28.3 (C_p), 39.1 (C_o), 54.4 (C_d), 55.5 (OCH₃), 65.4 (C_i), 100.1 (C_e), 114.1 (C_m), 126.6 (C_g), 127.7 (C_h), 128.6 (C_k), 128.8 (C_f), 130.3 (C_l), 145.2 (C_e), 152.4 (C_b), 152.7 (C_a), 159.5 (C_n), 165.5 (C_i)

HPLC : t_R = 19.4 min. **MS** : *m/z* 423 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 2-oxo-6-pentyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (106)



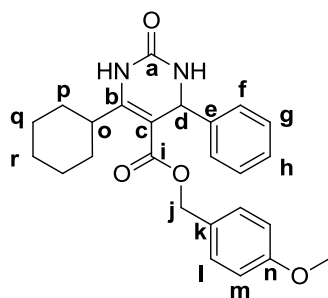
Yield :	77%
Molecular formula :	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₄
MW :	408.49 g.mol ⁻¹
White powder	
Mp :	54-56 °C
Rf :	0.55 (cHex/EtOAc 4/6)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0.82 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H_s), 1.10-1.25 (m, 4H_{p-q}), 1.44-1.48 (m, 2H_r), 2.52-2.55 (m, 2H_o), 3.74 (s, OCH₃), 4.95 (dd, *J* = 12.0 Hz, *J* = 18.0 Hz, 2H_j), 5.12 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_d), 6.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.15-7.18 (m, 4H_{f-l}), 7.24-7.32 (m, 3H_{h-i}), 7.72 (s, 1H, NH), 9.19 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 14.3 (C_s), 22.3 (C_r), 31.1 (C_{o/p/q}), 31.5 (C_{o/p/q}), 54.3 (C_d), 55.5 (OCH₃), 65.4 (C_i), 99.2 (C_e), 114.1 (C_m), 126.6 (C_f), 127.8 (C_h), 128.6 (C_k), 128.9 (C_g), 130.2 (C_l), 145.0 (C_e), 152.8 (C_b), 153.5 (C_a), 159.4 (C_n), 165.5 (C_i)

HPLC : t_R = 21.5 min. **MS** : *m/z* 450 ([M+H+CH₃CN]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-cyclohexyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (107)



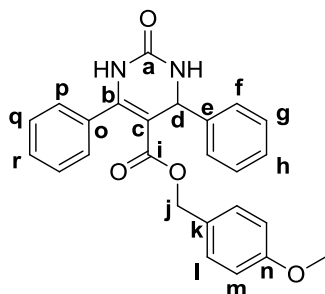
Yield :	54%
Molecular formula :	C ₂₅ H ₂₈ N ₂ O ₄
MW :	420.50 g.mol ⁻¹
White powder	
Mp :	98-101 °C
Rf :	0.42 (cHex/AcOEt 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.15-1.24 (m, 4H), 1.49-1.71 (m, 7H), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.12 (d, J = 3.6 Hz, 1H_e), 6.86 (d, J = 8.8 Hz, 2H_m), 7.12-7.16 (m, 4H), 7.22-7.30 (m, 3H), 7.71 (s, 1H, NH), 8.83 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 25.3 (C_r), 26.2 (C_q), 26.4 (C_q), 28.7 (C_p), 29.0 (C_p), 38.1 (C_o), 54.2 (C_d), 55.5 (OCH₃), 65.4 (C_j), 98.5 (C_e), 114.1 (C_m), 126.6 (C_g), 127.8 (C_h), 128.6 (C_k), 128.9 (C_f), 130.1 (C_l), 144.9 (C_e), 152.9 (C_b), 156.6 (C_a), 159.4 (C_n), 165.7 (C_i)

HPLC : t_R = 21.7 min. **MS** : m/z 462 ([M+H+CH₃CN]⁺)

4-Methoxybenzyl 4,6-diphenyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (108)



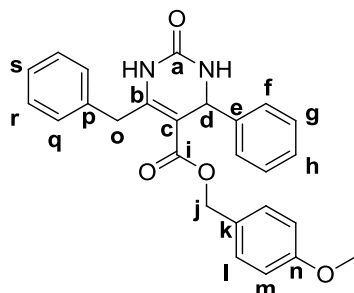
Yield :	44%
Molecular formula :	C ₂₅ H ₂₂ N ₂ O ₄
MW :	414.45 g.mol ⁻¹
White powder	
Mp :	82-84 °C
Rf :	0.33 (cHex/EtOAc 4/6)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.72 (s, 3H, OCH₃), 4.72 (dd, J = 12.4 Hz, J = 15.6 Hz, 2H_j), 5.23 (d, J = 3.2 Hz, 1H_d), 6.74-6.81 (m, 4H), 7.29-7.31 (m, 3H_{g-h}), 7.33-7.37 (m, 7H), 7.88 (s, 1H, NH), 9.33 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 54.6 (C_d), 55.5 (OCH₃), 65.2 (C_j), 100.4 (C_e), 113.9 (C_m), 126.7 (C_f), 127.9, 128.2, 128.3, 128.8, 129.0, 129.4, 129.7 (C_l), 135.3 (C_o), 144.7 (C_e), 149.9 (C_b), 152.5 (C_a), 159.2 (C_n), 165.3 (C_i)

HPLC : t_R = 17.8 min. **MS** : m/z 456 ([M+H+CH₃CN]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-benzyl-2-oxo-6-benzyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (109)



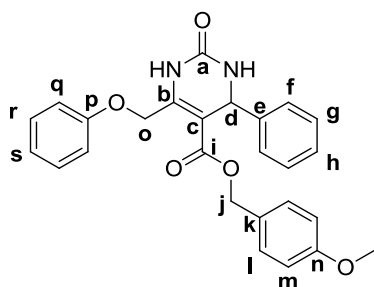
Yield :	64%
Molecular formula :	C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₄
MW :	428.48 g.mol ⁻¹
White powder	
Mp :	140-142 °C
Rf :	0.23 (cHex/AcOEt 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.74 (s, OCH₃), 3.92 (d, J = 13.6 Hz, 1H_o), 4.19 (d, J = 14.0 Hz, 1H_o), 4.96 (s, 2H_j), 5.18 (d, J = 3.6 Hz, 1H_d), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 2H_m), 7.09 (d, J = 8.4 Hz, 2H_l), 7.16-7.19 (m, 2H), 7.21-7.31 (m, 8H), 7.78 (s, 1H, NH), 9.36 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 35.8 (C_o), 54.3 (C_d), 55.5 (OCH₃), 65.4 (C_j), 100.3 (C_e), 114.1 (C_m), 126.7 (C_f), 126.9 (C_{h/s}), 127.8 (C_k), 128.5 (C_{h/s}), 128.7 (C_{g/q/r}), 128.8 (C_{g/q/r}), 128.9 (C_{g/q/r}), 130.1 (C_l), 138.1 (C_p), 144.9 (C_e), 150.9 (C_b), 152.6 (C_a), 159.4 (C_n), 165.4 (C_i)

HPLC : t_R = 17.8 min. **MS** : m/z 456 ([M+H+CH₃CN]⁺)

4-Methoxybenzyl 2-oxo-6-phenoxyethyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (110)



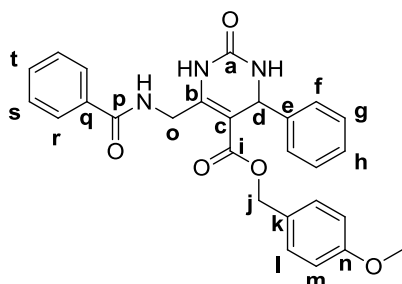
Yield :	23%
Molecular formula :	C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₅
MW :	444.48 g.mol ⁻¹
White powder	
Mp :	171-173 °C
Rf :	0.27 (cHex/AcOEt 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.73 (s, OCH₃), 4.96-5.23 (m, 5H_{e-j,o}), 6.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_m), 6.90-6.95 (m, 3H_{r-s}), 7.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_i), 7.21-7.29 (m, 7H_{f-g-h-q}), 7.86 (s, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 54.4 (C_d), 55.5 (OCH₃), 64.0 (C_o), 65.8 (C_j), 101.5 (C_e), 114.1 (C_m), 115.1 (C_q), 121.6 (C_s), 126.8 (C_t), 128.0 (C_{h/k}), 128.3 (C_{h/k}), 129.0 (C_g), 129.9 (C_{l/r}), 130.2 (C_{l/r}), 144.3 (C_e), 146.6 (C_b), 152.3 (C_a), 158.2 (C_p), 159.4 (C_n), 165.0 (C_i)

HPLC : t_R = 21.1 min. **MS** : *m/z* 486 ([M+H+CH₃CN]⁺)

4-Methoxybenzyl 2-oxo-6-(benzamidomethyl)-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (111)



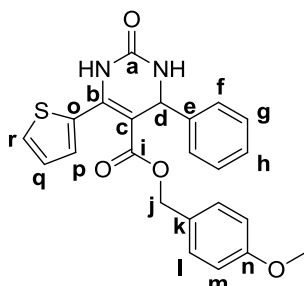
Yield :	42%
Molecular formula :	C ₂₇ H ₂₅ N ₃ O ₅
MW :	471.50 g.mol ⁻¹
White powder	
Mp :	213-216 °C
Rf :	0.15 (cHex/AcOEt 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.73 (s, OCH₃), 4.54 (dd, *J* = 5.6 Hz, *J* = 15.6 Hz, 1H_o), 4.77 (dd, *J* = 5.6 Hz, *J* = 15.6 Hz, 1H_o), 5.00 (s, 2H_j), 5.18 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_d), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_m), 7.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_i), 7.22-7.30 (m, 5H_{f-g-h}), 7.48-7.57 (m, 3H_{s-t}), 7.82 (s, 1H, NH), 7.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_r), 8.69 (t, *J* = 5.6 Hz, 1CONH), 8.82 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 31.2 (C_o), 54.5 (C_d), 55.5 (OCH₃), 65.5 (C_j), 100.1 (C_e), 114.1 (C_m), 126.8, 127.9, 128.6, 128.8, 128.9, 130.0 (C_i), 132.0 (C_i), 134.1 (C_q), 144.6 (C_e), 149.2 (C_b), 152.2 (C_a), 159.4 (C_n), 165.2 (C_i)

HPLC : t_R = 17.2 min. **MS** : *m/z* 472 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 2-oxo-4-phenyl-6-(thiophen-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (112)



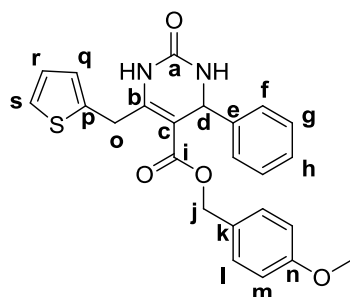
Yield :	10%
Molecular formula :	C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O ₄ S
MW :	420.48 g.mol ⁻¹
Yellow powder	
Mp :	78-80 °C
Rf :	0.20 (cHex/AcOEt 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.73 (s, OCH₃), 4.80 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_j), 4.85 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_j), 5.20 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_d), 6.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_m), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.05-7.07 (m, 1H_q), 7.23-7.25 (m, 1H_p), 7.29-7.38 (m, 5H_{f-g-h}), 7.67 (dd, *J* = 0.8 Hz, *J* = 5.2 Hz, 1H_r), 7.92 (s, 1H, NH), 9.38 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 54.5 (C_d), 55.5 (OCH₃), 65.5 (C_j), 102.4 (C_e), 114.0 (C_m), 126.6 (C_t), 127.3, 128.0, 128.2, 128.7, 129.0 (C_g), 129.8 (C_r), 129.9 (C_i), 134.7 (C_o), 142.0 (C_e), 144.2 (C_b), 152.5 (C_a), 159.3 (C_n), 165.3 (C_i)

HPLC : t_R = 17.3 min. **MS** : *m/z* 421 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 2-oxo-4-phenyl-6-(thiophen-2-ylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (113)



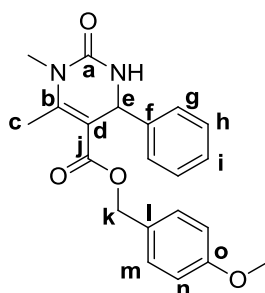
Yield :	14%
Molecular formula :	C ₂₄ H ₂₂ N ₂ O ₄ S
MW :	434.13 g.mol ⁻¹
White powder	
Mp :	140-142 °C
Rf :	0.30 (cHex/AcOEt 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.74 (s, OCH₃), 4.12 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H_o), 4.31 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H_o), 5.00 (s, 2H_j), 5.16 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_d), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 6.93 (dd, *J* = 3.6 Hz, *J* = 5.2 Hz, 1H_r), 6.99 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_q), 7.11-7.17 (m, 4H), 7.24-7.27 (m, 3H), 7.34 (dd, *J* = 0.8 Hz, *J* = 5.2 Hz, 1H_s), 7.78 (s, 1H, NH), 9.44 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.8 (C_p), 54.3 (C_d), 55.5 (OCH₃), 65.5 (C_j), 99.6 (C_e), 114.1 (C_m), 125.3 (C_s), 126.7 (C_f), 126.7 (C_{h/r}), 126.9 (C_{h/r}), 127.9 (C_{k/q}), 128.5 (C_{k/q}), 128.9 (C_g), 130.1 (C_i), 139.9 (C_p), 144.7 (C_e), 150.5 (C_b), 152.5 (C_a), 159.4 (C_n), 165.2 (C_i)

HPLC : t_R = 19.1 min. **MS** : *m/z* 476 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 1,6-dimethyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (114)



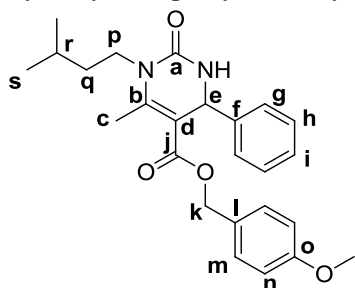
Yield :	71%
Molecular formula :	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₄
MW :	366.41 g.mol ⁻¹
Yellow solid	
Rf :	0.43 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	134-136 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.50 (s, 3H_c), 3.10 (s, NCH₃), 3.74 (s, OCH₃), 5.00 (s, 2H_k), 5.14 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H_e), 6.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 7.15-7.17 (m, 4H_{g-m}), 7.24-7.30 (m, 3H_{h-i}), 7.96 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 16.5 (C_c), 30.2 (NCH₃), 52.7 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.5 (C_k), 102.6 (C_d), 114.2 (C_n), 126.5 (C_g), 127.8 (C_i), 128.7 (C_i), 128.9 (C_h), 130.1 (C_m), 144.3 (C_b), 146.6 (C_f), 151.6 (C_a), 159.4 (C_o), 165.8 (C_j)

HPLC : t_R = 17.6 min. **MS** : *m/z* 367 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 1-isopentyl-6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (115)

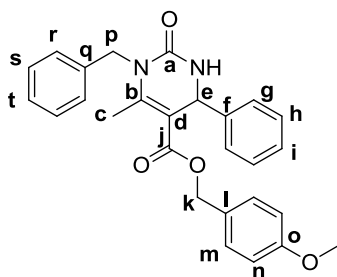


Yield :	7%
Molecular formula :	C ₂₅ H ₃₀ N ₂ O ₄
MW :	422.52 g.mol ⁻¹
White powder	
Rf :	0.71 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	173-175 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.94 (d, *J* = 2.8 Hz, 3H_s), 0.96 (d, *J* = 2.8 Hz, 3H_s), 1.45-1.60 (m, 3H_{q-r}), 2.55 (s, 3H_c), 3.59-3.67 (m, 1H_p), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.91-3.98 (m, 1H_p), 5.02 (s, 2H_k), 5.36 (sl, 2H, 1H_e + NH), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 7.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_m), 7.17-7.20 (m, 2H), 7.26-7.28 (m, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.1 (C_c), 22.3 (C_s), 22.5 (C_s), 26.1 (C_r), 38.5 (C_q), 41.3 (C_p), 54.2 (C_e), 55.3 (OCH₃), 65.9 (C_k), 104.2 (C_d), 113.8 (C_n), 126.3 (C_g), 127.8 (C_i), 128.1 (C_i), 128.7 (C_h), 129.9 (C_m), 143.4 (C_f), 149.2 (C_b), 153.2 (C_a), 159.5 (C_o), 165.9 (C_j)

HPLC : t_R = 24.5 min. **MS** : *m/z* 423 ([M+H]⁺)

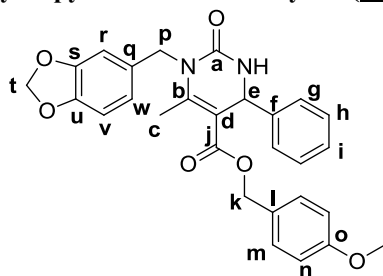
4-Methoxybenzyl 1-benzyl-6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (116)

Yield :	26%
Molecular formula :	C ₂₇ H ₂₆ N ₂ O ₄
MW :	442.51 g.mol ⁻¹
White powder	
Rf :	0.69 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	66-69 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.37 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.84 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H_p), 5.00 (s, 2H_k), 5.10 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H_p), 5.23 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 7.06 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H_s), 7.14-7.28 (m, 10H), 8.15 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.5 (C_c), 46.0 (C_e), 54.0 (C_p), 55.3 (OCH₃), 66.0 (C_k), 104.5 (C_d), 113.8 (C_n), 126.4, 126.4, 127.2, 127.8, 128.0, 128.7, 129.9 (C_m), 137.9 (C_q), 143.1 (C_b), 149.6 (C_f), 153.8 (C_a), 159.5 (C_o), 165.9 (C_j)

HPLC : t_R = 23.0 min. **MS** : *m/z* 443 ([M+H]⁺)

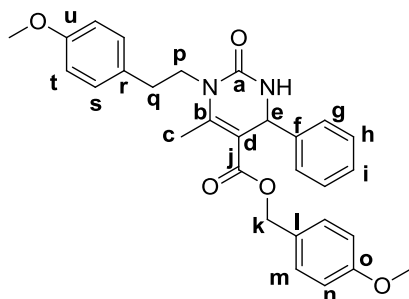
4-Methoxybenzyl 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (117)

Yield :	3%
Molecular formula :	C ₂₈ H ₂₆ N ₂ O ₆
MW :	486.52 g.mol ⁻¹
Yellow powder	
Rf :	0.66 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	154-156 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.48 (s, 3H_c), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 4.81 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H_p), 5.01 (s, 1H_k), 5.02 (s, 1H_k), 5.10 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H_p), 5.43 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 5.71 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, NH), 5.95 (s, 2H_t), 6.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_r), 6.65 (s, 1H_r), 6.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_w), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.18-7.20 (m, 2H_n), 7.26-7.28 (m, 3H_{g-i})

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.5 (C_c), 45.8 (C_p), 54.1 (C_e), 55.3 (OCH₃), 65.9 (C_k), 101.0 (C_t), 104.6 (C_d), 107.2 (C_{r/v}), 108.3 (C_{r/v}), 113.8 (C_n), 119.7 (C_w), 126.4 (C_g), 127.9 (C_{i/l}), 128.0 (C_{i/l}), 128.7 (C_h), 129.9 (C_m), 131.8 (C_q), 143.0 (C_f), 146.8 (C_{s/u}), 148.0 (C_{s/u}), 149.4 (C_b), 153.7 (C_a), 159.5 (C_o), 165.8 (C_j)

HPLC : t_R = 22.1 min. **MS** : *m/z* 487 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 1-(4-methoxyphenethyl)-6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (118)

Yield :	14%
Molecular formula :	C ₂₉ H ₃₀ N ₂ O ₅
MW :	486.56 g.mol ⁻¹
White solid	
Rf :	0.61 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	139-140 °C

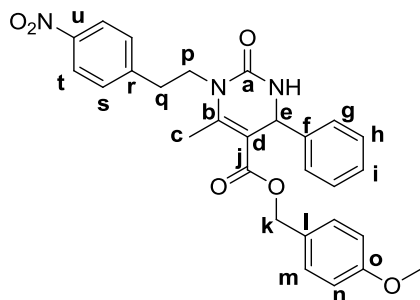
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.50 (s, 3H_c), 2.62-2.80 (m, 2H_q), 3.65-3.72 (m, 1H_p), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.99-4.06 (m, 1H_p), 5.01 (s, 2H_k), 5.17 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_{n/t}), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_{n/t}), 7.10-7.18 (m, 6H_{g-m-s}), 7.27-7.31 (m, 3H_{h/i}), 7.98 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.1 (C_c), 34.9 (C_q), 44.1 (C_e), 53.0 (C_p), 55.5 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 65.5 (C_k), 103.0 (C_d), 114.2 (C_{m/s}), 114.3 (C_{m/s}), 126.6, 127.7, 128.6, 128.8, 130.1, 130.1, 130.9, 144.4 (C_f), 150.3 (C_b), 152.9 (C_a), 158.3 (C_{o/u}), 159.5 (C_{o/u}), 165.9 (C_j)

HPLC : t_R = 23.4 min. **MS** : *m/z* 487 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl carboxylate (119)

1-(4-nitrophenethyl)-6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-



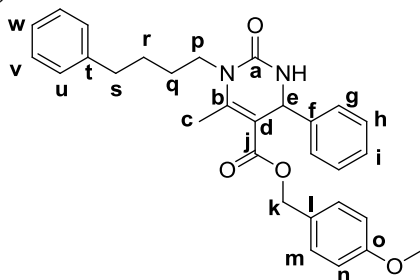
Yield :	0.8%
Molecular formula :	C ₂₈ H ₂₇ N ₃ O ₆
MW :	501.53 g.mol ⁻¹
Yellow powder	
R _f :	0.45 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	144-146 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.52 (s, 3H_c), 2.93-3.10 (m, 2H_q), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.85-3.93 (m, 1H_p), 4.12-4.20 (m, 1H_p), 5.04 (s, 2H_k), 5.40 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_e), 5.53 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H_e), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.14-7.17 (m, 2H_h), 7.28-7.30 (m, 3H_{g/i}), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_s), 8.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_t)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.2 (C_c), 35.9 (C_q), 43.6 (C_p), 54.0 (C_e), 55.3 (OCH₃), 66.1 (C_k), 104.7 (C_d), 113.8 (C_n), 123.8 (C_t), 126.2 (C_g), 127.9 (C_{il}), 127.9 (C_{il}), 128.8 (C_h), 129.7 (C_{m/s}), 130.0 (C_{m/s}), 143.0 (C_i), 145.9 (C_{b/r/u}), 146.9 (C_{b/r/u}), 148.2 (C_{b/r/u}), 153.1 (C_a), 159.6 (C_o), 165.8 (C_j)

HPLC : t_R = 23.1 min. **MS :** *m/z* 502 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1-(4-phenylbutyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (120)



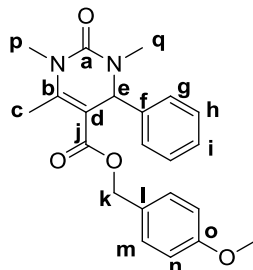
Yield :	15%
Molecular formula :	C ₃₀ H ₃₂ N ₂ O ₄
MW :	484.59 g.mol ⁻¹
White powder	
R _f :	0.71 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	111-113 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.56-1.75 (m, 4H_{q-r}), 2.52 (s, 3H_c), 2.62-2.65 (m, 2H_s), 3.59-3.66 (m, 1H_p), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.91-3.96 (m, 1H_p), 5.02 (s, 2H_k), 5.36 (sl, 2H, 1H_e + NH), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_m), 7.15-7.20 (m, 10H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.2 (C_c), 28.5 (C_{q/r}), 29.4 (C_{q/r}), 35.5 (C_s), 42.6 (C_p), 54.1 (C_e), 55.3 (OCH₃), 65.9 (C_k), 104.2 (C_d), 113.8 (C_n), 125.8 (C_w), 126.3 (C_g), 127.8 (C_{il}), 128.1 (C_{il}), 128.3 (C_{h/v}), 128.3 (C_{h/v}), 128.7 (C_u), 129.9 (C_m), 141.9 (C_{i/t}), 143.3 (C_{i/t}), 149.1 (C_b), 153.2 (C_a), 159.5 (C_o), 165.9 (C_j)

HPLC : t_R = 26.2 min. **MS :** *m/z* 485 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 1,3,6-trimethyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (121)



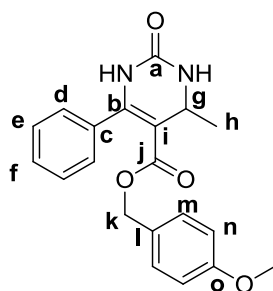
Yield :	35%
Molecular formula :	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄
MW :	380.44 g.mol ⁻¹
Yellow liquid	

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.51 (s, 3H_c), 2.90 (s, 3H_p), 3.28 (s, 3H_q), 3.84 (s, OCH₃), 5.07 (dd, *J*₁ = 12.0 Hz, *J*₂ = 24.0 Hz, 2H_k), 5.23 (s, 1H_e), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.14-7.27 (m, 7H_{g-h-i-m})

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 16.7 (C_c), 31.0 (C_p), 34.4 (C_q), 55.3 (OCH₃), 60.8 (C_e), 65.9 (C_k), 103.3 (C_d), 113.8 (C_n), 126.7 (C_g), 127.8 (C_i), 128.2 (C_i), 128.6 (C_h), 130.1 (C_m), 140.5 (C_i), 149.7 (C_b), 153.7 (C_a), 159.5 (C_o), 165.8 (C_j)

HPLC : t_R = 20.8 min. **MS :** *m/z* 381 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 4-methyl-2-oxo-6-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (122)



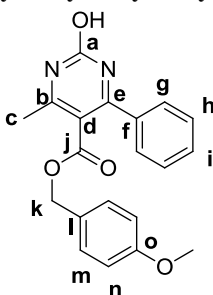
Yield :	36%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₄
MW :	352.38 g.mol ⁻¹
White powder	
Mp :	62-64 °C
Rf :	0.13 (cHex/AcOEt 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.24 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H_h), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.20-4.22 (m, 1H_g), 4.75 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_k), 4.80 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_k), 6.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.23 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H_d), 7.30-7.36 (m, 3H_{e,f}, 1H, NH), 9.10 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 23.7 (C_h), 47.3 (C_g), 55.5 (OCH₃), 65.1 (C_k), 101.8 (C_i), 114.0 (C_n), 128.2 (C_{d/e}), 128.4 (C_{f/l}), 128.7 (C_{d/e}), 129.3 (C_{f/l}), 129.8 (C_m), 135.4 (C_c), 149.0 (C_b), 152.8 (C_a), 159.3 (C_o), 165.4 (C_j)

HPLC : t_R = 14.7 min. **MS** : 353 *m/z* ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 2-hydroxy-4-methyl-6-phenylpyrimidine-5-carboxylate (123)



Yield :	54%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄
MW :	350.37 g.mol ⁻¹
Pale yellow solid	
Mp :	135-138 °C
Rf :	0.10 (cHex/EtOAc 4/6)

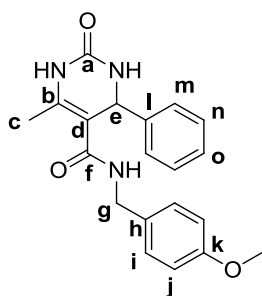
To a solution of **ITB₉** (0.30 mmol), potassium carbonate (0.03 mmol) and cuprous chloride (3 mol%) in anhydrous dichloromethane (1.0 mL) under argon, a solution of *tert*-butyl hydroperoxide (70% in water, 0.60 mmol) solution is added slowly *via* syringe. Upon stirring at 35 °C for 24 h, 1.0 mL of sat. Na₂SO₃ solution is added, then 0.5 mL of sat. NH₄Cl solution. The mixture is vigorously stirred for 5 minutes and, after checking for peroxides, organic layer is concentrated *in vacuo*. The residue is then purified by chromatography on silica gel (cHex/AcOEt) to afford title compound.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.39 (s, 3H_c), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.91 (s, 2H_k), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 6.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H_m), 7.42-7.44 (m, 4H_{g-h}), 7.48-7.52 (m, 1H_i), 12.40 (sl, OH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 55.5 (OCH₃), 67.1 (C_k), 114.0 (C_n), 127.1 (C_i), 128.0 (C_g), 128.8 (C_h), 130.6 (C_m), 130.7 (C_i), 159.6 (C_o), 166.3 (C_j)

HPLC : t_R = 11.9 min. **MS** : 351 *m/z* ([M+H]⁺)

N-(4-methoxybenzyl)-6-methyl-2-oxo-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxamide (124)



Yield :	59%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₃
MW :	351.40 g.mol ⁻¹
Yellow powder	
R _f :	0.25 (DCM/Methanol 95/5)
Mp :	153-155 °C

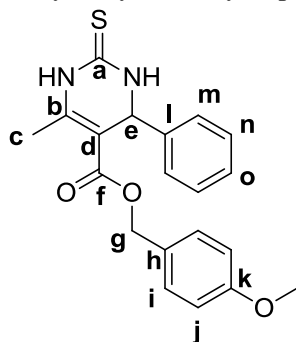
In a 10 mL microwave vial, acid **77** (0.86 mmol), 4-methoxybenzylamine (0.86 mmol), EDCI.HCl (1.29 mmol) and diisopropylamine (1.29 mmol) were dissolved in dimethylacetamide (5.0 mL). The mixture was then microwaved for 15 minutes at 110 °C. 10 mL 1M aqueous HCl were added and the mixture was extracted with 3 x 20 mL ethyl acetate. Organic layer was concentrated *in vacuo* and the residue was purified by chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol) to yield title compound.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.00 (s, 3H_c), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 4.15 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H_g), 5.28 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H_e), 6.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_j), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_i), 7.22-7.33 (m, 5H_{m-n-o}), 7.49 (s, 1H, NH), 8.06 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, CONH), 8.55 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 17.4 (C_c), 42.0 (C_g), 55.4 (C_e), 55.5 (OCH₃), 105.4 (C_d), 113.9 (C_j), 126.9 (C_m), 127.7 (C_o), 128.7 (C_{j/n}), 128.8 (C_{j/n}), 132.1 (C_n), 137.8 (C_l), 144.7 (C_b), 153.1 (C_a), 158.4 (C_k), 166.7 (C_f)

HPLC : t_R = 7.7 min. **MS** : *m/z* 352 ([M+H]⁺)

4-Methoxybenzyl 6-methyl-4-phenyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (125)



Yield :	18%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃ S
MW :	368.45 g.mol ⁻¹
White solid	
R _f :	0.77 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	174-175 °C

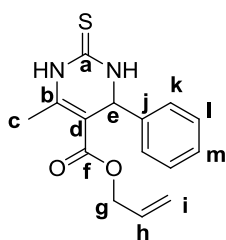
A solution of **127** (0.83 mmol), 4-methoxybenzyl alcohol (1.67 mmol), EDCI.HCl (1.25 mmol) and DMAP (0.83 mmol) in anhydrous dimethylacetamide (6.0 mL) under argon is heated at 80 °C for 5 hours. *In vacuo* concentration of the mixture and purification by HPLC afforded title compound.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.29 (s, 3H_c), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.98 (dd, *J*₁ = 12.0 Hz, *J*₂ = 18.4 Hz, 2H_g), 5.16 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_e), 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_j), 7.13 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_i), 7.15-7.17 (m, 2H), 7.28-7.32 (m, 3H), 9.66 (s, 1H, NH), 10.37 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 17.6 (C_c), 54.4 (C_e), 55.5 (OCH₃), 65.5 (C_g), 100.8 (C_d), 114.1 (C_j), 126.8, 128.2, 128.5, 129.0, 130.1, 143.7 (C_l), 146.0 (C_b), 159.4 (C_k), 165.4 (C_f), 174.6 (C_a)

HPLC : t_R = 18.4 min. **MS** : *m/z* 369 ([M+H]⁺)

Allyl 6-methyl-4-phenyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (126)



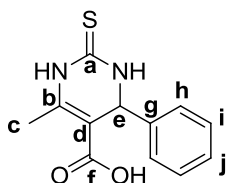
Yield :	52%
Molecular formula :	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₂ S
MW :	288.36 g.mol ⁻¹
Yellow solid	
Rf :	0.82 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	147-149 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.32 (s, 3H_c), 4.47-4.57 (m, 2H_g), 5.07-5.10 (m, 1H_i), 5.11-5.13 (m, 1H_i), 5.20 (d, J = 3.6 Hz, 1H_e), 5.80-5.87 (m, 1H_h), 7.22-7.37 (m, 5H_{k-l-m}), 9.69 (s, 1H, NH), 10.40 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 17.2 (C_c), 53.9 (C_e), 64.0 (C_g), 100.2 (C_d), 117.2 (C_i), 126.4 (C_k), 127.7 (C_m), 128.6 (C_l), 132.7 (C_h), 143.3 (C_j), 145.7 (C_b), 164.7 (C_f), 174.2 (C_a)

MS : m/z 289 ([M+H]⁺)

6-Methyl-4-phenyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylic acid (127)



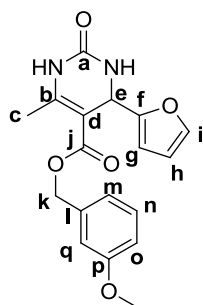
Yield :	35%
Molecular formula :	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂ S
MW :	248.30 g.mol ⁻¹
Yellow powder	

To a solution of **126** (2.4 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (5.5 mL) under argon, diethylamine (24.3 mmol) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) (0.24 mmol) are added. The mixture is then stirred at room temperature for 4 h. Excess solvent is removed *in vacuo* and the residue taken up in 0.5 M aqueous KOH (20 mL). Filtration on a Celite pad and subsequent acidification of the filtrate with concentrated HCl resulted in precipitation of title compound.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.28 (s, 3H_c), 5.15 (d, J = 3.6 Hz, 1H_e), 7.22-7.37 (m, 5H_{h-i-j}), 9.60 (s, 1H, NH), 10.26 (s, 1H, NH), 12.25 (bs, COOH)

MS : m/z 249 ([M+H]⁺)

3-Methoxybenzyl 4-(furan-2-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (128)



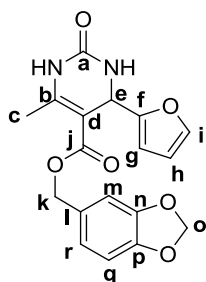
Yield :	70%
Molecular formula :	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₅
MW :	342.35 g.mol ⁻¹
Orange solid	
Rf :	0.35 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	165-166 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.38 (s, 3H_c), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 5.07 (d, J = 12.8 Hz, 1H_k), 5.13 (d, J = 12.8 Hz, 1H_k), 5.52 (m, 1H_e + 1H, NH), 6.09 (d, J = 3.2 Hz, 1H_g), 6.25-6.27 (m, 1H_h), 6.78-6.85 (s, 3H_{m-o-q}), 7.21-7.32 (m, 2H_{i-n} + 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 19.1 (C_c), 49.1 (C_e), 55.4 (OCH₃), 66.1 (C_k), 89.1 (C_d), 106.4 (C_{g/h}), 110.5 (C_{g/h}), 113.5, 113.7, 120.3, 129.8, 137.8 (C_l), 142.7 (C_i), 154.7 (C_b), 157.1 (C_a), 159.9 (C_p), 171.8 (C_j)

HPLC : t_R = 13.4 min. **MS :** m/z 343 ([M+H]⁺). **HRMS :** calculated 341.1137 found 341.1140 ([M-H]⁻)

Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl 4-(furan-2-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (129)



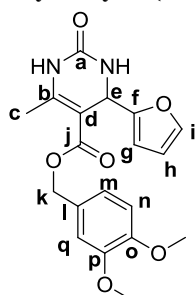
Yield :	63%
Molecular formula :	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₆
MW :	356.33 g.mol ⁻¹
White solid	
Mp :	169-171 °C
Rf :	0.30 (cHex/EtOAc 4/6)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.24 (s, 3H_c), 4.97 (dd, J₁ = 12.4 Hz, J₂ = 16.4 Hz, 2H_k), 5.21 (d, J = 3.2 Hz, 1H_e), 6.00 (s, 2H_o), 6.05 (d, J = 3.2 Hz, 1H_g), 6.34-6.35 (m, 1H_h), 6.76 (d, J = 8.0 Hz, 1H_{q/r}), 6.81 (s, 1H_m), 6.86 (d, J = 8.0 Hz, 1H_{q/r}), 7.54 (d, J = 0.8 Hz, 1H_i), 7.77 (s, NH), 9.30 (s, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_c), 48.1 (C_e), 65.3 (C_k), 96.8 (C_d), 101.4 (C_o), 105.8 (C_{g/h}), 108.5 (C_{m/q}), 108.8 (C_{g/n}), 110.8 (C_{m/q}), 122.0 (C_r), 130.7 (C_i), 142.6 (C_i), 147.3 (C_{n/p}), 147.7 (C_{n/p}), 150.5 (C_b), 152.7 (C_a), 156.3 (C_f), 165.2 (C_j)

HPLC : t_R = 12.7 min. **MS** : 357 m/z ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 355.0930 found 355.0930 ([M-H]⁻)

3,4-Dimethoxybenzyl 4-(furan-2-yl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (130)



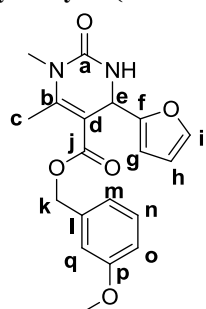
Yield :	73%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₆
MW :	372.37 g.mol ⁻¹
Yellow solid	
Mp :	72-75 °C
Rf :	0.22 (cHex/EtOAc 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.31 (s, 3H_c), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 5.10 (d, J = 12.8 Hz, 1H_k), 5.15 (d, J = 13.2 Hz, 1H_k), 5.48 (d, J = 2.8 Hz, 1H_e), 6.04 (d, J = 3.2 Hz, 1H_g), 6.17-6.19 (m, 1H_h), 6.52 (s, 1H, NH), 6.72-6.75 (m, 3H_{m-n-q}), 7.24 (s, 1H_i), 8.94 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 18.5 (C_c), 48.8 (C_e), 55.8 (OCH₃), 56.0 (OCH₃), 61.4 (C_k), 98.3 (C_d), 106.1 (C_g), 110.3 (C_h), 111.5 (C_{m/n/q}), 113.6 (C_{m/n/q}), 115.3 (C_{m/n/q}), 125.6 (C_i), 142.4 (C_i), 148.7 (C_o), 151.6 (C_f), 153.5 (C_b), 154.7 (C_{a/p}), 154.9 (C_{a/p}), 165.4 (C_j)

HPLC : t_R = 13.8 min. **MS** : m/z 373 ([M+H]⁺)

3-Methoxybenzyl 4-(furan-2-yl)-1,6-dimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (131)

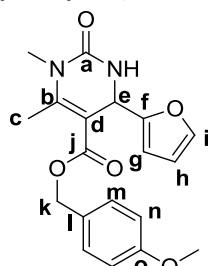


Yield :	51%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₅
MW :	356.37 g.mol ⁻¹
Yellow solid	
Rf :	0.27 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	155-156 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.51 (s, 3H_c), 3.18 (s, 3H, NCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.06 (d, J = 8.4 Hz, 1H_k), 5.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H_k), 5.45 (d, J = 2.8 Hz, 1H_e), 6.01-6.02 (d, J = 2.8 Hz, 1H, NH), 6.07 (d, J = 2.8 Hz, 1H_g), 6.20-6.22 (m, 1H_h), 6.77-6.82 (m, 3H_{m-o-q}), 7.19-7.23 (m, 1H_n), 7.26 (s, 1H_n)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.7 (C_c), 30.5 (NCH₃), 47.6 (C_e), 55.3 (OCH₃), 66.0 (C_k), 101.2 (C_d), 105.9 (C_g), 110.3 (C_h), 113.4 (C_{o/q}), 113.7 (C_{o/q}), 120.2 (C_m), 129.6 (C_n), 137.8 (C_i), 142.4 (C_i), 151.8 (C_f), 154.5 (C_b), 154.9 (C_a), 159.8 (C_p), 165.5 (C_j)

HPLC : t_R = 16.3 min. **MS** : m/z 357 ([M+H]⁺)

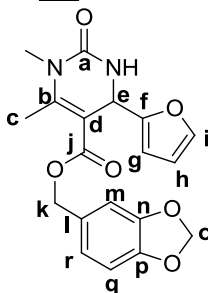
4-Methoxybenzyl 4-(furan-2-yl)-1,6-dimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (132)

Yield :	49 %
Molecular formula :	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₅
MW :	356.37 g.mol ⁻¹
Yellow solid	
Mp :	112-113 °C
Rf :	0.28 (cHex/EtOAc 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.49 (s, 3H_c), 3.15 (s, 3H, NCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 5.03 (s, 1H_k), 5.04 (s, 1H_k), 5.41 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H_e), 5.97 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_g), 6.15-6.19 (m, 1H_h), 6.32 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, NH), 6.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 7.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_m), 7.24 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H_i)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.6 (C_c), 30.4 (NCH₃), 47.6 (C_e), 55.3 (OCH₃), 65.9 (C_k), 101.3 (C_d), 105.8 (C_g), 110.2 (C_h), 113.9 (C_n), 128.3 (C_i), 129.8 (C_m), 142.3 (C_i), 151.4 (C_f), 154.5 (C_b), 155.0 (C_a), 159.5 (C_o), 165.6 (C_j)

HPLC : t_R = 16.1 min. **MS** : *m/z* 357 ([M+H]⁺)

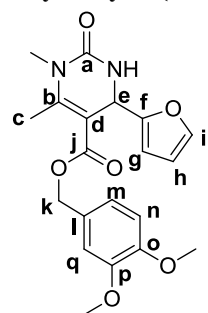
Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl carboxylate (133)**4-(furan-2-yl)-1,6-dimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-**

Yield :	30%
Molecular formula :	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₆
MW :	370.36 g.mol ⁻¹
Yellow solid	
Rf :	0.42 (cHex/EtOAc 4/6)
Mp :	141-143 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.49 (s, 3H_c), 3.10 (s, 3H, NMe), 5.00 (s, 2H_k), 5.21 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H_e), 6.01 (s, 2H_o), 6.05 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_g), 6.34-6.35 (m, 1H_h), 6.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_{q/r}), 6.82 (s, 1H_m), 6.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_{q/r}), 7.54 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H_i), 7.96 (d, *J* = 4.0 Hz, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 16.5 (C_c), 30.3 (NMe), 46.9 (C_e), 65.6 (C_k), 100.2 (C_d), 101.5 (C_o), 105.9 (C_g), 108.5 (C_{m/q}), 108.9 (C_{g/h}), 110.8 (C_h), 122.1 (C_r), 130.5 (C_l), 142.7 (C_i), 147.4 (C_{n/p}), 147.7 (C_{n/p}), 152.7 (C_b), 153.6 (C_a), 155.9 (C_f), 165.4 (C_j)

HPLC : t_R = 15.7 min. **MS** : *m/z* 371 ([M+H]⁺)

3,4-Dimethoxybenzyl 4-(furan-2-yl)-1,6-dimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (134)

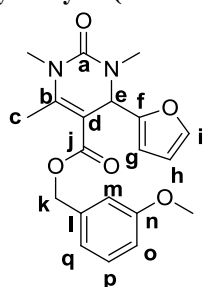
Yield :	48%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₆
MW :	386.40 g.mol ⁻¹
Yellow solid	
Rf :	0.28 (cHex/AcOEt 1/1)
Mp :	137-139 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.51 (s, 3H_c), 3.18 (s, 3H, NCH₃), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 5.12 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.17 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H_k), 5.45 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_e), 6.00-6.02 (m, 1H_g + 1H, NH), 6.19-6.20 (m, 1H_h), 6.74-6.79 (m, 3H_{m-n-q}), 7.25 (s, 1H_i)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.6 (C_c), 30.5 (NCH₃), 47.7 (C_e), 55.9 (OCH₃), 56.0 (OCH₃), 61.6 (C_k), 101.5 (C_d), 105.9 (C_g), 110.3 (C_h), 111.5 (C_{m/n/q}), 113.7 (C_{m/n/q}), 115.3 (C_{m/n/q}), 125.6 (C_i), 142.4 (C_i), 151.4 (C_f), 151.6 (C_{o/p}), 153.5 (C_{o/p}), 154.5 (C_b), 154.9 (C_a), 165.6 (C_j)

HPLC : t_R = 16.6 min. **MS** : *m/z* 387 ([M+H]⁺)

3-Methoxybenzyl 4-(furan-2-yl)-1,3,6-trimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (135**)**



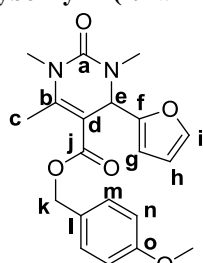
Yield :	43%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₅
MW :	370.40 g.mol ⁻¹
Yellow oil	
R _f :	0.31 (cHex/AcOEt 6/4)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.50 (s, 3H_c), 2.97 (s, 3H, NCH₃), 3.21 (s, 3H, NCH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 5.05 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_k), 5.13 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.32 (s, 1H_e), 6.03 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_g), 6.21-6.23 (m, 1H_h), 6.79-6.82 (m, 3H_{m-o,q}), 7.20-7.24 (m, 1H_p), 7.27 (s, *J* = 0.8 Hz, 1H_i)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.7 (C_c), 31.3 (NCH₃), 34.9 (NCH₃), 54.4 (C_e), 55.3 (OCH₃), 66.0 (C_k), 100.3 (C_d), 107.0 (C_g), 110.2 (C_h), 113.4 (C_{m/o}), 113.7 (C_{m/o}), 120.2 (C_q), 129.7 (C_p), 137.9 (C_i), 142.5 (C_i), 151.8 (C_i), 153.3 (C_b), 154.1 (C_a), 159.9 (C_n), 165.4 (C_j)

HPLC : t_R = 19.3 min. **MS** : *m/z* 371 ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 371.1607 found 371.1595 ([M+H]⁺).

4-Methoxybenzyl 4-(furan-2-yl)-1,3,6-trimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (136**)**



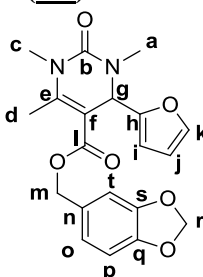
Yield :	46%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₅
MW :	370.40 g.mol ⁻¹
Yellow oil	
R _f :	0.46 (cHex/AcOEt 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.48 (s, 3H_c), 2.96 (s, 3H, NCH₃), 3.20 (s, 3H, NCH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 5.02 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_k), 5.08 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 5.28 (s, 1H_e), 6.00 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_g), 6.22-6.23 (m, 1H_h), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 7.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_m), 7.26 (s, *J* = 0.8 Hz, 1H_i)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.7 (C_c), 31.3 (NCH₃), 34.9 (NCH₃), 54.5 (C_e), 55.4 (OCH₃), 66.0 (C_k), 100.5 (C_d), 107.0 (C_g), 110.2 (C_h), 114.0 (C_n), 128.5 (C_i), 129.9 (C_m), 142.5 (C_i), 151.5 (C_f), 153.3 (C_b), 154.1 (C_a), 159.6 (C_o), 165.6 (C_j)

HPLC : t_R = 19.1 min. **MS** : *m/z* 371 ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 371.1607 found 371.1592 ([M+H]⁺).

Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl carboxylate (137**)**



4-(furan-2-yl)-1,3,6-trimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-

Yield :	70%
Molecular formula :	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₆
MW :	384.38 g.mol ⁻¹
Brown oil	
R _f :	0.55 (cHex/EtOAc 4/6)

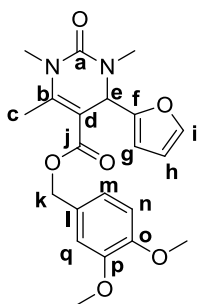
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.51 (s, 3H_d), 2.99 (s, 3H_c), 3.23 (s, 3H_a), 5.00 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_m), 5.08 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 5.32 (s, 1H_g), 5.94 (s, 2H_r), 6.05 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_i), 6.25-6.26 (m, 1H_j), 6.74-6.75 (m, 3H_{o-p,t}), 7.30 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H_k)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.5 (C_d), 31.1 (C_c), 34.7 (C_a), 54.2 (C_g), 65.9 (C_m), 100.2 (C_f), 101.1 (C_r), 106.8 (C_i), 108.1 (C_j), 108.7 (C_{p/t}), 110.1 (C_{p/t}), 121.8 (C_o), 130.0 (C_n), 142.3 (C_e), 147.4 (C_{q/s}), 147.7 (C_{q/s}), 151.5 (C_k), 153.1 (C_h), 153.9 (C_b), 165.3 (C_l)

HPLC : t_R = 18.5 min. **MS** : *m/z* 385 ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 385.1400 found 385.1386 ([M+H]⁺)

Compound **137** (7 batches of 0.60 mg each) was applied to a 250 × 4.6 mm Chiralpak AD column (DAICEL) equilibrated with nHex/EtOH = 70/30. (*R*)-**137** (1.71 mg, t_R = 7.50 min) and (*S*)-**137** (1.71 mg, t_R = 18.3 min) were isolated and further HPLC analysis of separated enantiomers showed > 99% purity. (*S*)-**137** and (*R*)-**137** did not racemize after 4 months at -20 °C in 20 mM DMSO.

3,4-Dimethoxybenzyl 4-(furan-2-yl)-1,3,6-trimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (138)



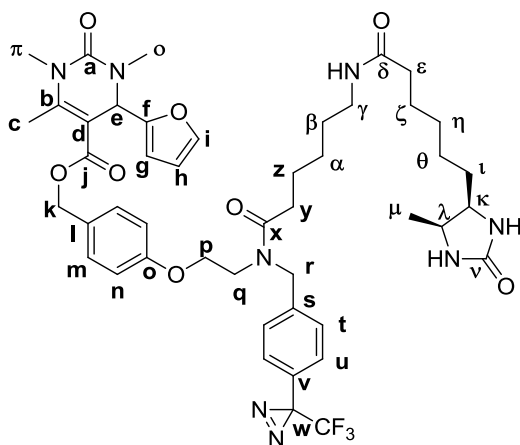
Yield :	44%
Molecular formula :	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₆
MW :	400.43 g.mol ⁻¹
White solid	
R _f :	0.28 (cHex/AcOEt 6/4)
Mp :	122-124 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.50 (s, 3H_c), 2.98 (s, 3H, NCH₃), 3.21 (s, 3H, NCH₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.11 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H_k), 5.19 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_k), 5.32 (s, 1H_e), 6.04 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_g), 6.21-6.22 (m, 1H_h), 6.77-6.78 (m, 3H_{m-n-q}), 7.26 (s, *J* = 0.8 Hz, 1H_i)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.7 (C_e), 30.4 (NCH₃), 34.9 (NCH₃), 54.5 (C_e), 55.9 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 61.6 (C_k), 100.7 (C_d), 107.0 (C_g), 110.2 (C_h), 111.6 (C_{m/n/q}), 113.7 (C_{m/n/q}), 115.4 (C_{m/n/q}), 125.8 (C_i), 142.5 (C_i), 151.5 (C_f), 151.7 (C_{o/p}), 153.3 (C_{o/p}), 153.6 (C_b), 154.2 (C_a), 165.6 (C_j)

HPLC : t_R = 19.5 min. **MS** : *m/z* 401 ([M+H]⁺)

4-(2-(6-(6-((4*R*, 5*S*)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexanamido)-*N*-(4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl) benzyl)hexanamido)ethoxy)benzyl 4-(furan-2-yl)-1,3,6-trimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (139)



Yield :	55%
Molecular formula :	C ₄₆ H ₅₇ F ₃ N ₈ O ₈
MW :	906.99 g.mol ⁻¹

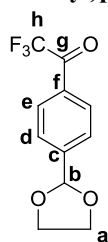
White solid

Compound **155** (0.08 mmol), **141** (0.16 mmol) and HATU (0.16 mmol) were dissolved in 1 mL DMSO. Diisopropylamine (0.32 mmol) was then added and the mixture was stirred at room temperature for 16 hours. DCM (25 mL) was then added and the organic layer was washed twice with sat. aq. NaHCO₃ (5 mL). After drying on Na₂SO₄ and removal of excess solvent, a yellow oil was obtained. Subsequent chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 100/0 to 95/5) afforded title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.09 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H_μ), 1.23-1.71 (m, 14H_{z-α-β-ζ-η-θ-ι}), 2.13-2.16 (m, 2H_ε), 2.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H_γ), 2.49-2.54 (m, 4H_{ε-γ}), 2.97 (s, 3H_π), 3.16-3.26 (m, 5H_{γ-ο}), 3.65-3.73 (m, 3H_{ρ-q}), 3.79-3.85 (m, 1H_q), 3.98 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H_κ), 4.10-4.13 (m, 1H_λ), 4.70 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H_τ), 4.89 (bs, 1H, NH), 5.04-5.10 (m, 2H_κ), 5.48 (bs, 1H, NH), 6.00-6.14 (m, 2H_{ε-φ}), 6.23-6.24 (m, 1H_h), 6.72-6.77 (m, 2H), 7.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.15-7.21 (m, 4H), 7.22-7.28 (bs, 3H, 2H + CONH)

MS : *m/z* 908 ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 907.4330 found 907.4365

1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2,2,2-trifluoroethanone (144)



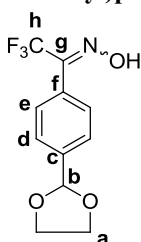
Yield : 35%
 Molecular formula : $C_{11}H_9F_3O_3$
 MW : 246.18 $g \cdot mol^{-1}$
 White powder

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.05-4.14 (m, 4H_a), 5.90 (s, 1H_b), 7.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H_e), 8.06 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H_d)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 65.5 (C_a), 104.0 (C_b), 126.6 (C_d), 128.6 (C_e), 129.4 (C_f), 138.1 (C_c), 192.6 (C_g)

MS : m/z 491 ($[2M-H]^+$)

1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2,2,2-trifluoroethanone-oxime (145)



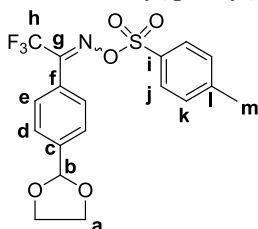
Yield : 60%
 Molecular formula : $C_{11}H_{10}F_3NO_3$
 MW : 261.20 $g \cdot mol^{-1}$
 Grey solid

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (mix of diastereomers) 4.04-4.15 (4H_a), 5.86 (s, 0.45H_b), 5.86 (s, 0.55H_b), 7.52-7.54 (m, 3H_{d-e}), 7.58-7.60 (m, 1H_{d-e})

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 65.6 (C_a), 103.3 (C_b), 123.4 (q, $J = 258.8$ Hz, C_h), 126.7 (C_e), 127.5 (C_f), 129.0 (C_d), 140.3 (C_c), 148.9 (C_g)

MS : m/z 260 ($[M-H]^+$)

1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2,2,2-trifluoroethanone-O-tosyl oxime (146)

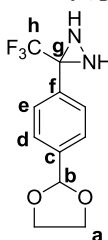


Yield : 55%
 Molecular formula : $C_{18}H_{16}F_3NO_5S$
 MW : 415.38 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.48 (s, 3H_m), 4.04-4.14 (4H_a), 5.86 (1H_b), 7.38-7.42 (m, 4H_{j-k}), 7.59 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H_e), 7.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H_d)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (mix of diastereomers) 21.8 (C_m), 21.8 (C_m), 63.7 (C_a), 65.4 (C_a), 102.7 (C_b), 125.2, 126.8, 128.5, 129.2, 129.3, 129.3, 129.8, 129.9, 130.0, 131.1, 131.2, 141.7 (C_c), 146.2 (C_i), 146.4 (C_i), 191.0 (C_g)

3-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-3-(trifluoromethyl)diaziridine (147)



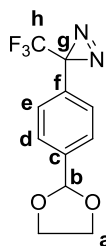
Yield : 97%
 Molecular formula : $C_{11}H_{11}F_3N_2O_2$
 MW : 260.21 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.23 (d, $J = 8.8$ Hz, 1NH), 2.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 1NH), 4.05-4.16 (m, 4H_a), 5.86 (s, 1H_b), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H_e), 7.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H_d)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 65.6 (C_a), 103.2 (C_b), 127.1 (C_e), 128.4, 129.0, 129.5, 130.1 (C_d), 131.8 (C_f)

MS : m/z 261 ($[M+H]^+$)

3-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-3-(trifluoromethyl)-3H-diazirine (148)



Yield : 73%
Molecular formula : C₁₁H₉F₃N₂O₂
MW : 258.20 g.mol⁻¹

Colorless liquid

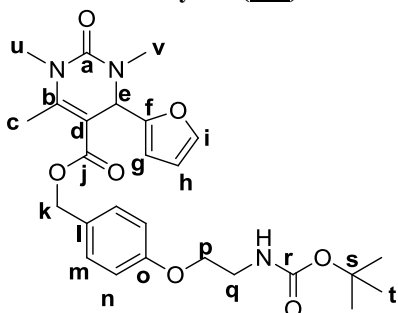
R_f : 0.53 (cHex/AcOEt 1/1)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4.04-4.14 (m, 4H_a), 5.84 (s, 1H_b), 7.23 (d, J = 8.0 Hz, 2H_c), 7.53 (d, J = 8.4 Hz, 2H_d)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 65.6 (C_a), 103.0 (C_b), 126.7 (C_{d/e}), 127.1 (C_{d/e}), 130.1 (C_c), 139.9 (C_f)

MS : m/z 257 ([M-H]⁻)

4-(2-((Tert-butoxycarbonyl)amino)ethoxy)benzyl 4-(furan-2-yl)-1,3,6-trimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (149)



Yield : 38%
Molecular formula : C₂₆H₃₃N₃O₇
MW : 499.56 g.mol⁻¹
Yellow oil

R_f : 0.45 (cHex/AcOEt 45/55)

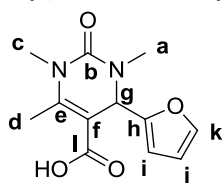
Triphenylphosphine (3.25 mmol) and acid **151** (2.5 mmol) were dissolved in THF (5 mL) under argon atmosphere. A solution of **152** (3.0 mmol) in THF (5 mL) was then added and the mixture was cooled to 0 °C. DIAD (3.75 mmol) was slowly added *via* syringe and the mixture was stirred for 2 hours at 0 °C and 5 hours at room temperature. In order to get rid of excess alcohol, excess solvent was removed *in vacuo* and the residue taken up in 10 mL dichloromethane. PCC (0.55 mmol) was added portionwise and the mixture was stirred at room temperature for 1.5 hours. Filtration on a Celite pad and subsequent concentration of the filtrate afforded a yellow residue, which was further purified by chromatography (SiO₂, cHex/AcOEt 95/5 to 55/45) to yield title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.45 (s, 9H_t), 2.51 (s, 3H_c), 2.98 (s, 3H_v), 3.23 (s, 3H_u), 3.50-3.55 (m, 2H_q), 4.02 (t, J = 5.0 Hz, 2H_p), 4.98 (bs, 1NH), 5.03 (d, J = 12.4 Hz, 1H_k), 5.10 (d, J = 12.4 Hz, 1H_k), 5.30 (s, 1H_e), 6.03 (d, J = 2.8 Hz, 1H_g), 6.20-6.30 (m, 1H_h), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 2H_n), 7.20 (d, J = 8.4 Hz, 2H_m), 7.29 (s, 1H_i)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.8 (C_c), 28.6 (C_t), 31.3 (C_u), 34.9 (C_v), 40.3 (C_q), 54.5 (C_e), 66.0 (C_k), 67.4 (C_p), 77.4 (C_s), 100.5 (C_d), 107.0 (C_g), 110.3 (C_h), 114.6 (C_n), 129.0 (C_i), 130.0 (C_m), 142.5 (C_i), 151.6 (C_b), 153.3 (C_f), 154.2 (C_a), 156.1 (C_r), 158.7 (C_o), 165.6 (C_j)

MS : m/z 522 ([M+Na]⁺). HRMS : calculated 498.2240 found 498.2245 ([M-H]⁻)

4-(Furan-2-yl)-1,3,6-trimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylic acid (151)



Yield : 98%
Molecular formula : C₁₂H₁₄N₂O₄
MW : 250.25 g.mol⁻¹

White solid

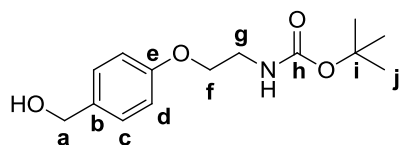
Compound **153** (10.4 mmol), 10% w/w Pd/C (0.52 mmol) and ammonium formate (17.78 mmol) were dissolved in methanol (50 mL) under argon atmosphere. After stirring for 2.5 hours at room temperature, the mixture was filtered on a Celite pad and filtrate concentrated to yield title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.54 (s, 3H_d), 3.04 (s, 3H_c), 3.26 (s, 3H_a), 5.33 (s, 1H_g), 6.15 (d, J = 2.8 Hz, 1H_i), 6.28-6.29 (m, 1H_j), 7.32 (s, 1H_k)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.8 (C_d), 31.3 (C_c), 34.8 (C_a), 54.0 (C_g), 99.4 (C_f), 106.9 (C_i), 110.1 (C_j), 142.4 (C_k), 152.8 (C_h), 153.6 (C_{b/e}), 153.8 (C_{b/e}), 170.5 (C_f)

MS : m/z 249 ([M-H]⁻)

Tert-butyl (2-(4-hydroxymethyl)phenoxy)ethyl)carbamate (152)



Yield : 62%
Molecular formula : $C_{14}H_{21}NO_4$
MW : 267.32 $g \cdot mol^{-1}$

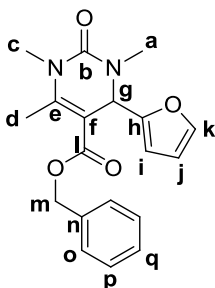
White wax
Rf : 0.26 (cHex/AcOEt 6/4)

4-(Hydroxymethyl)phenol (5.0 mmol), *N*-Boc-2-bromoethylamine (12.5 mmol) and cesium carbonate (10.0 mmol) were dissolved in acetonitrile (50 mL) and refluxed for 4 hours. Filtration and removal of excess solvent gave a pink residue, which was further purified by chromatography (SiO₂, cHex/AcOEt 65/35 to 40/60) to yield title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.47 (s, 9H_i), 3.52-3.54 (m, 2H_g), 4.02 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H_f), 4.63 (s, 2H_a), 5.01 (bs, 1H, NH), 6.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_d), 7.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_c)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 28.4 (C_j), 40.1 (C_g), 64.9 (C_a), 67.2 (C_f), 79.6 (C_i), 114.5 (C_d), 128.7 (C_c), 133.6 (C_b), 155.9 (C_h), 158.1 (C_e)

Benzyl 4-(furan-2-yl)-1,3,6-trimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (153)



Yield : 55%
Molecular formula : $C_{19}H_{20}N_2O_4$
MW : 340.37 $g \cdot mol^{-1}$

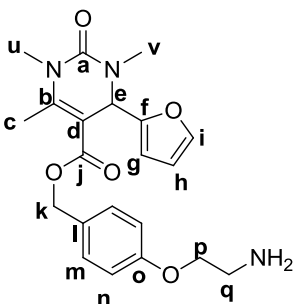
Pale yellow solid
Mp : 135-138 °C
Rf : 0.10 (cHex/EtOAc 4/6)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.55 (s, 3H_d), 3.02 (s, 3H_e), 3.26 (s, 3H_a), 5.13 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_m), 5.21 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H_m), 5.35 (s, 1H_g), 6.06 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_i), 6.27-6.28 (dd, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 3.0 Hz, 1H_j), 7.27-7.36 (m, 6H_{k-o-p-q})

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.6 (C_d), 31.1 (C_e), 34.7 (C_a), 54.3 (C_g), 66.0 (C_m), 100.2 (C_f), 106.8 (C_i), 110.1 (C_j), 127.9 (C_o), 128.0 (C_q), 128.5 (C_p), 136.2 (C_n), 142.3 (C_k), 151.6 (C_{b/e/h}), 153.1 (C_{b/e/h}), 153.9 (C_{b/e/h}), 165.4 (C_l)

MS : *m/z* 341 ([M+H]⁺)

4-(2-Aminoethoxy)benzyl 4-(furan-2-yl)-1,3,6-trimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (154)

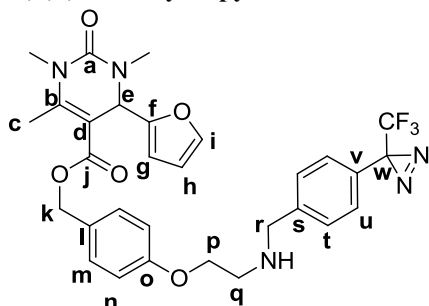


Molecular formula : $C_{21}H_{25}N_3O_5$
MW : 435.90 $g \cdot mol^{-1}$
Yellow oil
Rf : 0.45 (cHex/AcOEt 45/55)

Compound **149** (0.80 mmol) was dissolved in a cooled (0 °C) solution of 3M HCl in dioxane (16 mL) and the mixture was stirred below 10 °C for 2.5 hours. Aq. Na₂CO₃ was then added until pH 12 and the aqueous mixture was extracted by dichloromethane (3 x 50 mL). Upon drying and removal of excess solvent, title compound was obtained as a free base.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.48 (s, 3H_e), 2.86 (s, 3H_v), 3.13 (s, 3H_u), 3.15-3.25 (m, 2H_q), 4.16-4.18 (m, 2H_p), 5.01 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 5.09 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_k), 5.32 (s, 1H_e), 6.15 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H_g), 6.69 (dd, *J*₁ = 1.8 Hz, *J*₂ = 3.0 Hz, 1H_n), 6.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 7.57 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H_i), 8.17 (bs, 2H, NH)

MS : *m/z* 436 ([M+H]⁺)

4-(2-((4-(3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzyl)amino)ethoxy)benzyl 4-(furan-2-yl)-1,3,6-trimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**155**)

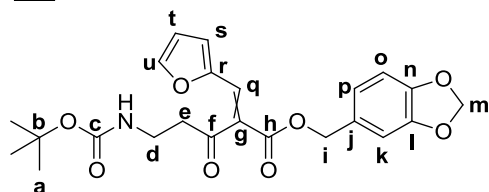
Yield : 35%
 Molecular formula : C₃₀H₃₀F₃N₅O₅
 MW : 597.58 g.mol⁻¹

Yellow liquid

Compounds **142** (0.29 mmol) and **154** (0.26 mmol) were dissolved in dichloromethane (5 mL). After stirring for 10 minutes at room temperature, NaBH(OAc)₃ (0.78 mmol) was added and the mixture was stirred in the dark for one night at room temperature. Aq. NaHCO₃ (5 mL) was added, layers were separated and aqueous layer was extracted twice more by methylene chloride (5 mL). Subsequent drying (Na₂SO₄) and concentration of organic layers gave a yellow solid, which was further purified by chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 99/1 to 90/10) to afford title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.51 (s, 3H_c), 2.98-3.01 (m, 5H, 2H_q + NCH₃), 3.23 (3H, NCH₃), 3.88 (s, 2H_r), 4.08 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H_p), 5.04 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 5.10 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 5.30 (s, 1H_e), 6.02 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H_g), 6.24-6.25 (m, 1H_h), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_n), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_{t/u}), 7.19 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_{t/u}), 7.28 (bs, 1H_i), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H_m)

MS : *m/z* 598 ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 598.2277 found 598.2271 ([M+H]⁺)

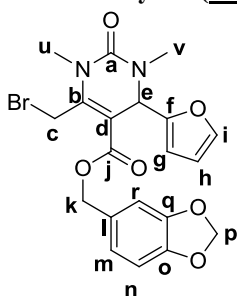
Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmethyl 5-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(furan-2-ylmethylene)-3-oxopentanoate (**157**)

Molecular formula : C₂₃H₂₅NO₈
 MW : 443.45 g.mol⁻¹

Yellow liquid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (9H_a), 2.91 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H_e), 3.48-3.51 (m, 2H_d), 5.13 (s, 2H_i), 5.15 (bs, 1H, NH), 5.96 (s, 2H_m), 6.47 (s, 1H_p), 6.73 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_o), 6.77-6.79 (m, 1H_t), 6.80-6.87 (m, 2H_{k-q}), 7.36 (s, 1H_u), 7.51 (s, 1H_s)

MS : *m/z* 444 ([M+H]⁺)

Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmethyl pyrimidine-5-carboxylate (**159**) 6-(bromomethyl)-4-(furan-2-yl)-1,3-dimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-

Yield : Quantitative
 Molecular formula : C₂₀H₁₉BrN₂O₆
 MW : 463.28 g.mol⁻¹

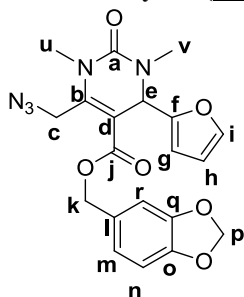
Brown oil

Compound **137** (1.56 mmol), *N*-bromosuccinimide (1.72 mmol) and benzoyl peroxide (0.078 mmol) were dissolved in CCl₄ (20 mL) and refluxed for 2 hours. The mixture was then filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was taken up in dichloromethane and washed twice with sat. aq. NaHCO₃. Drying (Na₂SO₄) and concentration of the organic layer afforded title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3.01 (s, 3H_v), 3.38 (s, 3H_u), 5.04 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 5.10 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H_k), 5.30 (s, 2H_c), 5.32 (s, 1H_e), 5.97 (s, 2H_p), 6.11 (bs, 1H_g), 6.28 (bs, 1H_h), 6.74-6.76 (m, 3H_{m-n-r}), 7.32 (s, 1H_i)

MS : *m/z* 463, 465 ([M+H]⁺)

Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl pyrimidine-5-carboxylate (160**)**



6-(azidomethyl)-4-(furan-2-yl)-1,3-dimethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-

Yield : 53%
 Molecular formula : C₂₀H₁₉N₅O₆
 MW : 425.39 g.mol⁻¹

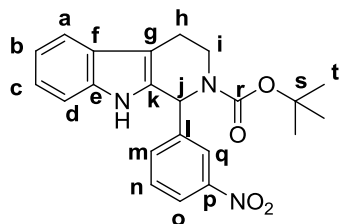
White powder

Compound **159** (1.56 mmol) and sodium azide (2.34 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (10 mL) and the mixture was stirred at 35 °C for 40 hours. Water (60 mL) was added and the mixture was extracted with DCM (3 x 20 mL); organic layers were dried on Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to give a yellow solid, which was purified by chromatography (SiO₂, cHex/AcOEt 10/0 to 6/4) to yield title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3.00 (s, 3H_v), 3.29 (s, 3H_u), 4.50 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H_c), 4.74 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H_e), 5.04 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_k), 5.10 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H_k), 5.34 (s, 1H_e), 5.97 (s, 2H_p), 6.10-6.12 (m, 1H_g), 6.27-6.28 (m, 1H_h), 6.74-6.77 (m, 3H_{m-n-r}), 7.32 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H_i)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 30.9 (C_u), 34.9 (C_v), 46.3 (C_c), 54.5 (C_e), 66.9 (C_k), 101.4 (C_p), 103.5 (C_d), 107.6, 108.4, 109.1, 110.5, 122.4 (C_m), 129.5 (C_l), 142.9 (C_i), 146.8 (C_{b/f}), 147.9 (C_{o/q}), 148.0 (C_{o/q}), 152.2 (C_{b/f}), 153.8 (C_a), 164.8 (C_j)

MS : *m/z* 426 ([M+H]⁺)

Tert-butyl 1-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-2(9H)-carboxylate (164)

Yield : 81%
 Molecular formula : C₂₂H₂₃N₃O₄
 MW : 293.44 g.mol⁻¹

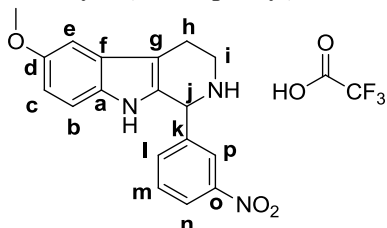
Yellow solid

NaOH (1.0 mmol), **ITB₂** (1.0 mmol) and (Boc)₂O (1.25 mmol) were dissolved in THF/H₂O 4/1 (15 mL). After stirring for 3 h at room temperature, a white precipitate was filtered off and filtrate was extracted with dichloromethane (3 x 10 mL). Organic layers were dried on Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to yield title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.56 (s, 9H_t), 2.70-2.80 (m, 2H_h), 3.21-3.38 (m, 2H_i), 6.41 (s, 1H_j), 7.04-7.10 (m, 1H_{e/d}), 7.11-7.14 (m, 1H_{e/d}), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_b), 7.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_e), 7.70-7.79 (m, 2H_{m-n}), 8.11 (s, 1H_q), 8.13-8.20 (m, 1H_o), 10.75 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 21.2 (C_h), 28.5 (C_t), 38.5 (C_i), 53.8 (C_j), 80.4 (C_s), 109.4 (C_g), 111.7 (C_e), 118.4 (C_d), 119.2 (C_c), 121.9, 122.6, 123.0, 126.6 (C_f), 130.5 (C_n), 131.3 (C_{e/k}), 134.4 (C_m), 136.9 (C_{e/k}), 143.5 (C_l), 148.4 (C_p), 154.4 (C_r)

MS : *m/z* 408 ([M+H]⁺).

6-Methoxy-1-(3-nitrophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (168)

Yield : 87%
 Molecular formula : C₁₈H₁₇N₃O₃ . TFA
 MW (TFA salt) 437.37 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 323.35 g.mol⁻¹

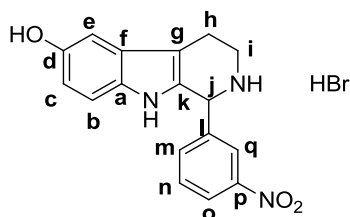
Orange solid

3-Nitrobenzaldehyde (80 mg, 0.53 mmol) and 5-methoxytryptamine (100 mg, 0.53 mmol) were dissolved in anhydrous dichloromethane (5 mL). The mixture was cooled to 0 °C and trifluoroacetic acid (53 μL, 0.69 mmol) was added slowly *via* syringe. After stirring for 10 minutes at 0 °C, the mixture was refluxed for one night, then cooled to room temperature. Diethyl ether (1.5 mL) was added and the resulting precipitate was filtered off and dried to yield title compound as TFA salt.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.47 (bs, 1NH), 2.78-2.84 (m, 1H_h), 2.89-2.96 (m, 1H_h), 3.14-3.20 (m, 1H_i), 3.27-3.32 (m, 1H_i), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 5.26 (s, 1H_j), 6.82 (dd, *J*₁ = 2.4 Hz, *J*₂ = 8.8 Hz, 1H_c), 7.01 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H_e), 7.13 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H_b), 7.49 (dd, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H_m), 7.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_i), 7.73 (bs, NH), 8.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H_n), 8.19 (s, 1H_p)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25.1 (C_h), 30.6 (C_h), 55.1 (OCH₃), 57.3 (C_j), 113.1 (C_e), 113.3 (C_g), 123.5, 124.0, 125.0, 128.8, 128.8, 130.1, 134.3, 136.9, 139.1 (C_k), 147.6 (C_o), 158.7 (C_d)

MS : *m/z* 324 ([M+H]⁺).

6-Hydroxy-1-(3-nitrophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, hydrobromide salt (169)

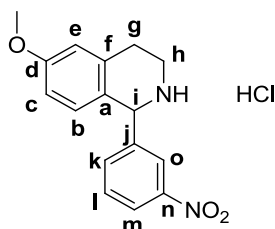
Yield :	Quantitative
Molecular formula :	$C_{17}H_{15}N_3O_3 \cdot HBr$
MW (hydrobromide salt)	$390.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
MW (free amine)	$309.32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Green powder	

Compound **168** as free base (65 mg, 0.20 mmol) was dissolved in anhydrous dichloromethane (0.5 mL) under argon atmosphere. The mixture was cooled down to -78°C and boron tribromide (1.0 M in dichloromethane, 1.0 mL, 1.0 mmol) was added dropwise. After stirring at -78°C for 30 minutes, the mixture was warmed to room temperature and stirred for one night. A green precipitate was formed which, upon filtration and drying, afforded title compound as hydrobromide salt.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.91-2.98 (m, 1H_h), 3.02-3.09 (m, 1H_h), 3.41-3.59 (m, 2H_i), 6.17 (s, 1H_j), 6.56 (dd, $J_1 = 2.4 \text{ Hz}$, $J_2 = 8.8 \text{ Hz}$, 1H_c), 6.84 (d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H_e), 7.10 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H_b), 7.81-7.83 (m, 2H_{m-n}), 8.33 (s, 1H_q), 8.37-8.39 (m, 1H_o), 9.40 (bs, NH₂), 9.87 (bs, NH₂), 10.61 (s, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ (free amine) 21.4 (C_h), 41.3 (C_i), 56.6 (C_j), 102.0 (C_e), 108.7 (C_g), 110.9 (C_b), 111.1 (C_c), 122.5 (C_q), 123.3 (C_o), 127.6 (C_a), 129.3 (C_n), 131.5 (C_f), 133.1 (C_k), 134.8 (C_m), 143.9 (C_l), 148.4 (C_p), 149.9 (C_d)

MS : m/z 310 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

6-Methoxy-1-(3-nitrophenyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, hydrochloride salt (171)

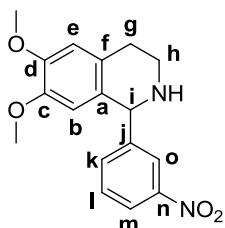
Yield :	90%
Molecular formula :	$C_{16}H_{16}N_2O_3 \cdot HCl$
MW (hydrochloride salt)	$320.77 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
MW (free amine)	$284.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
White solid	

Amide **A171** (0.50 mmol) was dissolved in anhydrous acetonitrile (3 mL) under argon atmosphere. POCl_3 (10 mmol) was added slowly and the mixture was refluxed for 22 h. Upon removal of excess solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in methanol (5 mL) and the mixture was cooled down to 0°C . NaBH_4 (10 mmol) was then added portionwise and the mixture was stirred for 24 h at room temperature. After quenching with 0.1 N aq. HCl (30 mL), a white solid was isolated by filtration and dried to afford title compound as chlorhydrate salt.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.04-3.09 (m, 1H_g), 3.26-3.29 (m, 1H_g), 3.35-3.41 (m, 2H_h), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 5.93 (s, 1H_i), 6.64 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H_b), 7.78 (dd, $J_1 = 8.8 \text{ Hz}$, $J_2 = 2.4 \text{ Hz}$, 1H_c), 6.91 (d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 1H_e), 7.75-7.86 (m, 2H_{k-l}), 8.31-8.33 (m, 2H_{m-o})

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 25.1 (C_g), 30.6 (C_h), 55.1 (OCH₃), 57.4 (C_i), 113.1 (C_{e/e}), 113.4 (C_{e/e}), 123.5, 124.0, 125.1, 128.9, 130.2, 134.3, 136.9, 139.1, 147.7 (C_n), 158.7 (C_d)

MS : m/z 285 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

6,7-Dimethoxy-1-(3-nitrophenyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (172)

Yield : 41%
 Molecular formula : $C_{17}H_{18}N_2O_4$
 MW : $314.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

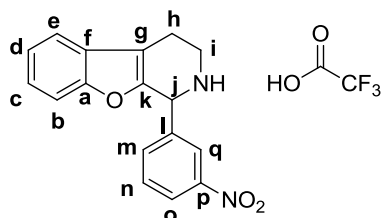
Yellow solid

Amide **A172** (0.50 mmol) was dissolved in anhydrous acetonitrile (5 mL) under argon atmosphere. POCl_3 (10 mmol) was added slowly and the mixture was refluxed for 18 h. Upon removal of excess solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in methanol (5 mL) and the mixture was cooled down to 0 °C. NaBH_4 (10 mmol) was then added portionwise and the mixture was stirred for 28 h at room temperature. After quenching with 0.1 N aq. HCl (25 mL), a white solid was filtered off. Filtrate was concentrated *in vacuo* and purified by chromatography (SiO_2 , DCM/ NH_4OH 99/1 to DCM/MeOH/ NH_4OH 84/15/1) to afford title compound.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1.98 (bs, 1H, NH), 2.70-2.77 (m, 1H_g), 2.88-2.96 (m, 1H_g), 3.01-3.07 (m, 1H_h), 3.11-3.17 (m, 1H_h), 3.62 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 5.13 (s, 1H_i), 6.16 (s, 1H_e), 6.64 (s, 1H_b), 7.44-7.48 (m, 1H_i), 7.57-7.60 (m, 1H_k), 8.09-8.10 (m, 2H_{m-o})

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 29.2 (C_g), 41.7 (C_h), 56.0 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 60.8 (C_i), 110.8 (C_{b/e}), 111.9 (C_{b/e}), 122.6 (C_{m/o}), 123.9 (C_{m/o}), 128.0, 128.4, 129.4, 135.3 (C_a), 147.4, 147.4, 148.2, 148.5 (C_n)

MS : m/z 315 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

1-(3-Nitrophenyl)-1,2,3,4-tetrahydrobenzofuro[2,3-c]pyridine, TFA salt (174)

Yield : 48%
 Molecular formula : $C_{17}H_{14}N_2O_3 \cdot \text{TFA}$
 MW (TFA salt) $402.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 MW (free amine) $294.30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

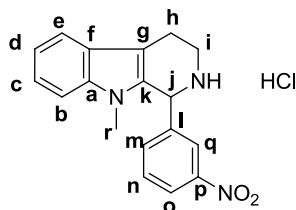
Brown powder

3-Nitrobenzaldehyde (0.74 mmol) and 2-(benzofuran-3-yl)ethanamine (0.74 mmol) were dissolved in anhydrous dichloromethane (5 mL). The mixture was cooled to 0 °C and trifluoroacetic acid (0.96 mmol) was added slowly *via* syringe. After stirring for 10 minutes at 0 °C, the mixture was refluxed for one night. 1.0 mmol trifluoroacetic acid was added and the mixture was refluxed for 24 h. Excess solvent was removed under reduced pressure and the residue dissolved in diethyl ether (15 mL); a brown solid precipitated, which was filtered and dried to yield title compound as TFA salt.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3.04-3.17 (m, 2H_h), 3.48-3.60 (m, 2H_i), 6.28 (s, 1H_j), 7.36-7.38 (m, 2H_{c-d}), 7.56-7.58 (m, 1H_b), 7.73-7.75 (m, 1H_{e/n}), 7.79-7.86 (m, 2H_{e/n-m}), 8.38-8.40 (m, 2H_{o-q}), 9.88 (bs, 1H, NH), 10.15 (bs, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 17.9 (C_h), 54.4 (C_j), 111.6 (C_d), 113.9 (C_g), 120.0 (C_a), 123.5 (C_o), 124.8 (C_{b/c/q}), 125.1 (C_{b/c/q}), 125.4 (C_{b/c/q}), 126.3 (C_f), 130.7 (C_n), 134.7 (C_l), 136.4 (C_m), 145.5 (C_p), 147.9 (C_k), 154.4 (C_e)

MS : m/z 295 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

9-Methyl-1-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, hydrochloride salt (175)


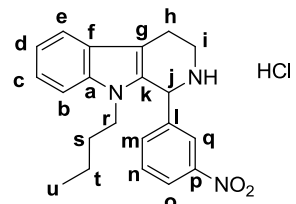
Yield :	Quantitative
Molecular formula :	$C_{18}H_{17}N_3O_2 \cdot HCl$
MW (hydrochloride salt)	343.81 g.mol ⁻¹
MW (free amine)	307.35 g.mol ⁻¹
Yellow solid	

Compound **178** (63 mg, 0.15 mmol) was dissolved in ethyl acetate (0.5 mL), and 5 drops of concentrated hydrochloric acid (37% w/w) were added at 0 °C. The mixture was then stirred for 2 h at room temperature. Upon completion, the mixture was concentrated and dried to yield title compound as chloride salt.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.98-3.25 (m, 3H_{h-i}), 3.29 (s, 3H_r), 3.30-3.41 (m, 1H_i), 6.40 (s, 1H_j), 7.19-7.23 (m, 1H_{c/d}), 7.28-7.35 (m, 2H_{b-c/d}), 7.50-7.55 (m, 2H_{e-n}), 7.74 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_m), 8.26 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H_o), 8.30 (s, 1H_q), 10.20 (bs, 1H, NH), 10.30 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 20.3 (C_h), 32.0 (C_i), 44.2 (C_j), 60.6 (C_r), 109.0 (C_g), 110.1 (C_b), 119.3 (C_e), 120.3 (C_d), 123.4 (C_c), 125.5 (C_{o/q}), 126.0 (C_{o/q}), 126.4 (C_n), 130.6 (C_t), 135.7 (C_{a/l}), 136.8 (C_{a/l}), 137.5 (C_m), 141.6 (C_k), 148.7 (C_p)

MS : *m/z* 308 ([M+H]⁺).

9-Butyl-1-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, hydrochloride salt (176)


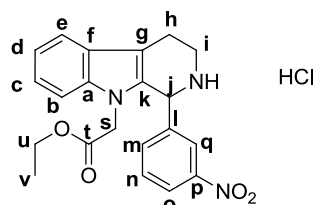
Yield :	Quantitative
Molecular formula :	$C_{21}H_{23}N_3O_2 \cdot HCl$
MW (hydrochloride salt)	385.89 g.mol ⁻¹
MW (free amine)	349.43 g.mol ⁻¹
Yellow solid	

Compound **179** (48 mg, 0.11 mmol) was dissolved in ethyl acetate (0.5 mL), and 5 drops of concentrated hydrochloric acid (37% w/w) were added at 0 °C. The mixture was then stirred for 10 h at room temperature. Upon completion, the mixture was concentrated and dried to yield title compound as chloride salt.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.74 (m, 3H_u), 1.18 (m, 3H_{s-t}), 1.60-1.65 (m, 1H_{s/t}), 3.08-3.85 (m, 6H_{h-i-r}), 6.26 (bs, 1H_j), 7.19-7.23 (m, 1H_{c/d}), 7.29-7.32 (m, 2H_{b-c/d}), 7.55-7.65 (m, 2H_{e-n}), 7.85 (m, 1H_m), 8.25-8.35 (m, 2H_{o-q}), 10.47 (bs, 2H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 13.8 (C_u), 18.8 (C_t), 20.3 (C_h), 32.0 (C_s), 38.1 (C_i), 44.1 (C_j), 54.0 (C_r), 108.9 (C_g), 110.1 (C_b), 119.3 (C_e), 120.3 (C_d), 123.4 (C_c), 125.4 (C_{o/q}), 125.6 (C_{o/q}), 126.0 (C_n), 126.5 (C_t), 130.5 (C_i), 135.7 (C_{a/k}), 136.7 (C_{a/k}), 137.4 (C_m), 148.7 (C_p)

MS : *m/z* 350 ([M+H]⁺).

9-(2-Ethoxy-2-oxoethyl)-1-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, hydrochloride salt (177)


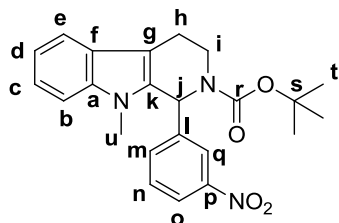
Yield :	Quantitative
Molecular formula :	$C_{21}H_{21}N_3O_4 \cdot HCl$
MW (hydrochloride salt)	415.87 g.mol ⁻¹
MW (free amine)	379.41 g.mol ⁻¹
Yellow solid	

Compound **180** (35 mg, 0.073 mmol) was dissolved in ethyl acetate (1.0 mL), and 10 drops of concentrated hydrochloric acid (37% w/w) were added at 0 °C. The mixture was then stirred for 6 h at room temperature. Upon completion, the mixture was concentrated and dried to yield title compound as hydrochloride salt.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.96-1.25 (m, 3H_v), 2.88-3.11 (m, 2H_h), 3.12-3.32 (m, 2H_i), 3.80 (m, 2H_u), 4.19 (m, 1H_s), 4.38 (m, 1H_s), 6.39 (s, 1H_j), 7.10-7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H_{c/d}), 7.18-7.29 (m, 2H_{c/d-a-b}), 7.42-7.49 (m, 1H_n), 7.56 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_e), 7.71-7.79 (m, 1H_m), 8.17-8.19 (m, 2H_{o-p}), 10.22 (bs, 2H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 14.1 (C_v), 18.6 (C_h), 37.7 (C_i), 45.2 (C_s), 53.3 (C_j), 62.0 (C_u), 109.6 (C_g), 110.1 (C_b), 119.3 (C_e), 121.0 (C_d), 123.9 (C_c), 125.3, 125.8, 126.1, 127.1, 130.3 (C_i), 134.8 (C_{a/k/m}), 137.1 (C_{a/k/m}), 137.9 (C_{a/k/m}), 148.4 (C_p), 167.8 (C_t)

MS : *m/z* 380 ([M+H]⁺).

Tert-butyl 9-methyl-1-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-2(9H)-carboxylate (178)

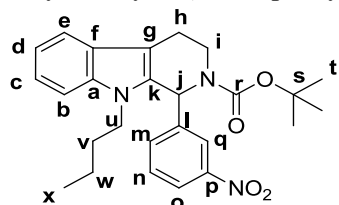
Yield : 74%
 Molecular formula : $C_{23}H_{25}N_3O_4$
 MW : 407.46 g.mol⁻¹

Yellow solid

To a suspension of NaH (60% in mineral oil, 23 mg, 0.57 mmol) in anhydrous DMF (0.5 mL) at 0 °C was added a solution of **164** (100 mg, 0.25 mmol) in DMF (0.5 mL). After stirring for 15 minutes at 0 °C, methyl iodide (23 μL, 0.375 mmol) was added and the mixture was warmed up to room temperature. After stirring for one night at room temperature, 0.5 M KOH (10 mL) were added and the aqueous layer was extracted thrice with 5 mL dichloromethane. Organic layers were dried on Na₂SO₄ and subsequent chromatography (SiO₂, cHex/AcOEt 10/0 to 7/3) afforded title compound as a mix of rotamers.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (mix of rotamers) 1.48-1.66 (m, 9H_t), 2.77-2.90 (m, 1H_h), 2.94-2.99 (m, 2H_{h-i}), 3.37-3.40 (m, 3H_u), 4.20-4.44 (m, 1H_i), 6.44-6.70 (m, 1H_j), 7.16-7.19 (m, 1H_d), 7.25-7.32 (m, 2H_{b-c}), 7.41-7.66 (m, 3H_{e-m-n}), 8.17-8.42 (m, 2H_{o-q})

MS : *m/z* 408 ([M+H]⁺).

Tert-butyl 9-butyl-1-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-2(9H)-carboxylate (179)

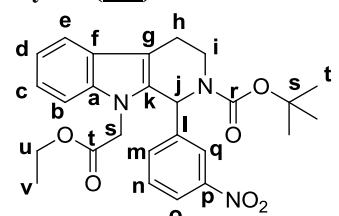
Yield : 56%
 Molecular formula : $C_{26}H_{31}N_3O_4$
 MW : 449.54 g.mol⁻¹

Yellow solid

To a suspension of NaH (60% in mineral oil, 23 mg, 0.57 mmol) in anhydrous DMF (0.5 mL) at 0 °C was added a solution of **164** (100 mg, 0.25 mmol) in DMF (0.5 mL). After stirring for 15 minutes at 0 °C, butyl iodide (43 μL, 0.375 mmol) was added and the mixture was warmed up to room temperature. After stirring for one night at room temperature, 0.5 M KOH (10 mL) were added and the aqueous layer was extracted thrice with 5 mL dichloromethane. Organic layers were dried on Na₂SO₄ and subsequent chromatography (SiO₂, cHex/AcOEt 10/0 to 7/3) afforded title compound as a mix of rotamers.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (mix of rotamers) 0.81 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H_x), 1.19-1.39 (m, 4H_{v-w}), 1.44-1.51 (m, 9H_t), 2.84-2.88 (m, 1H_u), 2.97-3.01 (m, 2H_h), 3.52-3.59 (m, 1H_i), 3.84-3.92 (m, 1H_i), 4.19-4.40 (m, 1H_u), 6.47-6.69 (m, 1H_j), 7.14-7.18 (m, 1H_{c/d}), 7.25-7.27 (m, 1H_{c/d}), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_b), 7.47-7.67 (m, 3H_{e-m-n}), 8.17-8.35 (m, 2H_{o-p})

MS : *m/z* 450 ([M+H]⁺).

Tert-butyl 9-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-2(9H)-carboxylate (180)

Yield : 38%
 Molecular formula : $C_{26}H_{29}N_3O_6$
 MW : 479.52 g.mol⁻¹

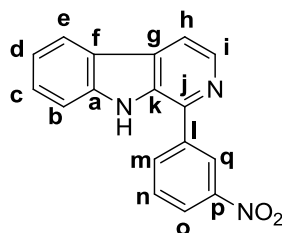
Yellow solid

To a suspension of NaH (60% in mineral oil, 23 mg, 0.57 mmol) in anhydrous DMF (0.5 mL) at 0 °C was added a solution of **164** (100 mg, 0.25 mmol) in DMF (0.5 mL). After stirring for 15 minutes at 0 °C, ethyl iodoacetate (44 μL, 0.375 mmol) was added and the mixture was warmed up to room temperature. After stirring for one night at room temperature, 0.5 M KOH (10 mL) were added and the aqueous layer was extracted thrice with 5 mL dichloromethane. Organic layers were dried on Na₂SO₄ and subsequent chromatography (SiO₂, cHex/AcOEt 10/0 to 7/3) afforded title compound as a mix of rotamers.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (mix of rotamers) 1.13 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H_v), 1.43-1.50 (m, 9H_t), 2.87-3.05 (m, 3H_{h-i}), 3.99-4.04 (m, 2H_{i-s}), 4.20-4.43 (m, 2H_u), 4.52-4.56 (m, 1H_s), 6.42-6.65 (m, 1H_j), 7.16-7.21 (m, 2H_{c-d}), 7.22-7.28 (m, 1H_b), 7.46-7.70 (m, 3H_{e-m-n}), 8.16-8.39 (m, 2H_{o-q})

MS : *m/z* 480 ([M+H]⁺).

1-(3-Nitrophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole (181)



Yield : 85%
 Molecular formula : C₁₇H₁₁N₃O₂
 MW : 289.39 g.mol⁻¹
 Brown powder

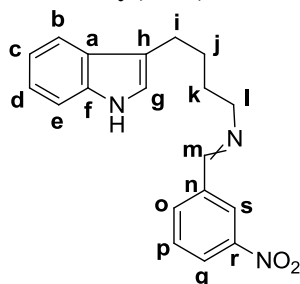
A solution of **ITB₂** (0.20 mmol) and NaOH (0.20 mmol) in DMSO (4.0 mL) is heated at 125 °C for one night. Water (3 mL) is added and the mixture is extracted thrice with dichloromethane (2 mL). Organic layers are dried (Na₂SO₄) and concentrated *in vacuo* to afford title compound.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.28-7.32 (m, 1H_d), 7.57-7.61 (m, 1H_c), 7.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_b), 7.89-7.93 (m, 1H_n), 8.23 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H_h), 8.31 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_e), 8.37 (dd, *J*₁ = 1.2 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H_o), 8.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_m), 8.52 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H_i), 8.81 (s, 1H_q), 11.73 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 112.6 (C_b), 115.0 (C_h), 119.8 (C_e), 120.9, 121.9, 123.1, 123.2, 128.6, 129.9, 130.5 (C_i), 133.6 (C_q), 134.8 (C_k), 138.6 (C_m), 139.6 (C_l), 139.9 (C_a), 141.2 (C_j), 148.3 (C_p)

MS : *m/z* 290 ([M+H]⁺)

4-(1H-Indol-3-yl)-N-(3-nitrobenzylidene)butan-1-amine (185)



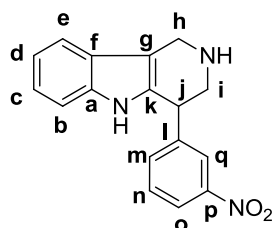
Yield : 66%
 Molecular formula : C₁₉H₁₉N₃O₂
 MW : 321.37 g.mol⁻¹
 Black powder

Compound **184** (0.5 mmol), 3-nitrobenzaldehyde (0.5 mmol) and montmorillonite-H⁺ (50 mg) are stirred at 120 °C for 30 h in a sealed *vial*. Dichloromethane (10 mL) is added and montmorillonite is filtered off. Excess solvent was removed *in vacuo* to afford title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.80-1.85 (m, 4H_{i-k}), 2.83 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H_i), 3.70 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H_l), 6.99 (s, 1H_g), 7.08-7.12 (m, 1H_{c/d}), 7.16-7.20 (m, 1H_{e/d}), 7.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H_b), 7.55-7.62 (m, 2H_{e-p}), 7.97 (bs, 1H, NH), 8.05 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_o), 8.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H_q), 8.31 (s, 1H_s), 8.54 (s, 1H_m)

MS : *m/z* 322 ([M+H]⁺)

4-(3-Nitrophenyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole (186)



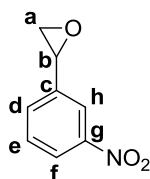
Yield : 29%
 Molecular formula : C₁₇H₁₅N₃O₂
 MW : 293.32 g.mol⁻¹
 Yellow solid

Compound **190** (0.43 mmol) is dissolved in 75% v/v aqueous H₂SO₄ (16 mL) at 0 °C and the mixture is stirred for 4 h at room temperature. Upon quenching by 4 M NaOH, the mixture turned from pink to yellow and was then extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). Drying (Na₂SO₄) and concentration of organic layers gave a yellow solid, which was purified by chromatography (SiO₂, DCM/MeOH/NH₄OH 99/0/1 to 94/5/1) to afford title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3.10 (dd, *J*₁ = 6.4 Hz, *J*₂ = 12.8 Hz, 1H_i), 3.58 (dd, *J*₁ = 5.2 Hz, *J*₂ = 12.8 Hz, 1H_i), 4.18 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H_h), 4.24 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H_h), 4.28-4.31 (m, 1H_j), 7.12-7.21 (m, 2H_{b-c}), 7.26-7.29 (m, 1H_d), 7.48-7.51 (m, 3H_{a-m-n}), 7.55 (bs, 1NH), 8.09 (s, 1H_q), 8.13-8.15 (m, 1H_o)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 41.9 (C_{h/j}), 42.6 (C_{h/j}), 52.9 (C_i), 111.2 (C_g), 112.3 (C_d), 118.5, 120.0, 122.5, 122.5, 123.4, 125.7, 129.9, 132.4, 134.6, 136.0, 144.5 (C_i), 148.9 (C_p)

MS : *m/z* 294 ([M+H]⁺)

2-(3-Nitrophenyl)oxirane (188)


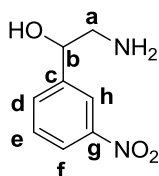
Yield :	97%
Molecular formula :	C ₈ H ₇ NO ₃
MW :	165.15 g.mol ⁻¹
Yellow liquid	

Compound **187** (11.8 mmol) was dissolved in water/tetrahydrofuran 1/3 containing 0.5 M KOH (200 mL), and stirred at room temperature for 4 h. The mixture was quenched by saturated NH₄Cl solution and extracted thrice with chloroform (100 mL). Drying (Na₂SO₄) and removal of excess solvent afforded title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.80-2.82 (dd, *J*₁ = 2.4 Hz, *J*₂ = 5.2 Hz, 1H_a), 3.21-3.23 (dd, *J*₁ = 4.4 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, 1H_a), 3.96-3.98 (dd, *J*₁ = 2.8 Hz, *J*₂ = 3.6 Hz, 1H_a), 7.51-7.55 (m, 1H_e), 7.62 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_a), 8.15-8.17 (m, 2H_{f,h})

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 51.4 (C_{a/b}), 51.4 (C_{a/b}), 120.6 (C_h), 123.1 (C_f), 129.6 (C_e), 131.4 (C_d), 140.1 (C_c), 148.5 (C_g)

MS : *m/z* 166 ([M+H]⁺).

2-Amino-1-(3-nitrophenyl)ethanol (189)


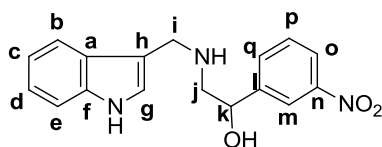
Yield :	49%
Molecular formula :	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₃
MW :	182.18 g.mol ⁻¹
White solid	

Compound **188** (11.6 mmol) was dissolved in dioxane (60 mL) and the mixture was cooled down to 0 °C. Ammonia solution (24%) was added slowly (60 mL) and the mixture was then stirred at room temperature for 30 h. After diluting with brine (60 mL), the aqueous layer was extracted thrice with ethyl acetate (100 mL). Drying (Na₂SO₄) and concentration of organic layers afforded a white oily residue which was triturated in diethyl ether. Filtration and drying of the white solid gave title compound.

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ 2.76 (dd, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 12.8 Hz, 1H_a), 2.87 (dd, *J*₁ = 4.0 Hz, *J*₂ = 13.2 Hz, 1H_a), 4.76 (dd, *J*₁ = 4.0 Hz, *J*₂ = 7.6 Hz, 1H_b), 7.60 (dd, *J*₁ = 7.6 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H_e), 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_d), 8.15 (dd, *J*₁ = 1.4 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H_f), 8.28 (bs, 1H_h)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) δ 50.3 (C_a), 75.0 (C_b), 122.0 (C_f), 123.4 (C_h), 130.7 (C_e), 133.5 (C_d), 147.3 (C_c), 149.9 (C_g)

MS : *m/z* 183 ([M+H]⁺).

2-(((1*H*-Indol-3-yl)methyl)amino)-1-(3-nitrophenyl)ethanol (190)


Yield :	91%
Molecular formula :	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃
MW :	311.34 g.mol ⁻¹
Yellow solid	

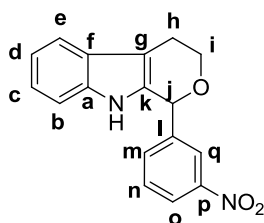
Compound **189** (3.85 mmol) and indole-3-carboxaldehyde (3.5 mmol) were suspended in anhydrous dichloromethane (20 mL). Then, sodium triacetoxyborohydride (7.0 mmol) was added portionwise and the mixture was stirred at room temperature for one night. Upon completion, concentrated HCl (2.5 mL) was added. The mixture was then basified to pH = 12, layers were separated and aqueous layer was extracted twice with 10 mL dichloromethane. Organic layers were dried on Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to afford title compound.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.70-2.77 (m, 2H_j), 3.84 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H_i), 3.89 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H_i), 4.83 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H_k), 6.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H_{c/d}), 7.05 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H_{c/d}), 7.20 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H_g), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_e), 7.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_b), 7.60 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H_p), 7.79 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_q), 8.10 (dd, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, 1H_o), 8.20 (s, 1H_m), 10.85 (bs, 1NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 44.2 (C_i), 56.6 (C_j), 70.6 (C_k), 111.4 (C_e), 113.6 (C_h), 118.2 (C_{b/c}), 118.8 (C_{b/c}), 120.6 (C_{d/g/o}), 120.9 (C_{d/g/o}), 121.7 (C_{d/g/o}), 123.4 (C_m), 126.9 (C_a), 129.4 (C_p), 132.9 (C_q), 136.4 (C_f), 147.3 (C_{l/n}), 147.6 (C_{l/n})

MS : *m/z* 312 ([M+H]⁺).

1-(3-Nitrophenyl)-1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-*b*]indole (191**)**



Yield : 20%
Molecular formula : C₁₇H₁₄N₂O₃
MW : 294.30 g.mol⁻¹

Yellow powder

Tryptophol (20 mmol) and 3-nitrobenzaldehyde (20 mmol) were dissolved in anhydrous toluene (100 mL) under argon. Bismuth chloride (20 mmol) was added and the mixture stirred at 80 °C for 6 hours. Solvent evaporation gave an oily residue, which was purified by chromatography (SiO₂, cHex/AcOEt 94/6) to yield title compound.

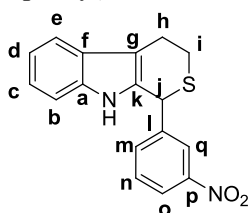
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.84-2.88 (m, 1H_h), 3.08-3.14 (m, 1H_h), 3.97-4.01 (m, 1H_i), 4.29-4.34 (m, 1H_i), 5.91 (s, 1H_j), 7.13-7.20 (m, 2H_{b-c}), 7.26 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H_d), 7.49 (bs, 1NH), 7.53-7.58 (m, 2H_{a-n}), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_m), 8.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_o), 8.27 (s, 1H_q)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 22.4 (C_h), 65.1 (C_i), 75.3 (C_j), 109.6 (C_g), 111.3 (C_b), 118.7 (C_e), 120.2 (C_d), 122.7 (C_c), 123.4 (C_{o/q}), 124.7 (C_{o/q}), 127.1 (C_n), 130.1, 132.2, 134.7, 136.5 (C_{k/l}), 142.1 (C_{k/l}), 148.7 (C_p)

MS : *m/z* 293 ([M-H]⁻). **HRMS** : calculated 293.0926 found 293.0925 ([M-H]⁻)

Compound **191** (7 batches of 0.40 mg each) was applied to a 250 × 4.6 mm Chiralpak AD column (DAICEL) equilibrated with nHex/EtOH = 90/10. (*R*)-**191** (1.23 mg, *t_R* = 18.2 min) and (*S*)-**191** (1.32 mg, *t_R* = 26.2 min) were isolated and further HPLC analysis of separated enantiomers showed > 99% purity.

1-(3-Nitrophenyl)-1,3,4,9-tetrahydrothiopyrano[3,4-*b*]indole (192**)**



Yield : 31%
Molecular formula : C₁₇H₁₄N₂O₂S
MW : 310.37 g.mol⁻¹

White solid

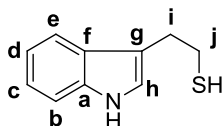
Thiotryptophol **193** (1.13 mmol) and 3-nitrobenzaldehyde (1.35 mmol) were dissolved in anhydrous toluene under argon and stirred at 70 °C for 30 minutes. Para-toluenesulfonic acid (0.56 mmol) is then added and the mixture is refluxed for one night. Solvent is evaporated under reduced pressure and subsequent residue is purified by chromatography (SiO₂, cHex/AcOEt 10/0 to 7/3) to afford title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.95-3.08 (m, 2H_h), 3.11-3.26 (m, 2H_i), 5.30 (s, 1H_j), 7.14-7.26 (m, 3H_{b-c-d}), 7.48 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H_n), 7.55-7.59 (m, 3H, 2H_{e-m} + 1NH), 8.13-8.15 (m, 2H_{o-q})

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 23.5 (C_h), 25.6 (C_i), 41.0 (C_j), 111.0 (C_b), 112.9 (C_g), 118.7 (C_e), 120.1 (C_b), 123.0 (C_{c/o/q}), 123.1 (C_{c/o/q}), 123.3 (C_{c/o/q}), 127.6 (C_i), 129.4 (C_k), 129.9 (C_n), 134.4 (C_m), 135.4 (C_a), 144.1 (C_i), 148.7 (C_p)

MS : *m/z* 311 ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 309.0698 found 309.0697 ([M-H]⁻)

***S*-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl) ethanethioate (**193**)**



Yield : 69%
Molecular formula : C₁₀H₁₁NS
MW : 177.27 g.mol⁻¹

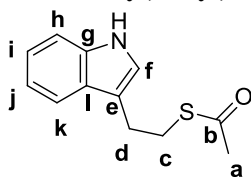
Brown powder

Compound **194** (1.79 mmol) was dissolved in 0.1 M NaOH in H₂O/EtOH 1:1 (10 mL). After stirring at room temperature for 7 hours, ethanol was evaporated and aqueous layers were extracted with 3 x 20 mL DCM. Drying (Na₂SO₄) and *in vacuo* concentration afforded a mix of title compound and disulfide. The residue was thus taken up in THF (3.0 mL) and the mixture cooled down to 0 °C. LiAlH₄ (2.5 mmol) was then added and the mixture was stirred at 0 °C for 1 hour. Quenching by H₂O (5 mL) was followed by acidification to pH 2 with conc. HCl. Extraction with DCM (3 x 10 mL), drying (Na₂SO₄) and evaporation gave title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3.03-3.08 (m, 1H_i), 3.15-3.19 (m, 1H_i), 3.70-3.74 (m, 2H_j), 7.02 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H_h), 7.07-7.14 (m, 1H_{c/d}), 7.18-7.21 (m, 1H_{c/d}), 7.36 (m, *J* = 8.4 Hz, 1H_h), 7.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_k), 8.01 (bs, 1H, NH)

MS : *m/z* 178 ([M+H]⁺)

S-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl) ethanethioate (194)



Yield : 99%
 Molecular formula : C₁₂H₁₃NOS
 MW : 219.30 g.mol⁻¹
 Brown powder

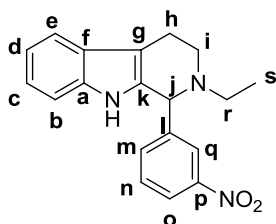
3-(2-Bromoethyl)indole (448 mg, 2.0 mmol), potassium thioacetate (570 mg, 5.0 mmol) and sodium iodide (66 mg, 0.4 mmol) were suspended in anhydrous DMF (5 mL) under argon. The mixture was stirred for one night, then quenched by water (100 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). Drying on Na₂SO₄ and concentration *in vacuo* afforded title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.34 (s, 3H_a), 3.01-3.04 (m, 2H_d), 3.18-3.22 (m, 2H_c), 7.04 (s, 1H_f), 7.11-7.14 (m, 1H_{e/d}), 7.17-7.21 (m, 1H_{e/d}), 7.36 (m, *J* = 8.0 Hz, 1H_h), 7.67 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_k), 8.19 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 25.9 (C_a), 30.1 (C_d), 30.9 (C_c), 111.3 (C_h), 114.9 (C_e), 119.1 (C_k), 119.7 (C_i), 121.9 (C_i), 122.4 (C_f), 127.4 (C_i), 136.5 (C_g), 196.2 (C_b)

MS : *m/z* ([M+H]⁺).

2-Ethyl-1-(3-nitrophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (196)



Yield : 58%
 Molecular formula : C₁₉H₁₉N₃O₂
 MW : 321.37 g.mol⁻¹
 Yellow powder
 R_f : 0.41 (DCM/MeOH 97/3)

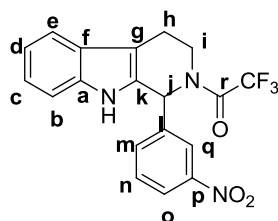
ITB₂ (0.25 mmol) was dissolved in methanol (2 mL) under argon and the mixture cooled down to 0 °C. Molecular sieves (3 Å), acetaldehyde (0.75 mmol) and sodium triacetoxyborohydride (0.50 mmol) were then added and the mixture stirred at room temperature for 48 h. Solvent is concentrated *in vacuo* and residue is taken in 0.2 M NaOH (5 mL). Extraction with dichloromethane (3 x 2 mL) and drying of organic layers (Na₂SO₄) gave an oily residue which, upon chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 99/1 to 95/5), afforded title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.13 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H_s), 2.45-2.54 (m, 1H), 2.63-2.77 (m, 2H), 2.81-2.96 (m, 2H_h), 3.27-3.32 (m, 1H_i), 4.74 (s, 1H_j), 7.13-7.15 (m, 2H_{b-c}), 7.20-7.24 (m, 1H_d), 7.37 (bs, 1NH), 7.45-7.50 (m, 1H_n), 7.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_m), 7.71 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_a), 8.15 (dd, *J*₁ = 0.8 Hz, *J*₂ = 8.2 Hz, 1H_o), 8.26 (s, 1H_q)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 12.4 (C_s), 21.6 (C_h), 47.4 (C_{i/r}), 48.1 (C_{i/r}), 63.3 (C_j), 109.9 (C_g), 111.1 (C_d), 118.6 (C_a), 119.7 (C_b), 122.1 (C_c), 123.2 (C_{o/q}), 123.9 (C_{o/q}), 127.1 (C_f), 129.8 (C_n), 133.4 (C_{e/k}), 135.2 (C_m), 136.6 (C_{e/k}), 144.6 (C_i), 148.6 (C_p)

MS : *m/z* 322 ([M+H]⁺)

2,2,2-Trifluoro-1-(1-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-2(9H)-yl)ethanone (197)



Yield : 91%
 Molecular formula : C₁₉H₁₄F₃N₃O₃
 MW : 389.33 g.mol⁻¹
 Yellow powder

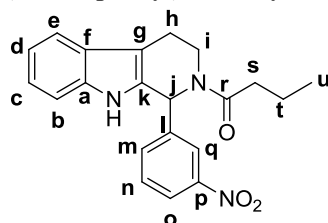
ITB₂ (293 mg, 1.0 mmol) is dissolved in anhydrous dichloromethane (10 mL) under argon and the mixture is cooled down to 0 °C. Triethylamine (209 µL, 1.5 mmol) is added, followed by a solution of trifluoroacetic anhydride in dichloromethane (1.0 M, 1.2 mL, 1.2 mmol). The mixture is stirred for 30 minutes at 0 °C and quenched by saturated NaHCO₃ solution (5 mL). Layers were separated and organic layer was concentrated *in vacuo* to yield title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (mix of rotamers) 3.00-3.12 (m, 2H_h), 3.46-3.52 (m, 1H_i), 4.17-4.20 (m, 1H_i), 6.96 (s, 1H_j), 7.20-7.34 (m, 2H_{b-c}), 7.56 (bs, 2H_{d-m}), 7.75-7.80 (m, 2H_{a-n}), 8.15 (s, 1H_q), 8.22-8.24 (m, 1H_o)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 22.4 (C_h), 53.4 (C_i), 77.43 (C_j), 110.9 (C_g), 111.6 (C_d), 118.8 (C_a), 120.6 (C_b), 123.5 (C_{c/o/q}), 123.6 (C_{c/o/q}), 124.3 (C_{c/o/q}), 126.4 (C_f), 128.1 (C_k), 130.3 (C_n), 135.1 (C_m), 136.8 (C_e), 140.5 (C_l), 148.9 (C_p), 156.7 (C_r)

MS : *m/z* 390 ([M+H]⁺)

1-(1-(3-Nitrophenyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-2(9H)-yl)butan-1-one (198)



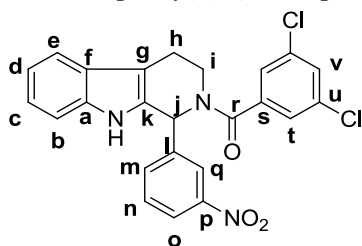
Yield : 82%
 Molecular formula : C₂₁H₂₀N₃O₃
 MW : 363.41 g.mol⁻¹
 White powder
 Rf : 0.16 (cHex/AcOEt 8:2)

ITB₂ (103 mg, 0.35 mmol), butanoic acid (35 µL, 0.38 mmol) and dicyclohexylcarbodiimide (203 mg, 0.98 mmol) were dissolved in tetrahydrofuran (3.5 mL), and the mixture was stirred at room temperature for one night. Dicyclohexylurea was filtered off and filtrate was concentrated under reduced pressure. The yellow residue was purified by chromatography (SiO₂, cHex/AcOEt 10/0 to 4/6) to afford title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H_u), 1.68-1.77 (m, 2H_t), 2.35-2.48 (m, 2H_s), 2.89-2.93 (m, 2H_h), 3.25-3.32 (m, 1H_i), 3.95-3.99 (m, 1H_i), 7.09 (s, 1H_j), 7.11-7.15 (m, 1H_{b/c}), 7.18-7.22 (m, 1H_{b/c}), 7.31-7.36 (m, 2H_{m-n}), 7.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_{a/d}), 7.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_{a/d}), 8.1-8.06 (m, 2H_{o-q}), 8.78 (s, 1NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 13.9 (C_u), 18.7 (C_i), 22.1 (C_h), 35.6 (C_s), 40.0 (C_i), 51.1 (C_j), 110.6 (C_g), 111.2 (C_d), 118.4 (C_a), 120.0 (C_b), 122.7 (C_e), 123.1 (C_o), 126.5 (C_f), 129.5 (C_n), 130.1 (C_m), 134.9 (C_{e/l}), 136.4 (C_k), 142.3 (C_p), 185.9 (C_r)

MS : *m/z* 364 ([M+H]⁺).

(3,5-Dichlorophenyl)(1-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-2(9H)-yl)methanone (199)

Yield :	68%
Molecular formula :	C ₂₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃
MW :	466.32 g.mol ⁻¹
White powder	
Rf :	0.31 (cHex/AcOEt 8:2)

ITB₂ (103 mg, 0.35 mmol), 3,5-dichlorobenzoic acid (73 mg, 0.38 mmol) and dicyclohexylcarbodiimide (203 mg, 0.98 mmol) were dissolved in tetrahydrofuran (3.5 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 40 h. Dicyclohexylurea was filtered off and filtrate was concentrated under reduced pressure. The yellow residue was purified by chromatography (SiO₂, cHex/AcOEt 10/0 to 4/6) to afford title compound.

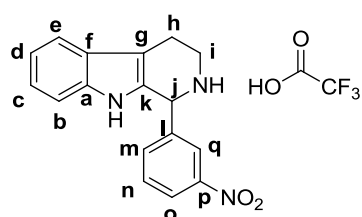
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.87-3.06 (m, 2H_h), 3.37-3.47 (m, 1H_i), 3.73-3.85 (m, 1H_i), 7.12 (s, 1H_j), 7.18-7.22 (m, 1H_{c/d}), 7.27-7.30 (m, 2H_{b-c/d}), 7.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 7.44-7.48 (m, 1H_n), 7.55-7.59 (m, 2H), 7.81-7.93 (m, 2H), 8.20-8.23 (m, 2H)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 21.4 (C_h), 41.7 (C_i), 51.4 (C_j), 108.7 (C_g), 111.4 (C_b), 118.2 (C_e), 118.9 (C_d), 121.7 (C_{e/o/q}), 122.8 (C_{e/o/q}), 123.0 (C_{e/o/q}), 125.2 (C_t), 126.1 (C_f), 129.3 (C_{m/n/v}), 129.9 (C_{m/n/v}), 130.3 (C_{m/n/v}), 134.5 (C_u), 134.6 (C_k), 136.4 (C_a), 139.2 (C_{l/r}), 141.9 (C_{l/r}), 147.9 (C_p), 167.0 (C_r)

MS : m/z 467 ([M+H]⁺).

General Procedure for the Preparation of compounds 200-276.

Aldehyde (1.0 mmol) was dissolved in dry dichloromethane (5 mL). A solution of tryptamine (160 mg, 1.0 mmol) in dry dichloromethane (5 mL) was added and the mixture was cooled to 0 °C. Trifluoroacetic acid (100 μ L, 1.3 mmol) was then added slowly *via* syringe; after 10 minutes stirring at 0 °C, the mixture was refluxed overnight. Upon cooling and subsequent addition of 5 mL diethyl ether, a solid precipitated, which was filtered and dried to afford title compound. When title compound did not precipitate, the mixture was washed three times with 1 M aqueous Na₂CO₃, dried and concentrated *in vacuo* to afford title compound. In some cases, further purification by chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol/NH₄OH) was needed.

1-(3-Nitrophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (ITB₂)

Yield :	94%
Molecular formula :	C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₂ .TFA
MW (TFA salt)	407.34 g.mol ⁻¹
MW (free amine)	293.32 g.mol ⁻¹
Yellow solid	
Rf :	0.69 (DCM/MeOH 9:1)

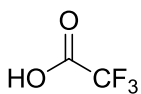
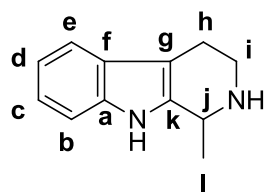
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (free amine) 1.88 (bs, 1H, NH), 2.81-2.87 (m, 1H_h), 2.92-2.99 (m, 1H_h), 3.15-3.21 (m, 1H_i), 3.29-3.35 (m, 1H_i), 5.30 (s, 1H_j), 7.12-7.19 (m, 2H_{c-d}), 7.23-7.26 (m, 1H_b), 7.50-7.54 (m, 2H, 1H_n + NH), 7.57 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H_e), 7.67 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_m), 8.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_o), 8.23 (m, 1H_q)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (TFA salt) 18.2 (C_h), 40.3 (C_i), 54.7 (C_j), 107.8 (C_g), 111.6 (C_b), 118.4 (C_e), 119.2 (C_d), 122.3 (C_c), 124.7 (C_{o/q}), 124.9 (C_{o/q}), 125.6 (C_n), 127.5 (C_f), 130.5 (C_i), 136.6 (C_{a/k/m}), 136.7 (C_{a/k/m}), 147.8 (C_p)

MS : m/z 294 ([M+H]⁺).

Compound **ITB₂** (7 mg) was applied to a 250 \times 4.6 mm Chiralcel OD column (DAICEL) equilibrated with nHex/EtOH = 90/10. (*S*)-**ITB₂** (3.0 mg, $t_R = 31.2$ min) and (*R*)-**ITB₂** (2.5 mg, $t_R = 48.2$ min) were isolated and further HPLC analysis of separated enantiomers showed > 99% purity.

1-Methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (200)



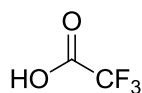
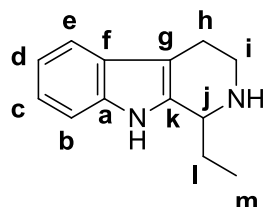
Yield :	40%
Molecular formula :	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ · TFA
MW (TFA salt)	320.28 g.mol ⁻¹
MW (free amine)	186.25 g.mol ⁻¹
White powder	

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.60 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H_I), 2.87-2.96 (m, 2H_h), 3.30-3.35 (m, 1H_i), 3.59-3.62 (m, 1H_i), 4.72 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H_j), 7.00-7.03 (m, 1H_{c/d}), 7.09-7.13 (m, 1H_{c/d}), 7.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_b), 7.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_e), 9.00 (bs, 1H, NH), 9.43 (bs, 1H, NH), 11.15 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 17.2 (C_I), 18.3 (C_h), 40.5 (C_i), 48.4 (C_j), 105.3 (C_g), 111.5 (C_b), 118.1 (C_e), 119.1 (C_d), 121.8 (C_c), 126.0 (C_f), 131.3 (C_k), 136.3 (C_a)

HPLC : t_R = 6.0 min. **MS** : *m/z* 187 ([M+H]⁺)

1-Ethyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (201)



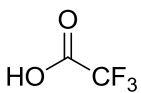
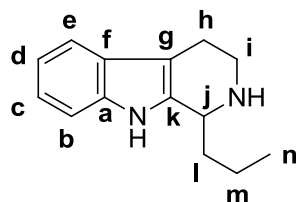
Yield :	21%
Molecular formula :	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ · TFA
MW (TFA salt)	314.30 g.mol ⁻¹
MW (free amine)	200.28 g.mol ⁻¹
White powder	

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H_m), 1.85-1.93 (m, 1H_i), 2.19-2.22 (m, 1H_i), 2.88-2.95 (m, 2H_h), 3.30-3.35 (m, 1H_i), 3.58-3.61 (m, 1H_i), 4.61 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H_j), 6.99-7.03 (m, 1H_{c/d}), 7.09-7.13 (m, 1H_{c/d}), 7.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_b), 7.45 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_e), 8.98 (bs, 1H, NH), 9.58 (bs, 1H, NH), 11.15 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 9.6 (C_m), 18.2 (C_h), 24.7 (C_i), 41.0 (C_i), 53.8 (C_j), 105.8 (C_g), 111.4 (C_b), 118.1 (C_e), 119.0 (C_d), 121.8 (C_c), 125.9 (C_f), 130.2 (C_k), 136.3 (C_a)

HPLC : t_R = 6.7 min. **MS** : *m/z* 201 ([M+H]⁺)

1-Propyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (202)



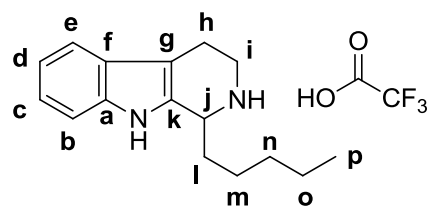
Yield :	38%
Molecular formula :	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ · TFA
MW (TFA salt)	328.33 g.mol ⁻¹
MW (free amine)	214.31 g.mol ⁻¹
White powder	

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H_n), 1.50-1.52 (m, 2H_m), 1.77-1.87 (m, 1H_i), 2.11-2.14 (m, 1H_i), 2.85-2.92 (m, 2H_h), 3.29-3.34 (m, 1H_i), 3.57-3.60 (m, 1H_i), 4.65 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H_j), 6.99-7.03 (m, 1H_{c/d}), 7.08-7.12 (m, 1H_{c/d}), 7.35 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_b), 7.44 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_e), 9.22 (bs, 2H, NH), 11.13 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 13.7 (C_n), 18.0 (C_m), 18.2 (C_h), 33.7 (C_i), 40.9 (C_i), 52.3 (C_j), 105.7 (C_g), 111.4 (C_b), 118.0 (C_e), 119.0 (C_d), 121.7 (C_c), 125.9 (C_f), 130.4 (C_k), 136.3 (C_a)

HPLC : t_R = 8.1 min. **MS** : *m/z* 215 ([M+H]⁺)

1-Pentyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (203)



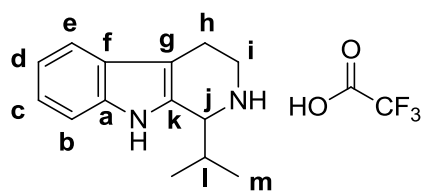
Yield : 53%
 Molecular formula : $C_{16}H_{22}N_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 356.38 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 242.36 $g \cdot mol^{-1}$
 White powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 0.88-0.95 (m, 3H_p), 1.28-1.39 (m, 4H_{n-o}), 1.42-1.56 (m, 2H_m), 1.76-1.86 (m, 1H_i), 2.10-2.17 (m, 1H_i), 2.89-2.99 (m, 2H_h), 3.25-3.31 (m, 1H_i), 3.57-3.60 (m, 1H_i), 4.65 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H_j), 6.99-7.03 (m, 1H_{e/d}), 7.08-7.12 (m, 1H_{e/d}), 7.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.45 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 8.92 (bs, 1H, NH), 9.41 (bs, 1H, NH), 11.12 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 13.8 (C_p), 18.2 (C_h), 21.8 (C_o), 24.2 (C_m), 31.0 (C_n), 31.5 (C_i), 41.0 (C_i), 52.5 (C_j), 105.6 (C_g), 111.4 (C_b), 118.0 (C_e), 119.0 (C_d), 121.7 (C_c), 125.9 (C_f), 130.3 (C_k), 136.3 (C_a)

HPLC : $t_R = 12.0$ min. **MS** : m/z 243 ($[M+H]^+$)

1-Isopropyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (204)



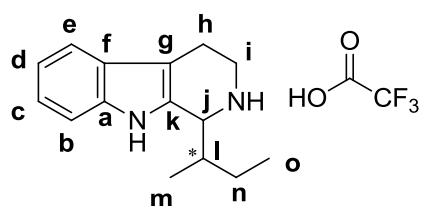
Yield : 54%
 Molecular formula : $C_{14}H_{18}N_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 328.33 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 214.31 $g \cdot mol^{-1}$
 White powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H_m), 1.15 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H_m), 2.55-2.61 (m, 1H_i), 2.90-2.99 (m, 2H_h), 3.25-3.31 (m, 1H_i), 3.59-3.62 (m, 1H_i), 4.66 (s, 1H_j), 7.01-7.05 (m, 1H_{e/d}), 7.11-7.14 (m, 1H_{e/d}), 7.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.47 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 8.41 (bs, 1H, NH), 9.42 (bs, 1H, NH), 11.05 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 16.3 (C_m), 18.1 (C_h), 18.6 (C_m), 29.3 (C_i), 41.9 (C_i), 57.8 (C_j), 106.7 (C_g), 111.5 (C_b), 118.0 (C_e), 119.0 (C_d), 121.8 (C_c), 125.9 (C_f), 129.4 (C_k), 136.5 (C_a)

HPLC : $t_R = 7.5$ min. **MS** : m/z 215 ($[M+H]^+$)

1-(Sec-butyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (205)



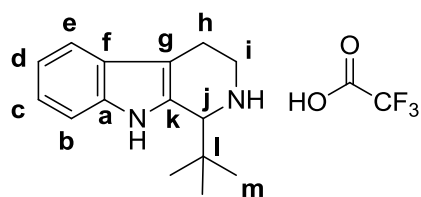
Yield : 64%
 Molecular formula : $C_{15}H_{20}N_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 342.36 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 228.33 $g \cdot mol^{-1}$
 White powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (mix of diastereomers) 0.79-0.82 (m, 2.1H_o), 0.85-0.91 (m, 0.9H_o), 0.99-1.08 (m, 2.1H_m), 1.09-1.12 (m, 0.9H_o), 1.20-1.30 (m, 0.6H_n), 1.32-1.46 (m, 0.7H_n), 1.54-1.67 (m, 0.7H_n), 1.24-1.41 (m, 1H_i), 2.90-2.99 (m, 2H_h), 3.25-3.31 (m, 1H_i), 3.55-3.60 (m, 1H_i), 4.70 (s, 0.3H_j), 4.78 (s, 0.7H_j), 7.01-7.05 (m, 1H_{e/d}), 7.10-7.14 (m, 1H_{e/d}), 7.35-7.39 (m, 1H_b), 7.47 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 8.31 (bs, 1H, NH), 9.34 (bs, 1H, NH), 11.00 (s, 0.3H, NH), 11.07 (s, 0.7H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (mix of diastereomers) 11.9, 12.0 (C_o), 13.3, 15.2 (C_m), 18.1 (C_h), 23.5, 25.4 (C_n), 36.0, 36.1 (C_i), 42.0, 42.3 (C_i), 56.5, 57.7 (C_j), 106.9 (C_g), 111.4, 111.5 (C_b), 118.0 (C_e), 119.0 (C_d), 121.7 (C_c), 125.9, 126.0 (C_f), 129.1, 129.4 (C_k), 136.5 (C_a)

HPLC : $t_R = 8.9$ min. **MS** : m/z 229 ($[M+H]^+$)

1-(*Tert*-butyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indole, TFA salt (206)



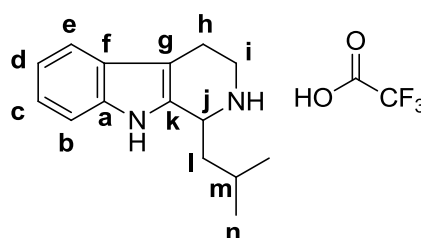
Yield : 28%
 Molecular formula : C₁₅H₂₀N₂ · TFA
 MW (TFA salt) 342.36 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 228.33 g.mol⁻¹
 White powder

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.13 (s, 9H_m), 2.90-2.96 (m, 2H_h), 3.15-3.24 (m, 1H_i), 3.56-3.59 (m, 1H_j), 4.52 (s, 1H_j), 7.02-7.05 (m, 1H_{c/d}), 7.11-7.15 (m, 1H_{c/d}), 7.43-7.49 (m, 2H_{b-e}), 8.37 (bs, 1H, NH), 9.43 (bs, 1H, NH), 11.64 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 18.2 (C_h), 26.7 (C_m), 34.9 (C_i), 42.2 (C_i), 61.1 (C_j), 108.5 (C_g), 111.9 (C_b), 117.9 (C_e), 119.1 (C_d), 121.9 (C_c), 125.6 (C_f), 128.2 (C_k), 136.7 (C_a)

HPLC : t_R = 8.6 min. **MS** : m/z 229 ([M+H]⁺)

1-Isobutyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indole, TFA salt (207)



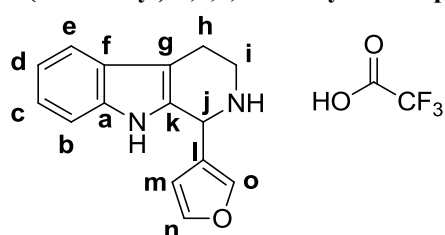
Yield : 52%
 Molecular formula : C₁₅H₂₀N₂ · TFA
 MW (TFA salt) 342.36 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 228.33 g.mol⁻¹
 White powder

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.99 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H_n), 1.08 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H_n), 1.71-1.76 (m, 1H_m), 1.90-2.02 (m, 2H_i), 2.89-2.94 (m, 2H_h), 3.32-3.37 (m, 1H_i), 3.56-3.62 (m, 1H_j), 4.72 (s, 1H_j), 7.01-7.05 (m, 1H_{c/d}), 7.10-7.14 (m, 1H_{c/d}), 7.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_b), 7.47 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_e), 8.90 (bs, 1H, NH), 9.30 (bs, 1H, NH), 11.10 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 18.2 (C_h), 21.2 (C_m), 23.4 (C_n), 41.0 (C_i), 50.6 (C_j), 105.7 (C_g), 111.5 (C_b), 118.0 (C_e), 119.0 (C_d), 121.7 (C_c), 125.9 (C_f), 130.7 (C_k), 136.4 (C_a)

HPLC : t_R = 9.5 min. **MS** : m/z 229 ([M+H]⁺)

1-(Furan-3-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indole, TFA salt (208)



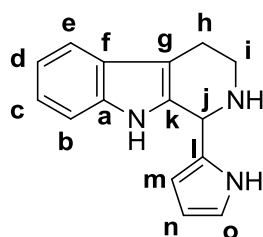
Yield : 92%
 Molecular formula : C₁₅H₁₄N₂O · TFA
 MW (TFA salt) 352.31 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 238.30 g.mol⁻¹
 White powder

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.01-3.04 (m, 2H_h), 3.47-3.52 (m, 2H_i), 5.92 (s, 1H_j), 6.57 (s, 1H_m), 7.02-7.06 (m, 1H_{c/d}), 7.11-7.14 (m, 1H_{c/d}), 7.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_b), 7.51 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_e), 7.80 (s, 1H_{n/o}), 7.84 (s, 1H_{n/o}), 9.41 (bs, 1H, NH), 9.78 (bs, 1H, NH), 11.01 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 18.2 (C_h), 40.0 (C_i), 47.7 (C_j), 106.5 (C_g), 110.5 (C_m), 111.7 (C_b), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 120.1 (C_i), 122.0 (C_c), 125.8 (C_f), 128.6 (C_k), 136.5 (C_a), 143.7 (C_{n/o}), 144.3 (C_{n/o})

HPLC : t_R = 7.9 min. **MS** : m/z 239 ([M+H]⁺)

1-(1H-Pyrrol-2-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (209)



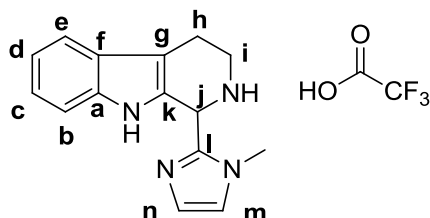
Yield : 29%
 Molecular formula : $C_{15}H_{15}N_3$
 MW : 237.31 $g \cdot mol^{-1}$
 Black solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.97 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H_h), 3.75 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H_i), 6.07 (s, 1H_j), 6.39 (s, 1H_m), 6.85 (s, 1H_n), 6.93-6.97 (m, 1H_{e/d}), 7.02-7.06 (m, 1H_{e/d}), 7.12 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H_o), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.54 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 8.02 (s, 1H, NH), 10.78 (s, 1H, NH), 11.41 (bs, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 27.1 (C_h), 54.9 (C_i), 61.2 (C_j), 108.8 (C_g), 111.3 (C_{b/m/n}), 112.3 (C_{b/m/n}), 113.2 (C_{b/m/n}), 118.2 (C_{e/o}), 118.2 (C_{e/o}), 120.8, 121.9, 122.8, 127.3, 130.1, 136.2 (C_a)

HPLC : $t_R = 8.7$ min. **MS** : m/z 238 ($[M+H]^+$)

1-(1-Methyl-1H-imidazol-2-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (210)



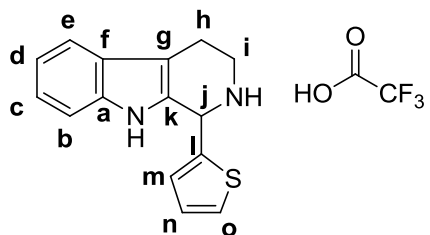
Yield : 15%
 Molecular formula : $C_{15}H_{16}N_4 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 366.34 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 252.31 $g \cdot mol^{-1}$
 Black solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.99-3.08 (m, 2H_h), 3.49-3.54 (m, 1H_i), 3.64-3.68 (m, 1H_i), 3.89 (s, 3H, NMe), 6.27 (s, 1H_j), 7.04-7.08 (m, 1H_{b/c}), 7.11-7.14 (m, 2H_{b/c/l}), 7.34 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H_b), 7.48 (s, 1H_m), 7.54 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 9.71 (bs, 2H), 10.95 (s, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.1 (C_h), 33.4 (NMe), 46.2 (C_j), 107.1 (C_g), 111.4 (C_b), 118.2 (C_e), 119.1 (C_d), 122.1 (C_c), 123.8 (C_m), 125.6 (C_n), 136.8 (C_f), 141.2 (C_a), 158.6 (C_{k/l}), 158.9 (C_{k/l})

HPLC : $t_R = 3.9$ min. **MS** : m/z 253 ($[M+H]^+$)

1-(Thiophen-2-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (211)



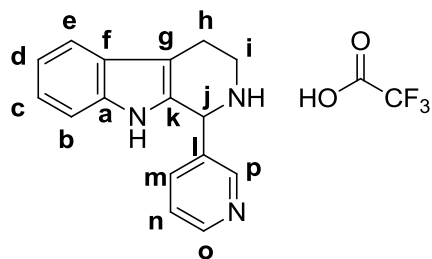
Yield : 4%
 Molecular formula : $C_{15}H_{14}N_2S \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 368.37 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 254.36 $g \cdot mol^{-1}$
 Grey solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.99-3.11 (m, 2H_h), 3.46-3.49 (m, 2H_i), 6.34 (s, 1H_j), 7.04-7.08 (m, 1H_{e/d}), 7.13-7.19 (m, 2H_{e/d-m}), 7.30-7.34 (m, 2H_{b-n}), 7.54 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 7.74 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H_o), 9.50 (bs, 1H, NH), 9.96 (bs, 1H, NH), 11.12 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.1 (C_h), 50.1 (C_j), 106.9 (C_g), 111.6 (C_b), 118.4 (C_e), 119.1 (C_d), 122.2 (C_c), 125.5 (C_f), 127.5, 128.4, 129.0, 130.6, 136.4 (C_a), 137.1 (C_i)

HPLC : $t_R = 8.7$ min. **MS** : m/z 255 ($[M+H]^+$)

1-(Pyridin-3-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (212)



Yield : 48%
 Molecular formula : $C_{16}H_{15}N_3 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 363.33 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 249.32 $g \cdot mol^{-1}$

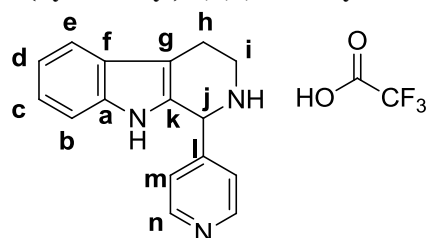
Yellow solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.99-3.15 (m, 2H_h), 3.45-3.50 (m, 2H_i), 6.07 (s, 1H_j), 7.03-7.07 (m, 1H_{e/d}), 7.10-7.14 (m, 1H_{e/d}), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.50-7.55 (m, 2H_{e-n}), 7.72 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H_m), 8.65 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H_p), 8.69 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H_o), 9.50 (bs, 1H, NH), 10.05 (bs, 1H, NH), 10.96 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.3 (C_i), 53.4 (C_j), 107.9 (C_g), 111.7 (C_b), 118.4 (C_e), 119.3 (C_d), 122.3 (C_c), 124.2, 125.8, 127.6, 131.1, 136.7 (C_a), 138.5 (C_m), 150.1 (C_{o/p}), 150.4 (C_{o/p})

HPLC : $t_R = 4.5$ min. **MS** : m/z 250 ($[M+H]^+$)

1-(Pyridin-4-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (213)



Yield : 75%
 Molecular formula : $C_{16}H_{15}N_3 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 363.33 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 249.32 $g \cdot mol^{-1}$

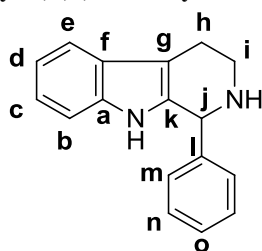
White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.05-3.12 (m, 2H_h), 3.47-3.50 (m, 2H_i), 6.03 (s, 1H_j), 7.05-7.09 (m, 1H_{e/d}), 7.13-7.17 (m, 1H_{e/d}), 7.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.42 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H_m), 7.56 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 8.72 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H_n), 9.59 (bs, 1H, NH), 10.19 (bs, 1H, NH), 10.98 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.2 (C_i), 54.4 (C_j), 107.7 (C_g), 111.7 (C_b), 118.4 (C_e), 119.2 (C_d), 122.2 (C_c), 124.7 (C_m), 125.6 (C_f), 127.3 (C_k), 136.6 (C_a), 143.4 (C_l), 150.1 (C_n)

HPLC : $t_R = 4.4$ min. **MS** : m/z 250 ($[M+H]^+$)

1-Phenyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (214)



Yield : 50%
 Molecular formula : $C_{17}H_{16}N_2$
 MW : 248.32 $g \cdot mol^{-1}$

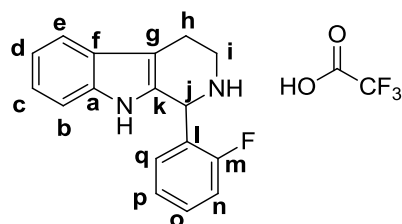
White powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.67-2.72 (m, 2H_h), 2.90-2.94 (m, 1H_i), 3.02-3.05 (m, 1H_i), 5.07 (s, 1H_j), 6.92-7.01 (m, 2H_{c-d}), 7.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.26-7.34 (m, 5H_{m-n-o}), 7.40 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 10.40 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 22.2 (C_h), 41.2 (C_i), 56.5 (C_j), 108.2 (C_g), 111.0 (C_b), 117.5 (C_e), 118.1 (C_d), 120.4 (C_c), 126.8 (C_f), 127.1 (C_o), 128.0 (C_{m/n}), 128.4 (C_{m/n}), 135.3 (C_{a/k}), 135.9 (C_{a/k}), 143.2 (C_l)

HPLC : $t_R = 9.4$ min. **MS** : m/z 249 ($[M+H]^+$)

1-(2-Fluorophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (215)



Yield : 48%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}FN_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 380.34 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 266.31 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

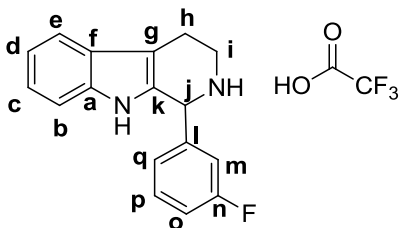
RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.97-3.13 (m, 2H_h), 3.41-3.54 (m, 2H_i), 6.15 (s, 1H_j), 7.03-7.06 (m, 1H_{e/d}), 7.10-7.14 (m, 2H_{e/d-p}), 7.25-7.30 (m, 2H_{b-q}), 7.40-7.45 (m, 1H_n), 7.53-7.58 (m, 2H_{e-o}), 9.29 (bs, 1H, NH), 9.82 (bs, 1H, NH), 10.95 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 30.7 (C_i), 48.7 (d, $J = 4.3$ Hz, C_j), 107.7 (C_g), 111.5 (C_b), 116.0 (d, $J = 21.1$ Hz, C_a), 118.2 (C_e), 119.1 (C_d), 121.8 (d, $J = 12.7$ Hz, C_l), 122.1 (C_c), 124.1 (d, $J = 3.6$ Hz, C_p), 125.6 (C_f), 127.4 (C_l), 131.3 (d, $J = 2.2$ Hz, C_{o/q}), 132.2 (d, $J = 8.7$ Hz, C_{o/q}), 136.5 (C_a), 160.6 (d, $J = 247.3$ Hz, C_m)

RMN ^{19}F (160 MHz, CFCl₃) δ - 73.5, - 116.0

HPLC : $t_R = 9.5$ min. **MS** : m/z 267 ($[M+H]^+$)

1-(3-Fluorophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (216)



Yield : 45%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}FN_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 380.34 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 266.31 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

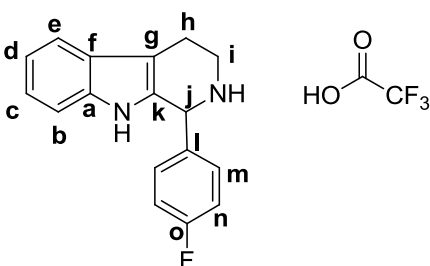
RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.99-3.04 (m, 1H_h), 3.06-3.13 (m, 1H_h), 3.44-3.45 (m, 2H_i), 6.00 (s, 1H_j), 7.03-7.07 (m, 1H_{e/d}), 7.11-7.14 (m, 1H_{e/d}), 7.20-7.30 (m, 3H_{b-m-o}), 7.34-7.39 (m, 1H_q), 7.55-7.57 (m, 2H_{a-p}), 9.29 (bs, 1H, NH), 9.84 (bs, 2H, NH), 10.95 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.1 (C_i), 54.9 (d, $J = 1.1$ Hz, C_j), 107.6 (C_g), 111.6 (C_b), 116.7 (d, $J = 21.8$ Hz, C_o), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 122.1 (C_c), 125.6 (C_f), 126.0 (d, $J = 2.6$ Hz, C_q), 127.9 (C_k), 131.0 (d, $J = 8.3$ Hz, C_p), 136.6 (C_a), 137.2 (d, $J = 6.9$ Hz, C_l), 162.0 (d, $J = 243.2$ Hz, C_n)

RMN ^{19}F (160 MHz, CFCl₃) δ - 73.6, - 112.4

HPLC : $t_R = 10.2$ min. **MS** : m/z 267 ($[M+H]^+$)

1-(4-Fluorophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (217)



Yield : 18%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}FN_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 380.34 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 266.31 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

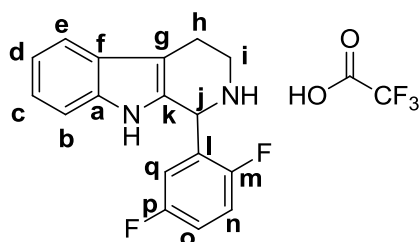
RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.98-3.13 (m, 2H_h), 3.38-3.45 (m, 2H_i), 5.99 (s, 1H_j), 7.02-7.06 (m, 1H_{e/d}), 7.10-7.13 (m, 1H_{e/d}), 7.28 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.32-7.36 (m, 2H_n), 7.40-7.44 (m, 2H_m), 7.53 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 9.27 (bs, 1H, NH), 9.80 (bs, 1H, NH), 10.92 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.0 (C_i), 54.8 (C_j), 107.5 (C_g), 111.6 (C_b), 115.8 (d, $J = 21.5$ Hz, C_n), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 122.1 (C_c), 125.7 (C_f), 128.3 (C_k), 131.0 (d, $J = 2.9$ Hz, C_l), 132.3 (d, $J = 8.7$ Hz, C_m), 136.6 (C_a), 163.2 (d, $J = 245.1$ Hz, C_o)

RMN ^{19}F (160 MHz, CFCl₃) δ - 73.6, - 111.7

HPLC : $t_R = 10.3$ min. **MS** : m/z 267 ($[M+H]^+$)

1-(2,5-Difluorophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (218)



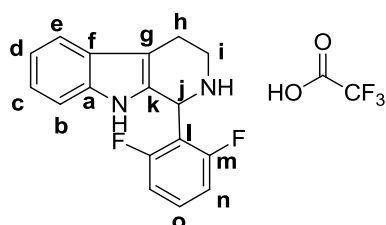
Yield : 22%
 Molecular formula : $C_{17}H_{13}F_2N_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 398.33 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 284.30 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.98-3.03 (m, 1H_h), 3.07-3.13 (m, 1H_h), 3.48-3.55 (m, 2H_i), 6.15 (s, 1H_j), 6.93-6.97 (m, 1H_q), 7.04-7.07 (m, 1H_{c,d}), 7.11-7.15 (m, 1H_{c,d}), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.43-7.55 (m, 3H_{e-n,o}), 9.46 (bs, 1H, NH), 9.93 (bs, 1H, NH), 10.97 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{19}F (160 MHz, $CFCl_3$) δ - 73.5, - 117.4 (d, $J = 7.8$ Hz), -120.9 (d, $J = 7.5$ Hz)

HPLC : $t_R = 10.0$ min. **MS** : m/z 285 ($[M+H]^+$)

1-(2,6-Difluorophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (219)



Yield : 37%
 Molecular formula : $C_{17}H_{13}F_2N_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 398.33 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 284.30 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

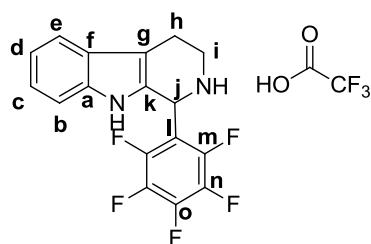
RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.98-3.15 (m, 2H_h), 3.56-3.73 (m, 2H_i), 6.26 (s, 1H_j), 7.01-7.05 (m, 1H_{c,d}), 7.08-7.11 (m, 1H_{c,d}), 7.24-7.29 (m, 3H_{b-n}), 7.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 7.65 (m, 1H_o), 9.10 (bs, 1H, NH), 10.22 (bs, 1H, NH), 11.04 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.3 (C_h), 42.1 (C_i), 45.9 (C_j), 106.2 (C_g), 110.6 (dd, $J_1 = 16.0$ Hz, $J_2 = 15.6$ Hz, C_o), 111.5 (C_b), 112.5 (dd, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 21.8$ Hz, C_n), 118.2 (C_e), 119.1 (C_d), 121.9 (C_c), 125.9 (C_f), 127.7 (C_{k,l}), 133.2 (C_{k,l}), 136.4 (C_a), 161.4 (dd, $J_1 = 6.6$ Hz, $J_2 = 250.5$ Hz, C_m)

RMN ^{19}F (160 MHz, $CFCl_3$) δ - 73.6, - 110.9

HPLC : $t_R = 9.4$ min. **MS** : m/z 285 ($[M+H]^+$)

1-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (220)



Yield : 74%
 Molecular formula : $C_{17}H_{13}F_5N_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 452.30 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 338.27 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

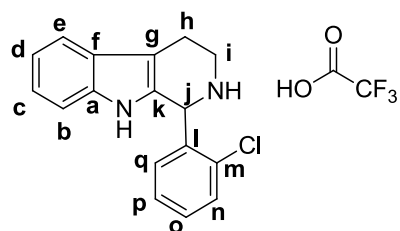
RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.97-3.06 (m, 2H_h), 3.58-3.65 (m, 2H_i), 6.35 (s, 1H_j), 7.03-7.06 (m, 1H_{c,d}), 7.11-7.14 (m, 1H_{c,d}), 7.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H_b), 7.52 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 9.50 (bs, 1H, NH), 10.35 (bs, 1H, NH), 10.98 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 42.1 (C_i), 45.7 (C_j), 106.8 (C_g), 109.0-109.3 (m, C_l), 111.5 (C_b), 118.4 (C_e), 119.2 (C_d), 122.1 (C_c), 125.7 (C_f), 126.4 (C_k), 136.3 (C_a), 144.6-144.9 (m, C_n), 147.1-147.4 (m, C_m), 163.2 (d, $J = 245.1$ Hz, C_o)

RMN ^{19}F (160 MHz, $CFCl_3$) δ - 73.5, - 138.0 (d, $J = 8.0$ Hz), -151.2 (dd, $J_1 = 9.3$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz), -161.9 (ddd, $J_1 = 9.6$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz, $J_3 = 2.8$ Hz)

HPLC : $t_R = 11.8$ min. **MS** : m/z 339 ($[M+H]^+$)

1-(2-Chlorophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (221)



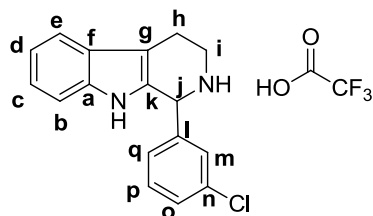
Yield : 77%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}ClN_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 396.79 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 282.77 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.97-3.04 (m, 1H_h), 3.09-3.16 (m, 1H_h), 3.36-3.39 (m, 1H_i), 3.53-3.59 (m, 1H_i), 6.21 (s, 1H_j), 7.03-7.14 (m, 3H_{c-d-o}), 7.29 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H_q), 7.37-7.41 (m, 1H_p), 7.51-7.56 (m, 2H_{b-n}), 7.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 9.32 (bs, 1H, NH), 9.94 (bs, 1H, NH), 10.97 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 51.9 (C_i), 108.0 (C_g), 111.6 (C_b), 118.3 (C_e), 119.2 (C_d), 122.2 (C_c), 125.6, 127.5, 127.8, 130.0, 131.6, 131.7, 132.2, 134.3, 136.6 (C_a)

HPLC : $t_R = 10.3$ min. **MS** : m/z 283 ($[M+H]^+$)

1-(3-Chlorophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (222)



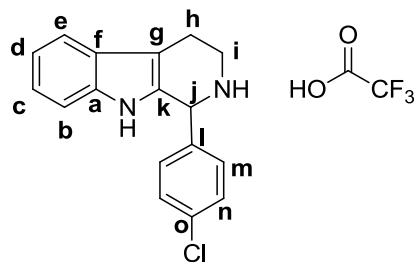
Yield : 66%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}ClN_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 396.79 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 282.77 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.99-3.04 (m, 1H_h), 3.07-3.14 (m, 1H_h), 3.39-3.51 (m, 2H_i), 6.01 (s, 1H_j), 7.03-7.07 (m, 1H_{e/d}), 7.11-7.14 (m, 1H_{e/d}), 7.29-7.33 (m, 2H_{b-q}), 7.48-7.58 (m, 4H_{e-m-o-p}), 9.83 (bs, 2H, NH), 10.97 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.2 (C_i), 54.9 (C_j), 107.7 (C_g), 111.6 (C_b), 118.4 (C_e), 119.2 (C_d), 122.2 (C_c), 125.7, 128.0, 128.7, 129.8, 130.8, 133.4, 136.6 (C_a), 137.1 (C_n)

HPLC : $t_R = 11.5$ min. **MS** : m/z 283 ($[M+H]^+$)

1-(4-Chlorophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (223)



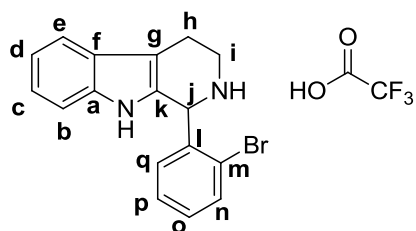
Yield : 63%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}ClN_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 396.79 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 282.77 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.98-3.14 (m, 2H_h), 3.42-3.44 (m, 2H_i), 5.99 (s, 1H_j), 7.02-7.06 (m, 1H_{e/d}), 7.10-7.13 (m, 1H_{e/d}), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.42 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H_m), 7.54-7.62 (m, 3H_{e-n}), 9.75 (bs, 2H, NH), 10.92 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.1 (C_i), 54.8 (C_j), 107.5 (C_g), 111.6 (C_b), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 122.1 (C_c), 125.7 (C_f), 128.2 (C_o), 128.9 (C_n), 131.9 (C_m), 133.7 (C_{k/l}), 134.6 (C_{k/l}), 136.6 (C_a)

HPLC : $t_R = 11.8$ min. **MS** : m/z 283 ($[M+H]^+$)

1-(2-Bromophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (224)



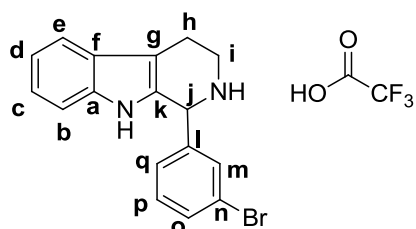
Yield : 45%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}BrN_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 441.24 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 327.22 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.97-3.04 (m, 1H_h), 3.09-3.16 (m, 1H_h), 3.34-3.38 (m, 1H_i), 3.53-3.59 (m, 1H_i), 6.15 (s, 1H_j), 7.03-7.14 (m, 3H_{c-d-o}), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_q), 7.40-7.47 (m, 2H_{b-p}), 7.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_n), 7.84-7.86 (m, 1H_e), 9.40 (bs, 1H, NH), 10.10 (bs, 1H, NH), 11.0 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 54.6 (C_j), 108.0 (C_g), 111.6 (C_b), 118.4 (C_e), 119.2 (C_d), 122.2 (C_c), 125.2, 125.6, 127.7 (C_f), 128.3, 131.7 (C_{n/q}), 131.9 (C_{n/q}), 133.4 (C_{k/l}), 133.9 (C_{k/l}), 136.7 (C_a)

HPLC : $t_R = 10.6$ min. **MS** : m/z 327, 329 ([M+H]⁺)

1-(3-Bromophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (ITB₁)



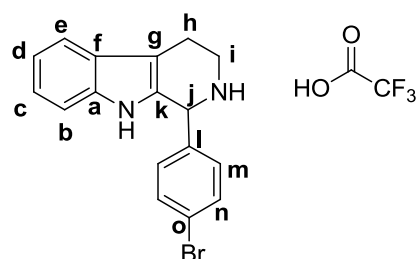
Yield : 21%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}BrN_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 441.24 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 327.22 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.98-3.03 (m, 1H_h), 3.06-3.12 (m, 1H_h), 3.39-3.48 (m, 2H_i), 5.99 (s, 1H_j), 7.03-7.07 (m, 1H_{e/d}), 7.11-7.14 (m, 1H_{e/d}), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_q), 7.34 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_b), 7.43-7.47 (m, 1H_p), 7.54 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_o), 7.63 (s, 1H_m), 7.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 9.40 (bs, 1H, NH), 9.95 (bs, 1H, NH), 10.95 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.1 (C_h), 40.4 (C_i), 54.9 (C_j), 107.6 (C_g), 111.6 (C_b), 118.3 (C_e), 119.2 (C_d), 122.0 (C_n), 122.2 (C_c), 125.6 (C_o), 127.7 (C_f), 129.0 (C_p), 131.1 (C_q), 132.6 (C_i), 132.7 (C_k), 136.5 (C_a), 137.1 (C_m)

HPLC : $t_R = 11.9$ min. **MS** : m/z 327, 329 ([M+H]⁺)

1-(4-Bromophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (225)



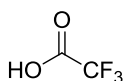
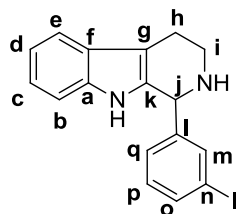
Yield : 31%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}BrN_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 441.24 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 327.22 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.01-3.09 (m, 2H_h), 3.42-3.44 (m, 2H_i), 5.97 (s, 1H_j), 7.02-7.06 (m, 1H_{e/d}), 7.10-7.13 (m, 1H_{e/d}), 7.27-7.33 (m, 3H_{b-m}), 7.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 7.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H_n), 9.42 (bs, 1H, NH), 9.90 (bs, 1H, NH), 10.92 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.7 (C_i), 54.9 (C_j), 96.8 (C_o), 107.5 (C_g), 111.6 (C_b), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 122.1 (C_c), 123.3 (C_o), 125.6 (C_f), 128.1 (C_i), 131.8 (C_m), 132.1 (C_n), 134.0 (C_k), 136.6 (C_a)

HPLC : $t_R = 12.3$ min. **MS** : m/z 327, 329 ([M+H]⁺)

1-(3-Iodophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (226)



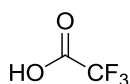
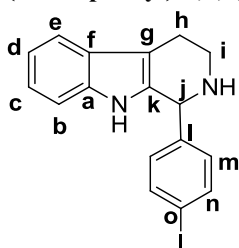
Yield : 75%
 Molecular formula : C₁₇H₁₅IN₂ · TFA
 MW (TFA salt) 488.24 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 374.22 g.mol⁻¹
 White solid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.01-3.12 (m, 2H_h), 3.37-3.44 (m, 2H_i), 5.95 (s, 1H_j), 7.03-7.06 (m, 1H_{c/d}), 7.10-7.14 (m, 1H_{c/d}), 7.26-7.34 (m, 3H_{b-p,q}), 7.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_e), 7.81 (s, 1H_m), 7.87 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H_o), 9.32 (bs, 1H, NH), 9.88 (bs, 1H, NH), 10.93 (s, 1H, 1NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.1 (C_h), 40.1 (C_i), 54.8 (C_j), 95.2 (C_n), 107.6 (C_g), 111.6 (C_b), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 122.1 (C_c), 125.6 (C_f), 127.9 (C_{p/q}), 129.3 (C_{p/q}), 130.9, 136.6, 137.1, 138.3, 138.4

HPLC : t_R = 12.8 min. **MS** : *m/z* 375 ([M+H]⁺)

1-(4-Iodophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (227)



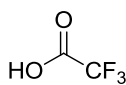
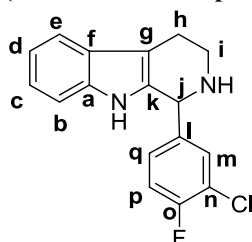
Yield : 66%
 Molecular formula : C₁₇H₁₅IN₂ · TFA
 MW (TFA salt) 488.24 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 374.22 g.mol⁻¹
 White solid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.95-3.15 (m, 2H_h), 3.41-3.44 (m, 2H_i), 5.93 (s, 1H_j), 7.02-7.06 (m, 1H_{c/d}), 7.09-7.13 (m, 1H_{c/d}), 7.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H_m), 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_b), 7.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_e), 7.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H_n), 9.65 (bs, 2H, NH), 10.91 (s, 1H, 1NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_h), 40.1 (C_i), 55.1 (C_j), 96.8 (C_o), 107.5 (C_g), 111.6 (C_b), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 122.1 (C_c), 125.7 (C_f), 128.1 (C_{a/k/l}), 132.1 (C_m), 134.4 (C_{a/k/l}), 136.6 (C_{a/k/l}), 137.7 (C_n)

HPLC : t_R = 13.2 min. **MS** : *m/z* 375 ([M+H]⁺)

1-(3-Chloro-4-fluorophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (228)



Yield : 42%
 Molecular formula : C₁₇H₁₄ClFN₂ · TFA
 MW (TFA salt) 414.78 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 300.76 g.mol⁻¹
 White solid

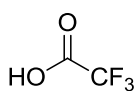
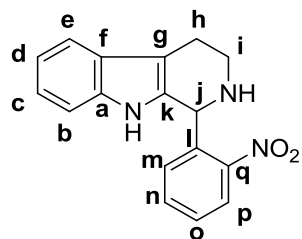
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.98-3.03 (m, 1H_h), 3.07-3.14 (m, 1H_h), 3.39-3.52 (m, 2H_i), 6.01 (s, 1H_j), 7.03-7.07 (m, 1H_{c/d}), 7.11-7.14 (m, 1H_{c/d}), 7.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H_b), 7.35-7.39 (m, 1H_p), 7.53-7.57 (m, 2H_{e-q}), 7.63-7.65 (m, 1H_m), 9.83 (s, 2H, NH), 10.95 (s, 1H, 1NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_h), 40.2 (C_i), 54.4 (C_j), 107.7 (C_g), 111.6 (C_b), 117.3 (d, *J* = 21.1 Hz, C_p), 118.4 (C_e), 119.2 (C_d), 119.9 (d, *J* = 18.2 Hz, C_n), 122.2 (C_c), 125.7 (C_f), 127.9 (C_i), 130.9 (d, *J* = 8.0 Hz, C_q), 132.3 (C_k), 132.5 (d, *J* = 4.0 Hz, C_m), 136.6 (C_a), 158.0 (d, *J* = 247.6 Hz, C_o)

RMN ¹⁹F (160 MHz, CFCl₃) δ - 73.7, - 114.8

HPLC : t_R = 12.2 min. **MS** : *m/z* 301 ([M+H]⁺)

1-(2-Nitrophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (229)



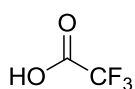
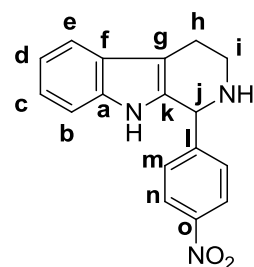
Yield :	88%
Molecular formula :	C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₂ · TFA
MW (TFA salt)	407.34 g.mol ⁻¹
MW (free amine)	293.32 g.mol ⁻¹
White powder	

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.02-3.05 (m, 1H_h), 3.13-3.17 (m, 1H_h), 3.30-3.37 (m, 1H_i), 3.54-3.60 (m, 1H_i), 6.44 (s, 1H_j), 7.05-7.08 (m, 1H_{c/d}), 7.12-7.16 (m, 1H_{c/d}), 7.22-7.25 (m, 1H_m), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_b), 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_e), 7.75-7.80 (m, 2H_{n-o}), 8.31-8.33 (m, 1H_p), 9.41 (bs, 1H, NH), 10.19 (bs, 1H, NH), 10.76 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.1 (C_h), 50.3 (C_i), 108.3 (C_g), 111.7 (C_b), 118.4 (C_e), 119.2 (C_d), 122.3 (C_c), 125.4, 125.5, 127.1, 129.4, 131.3, 132.4, 134.5, 136.5 (C_a), 148.8 (C_q)

HPLC : t_R = 9.5 min. **MS** : *m/z* 294 ([M+H]⁺)

1-(4-Nitrophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (230)



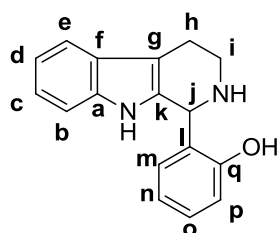
Yield :	87%
Molecular formula :	C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₂ · TFA
MW (TFA salt)	407.34 g.mol ⁻¹
MW (free amine)	293.32 g.mol ⁻¹
White powder	

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.04-3.11 (m, 2H_h), 3.45-3.48 (m, 2H_i), 6.14 (s, 1H_j), 7.04-7.07 (m, 1H_{c/d}), 7.11-7.15 (m, 1H_{c/d}), 7.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_b), 7.55 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_e), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H_m), 8.34 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H_n), 9.81 (bs, 2H, NH), 10.95 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_h), 40.3 (C_i), 54.7 (C_j), 107.7 (C_g), 111.6 (C_b), 118.4 (C_e), 119.3 (C_d), 122.3 (C_c), 123.8 (C_n), 125.6 (C_k), 127.6 (C_f), 131.6 (C_m), 136.6 (C_a), 141.6 (C_i), 148.4 (C_p)

HPLC : t_R = 10.4 min. **MS** : *m/z* 294 ([M+H]⁺)

2-(2,3,4,9-Tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol (231)



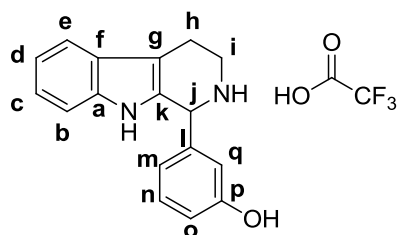
Yield :	31%
Molecular formula :	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O
MW :	264.32 g.mol ⁻¹
White powder	

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.71-2.73 (m, 2H_h), 2.94-2.97 (m, 1H_h), 3.09-3.12 (m, 1H_i), 5.31 (s, 1H_j), 6.69-6.77 (m, 2H_{n-p}), 6.92-7.06 (m, 3H_{c-d-o}), 7.10-7.14 (m, 1H_m), 7.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_b), 7.40 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_e), 10.41 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 21.6 (C_h), 40.1 (C_i), 54.5 (C_j), 107.4 (C_g), 111.1 (C_b), 115.9 (C_p), 117.5 (C_e), 118.2 (C_d), 118.4 (C_n), 120.7 (C_c), 126.1 (C_i), 126.7 (C_f), 128.4 (C_{m/o}), 129.0 (C_{m/o}), 133.5 (C_k), 135.9 (C_a), 157.0 (C_q)

HPLC : t_R = 9.6 min. **MS** : *m/z* 265 ([M+H]⁺)

3-(2,3,4,9-Tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol, TFA salt (232)



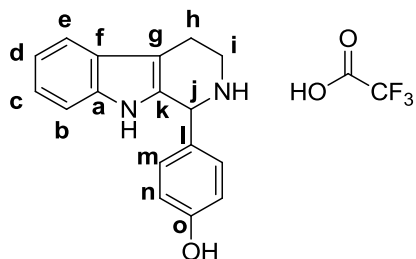
Yield : 88%
 Molecular formula : $C_{17}H_{16}N_2O \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 378.35 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 264.32 $g \cdot mol^{-1}$
 White powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.00-3.03 (m, 1H_h), 3.05-3.08 (m, 1H_h), 3.38-3.42 (m, 2H_i), 5.86 (s, 1H_j), 6.72 (s, 1H_q), 6.83-6.89 (m, 2H_{m-o}), 7.02-7.06 (m, 1H_{c/d}), 7.10-7.13 (m, 1H_{c/d}), 7.26-7.31 (m, 2H_{b-n}), 7.52 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 9.20 (bs, 1H, NH), 9.74 (s, 1H, OH), 9.88 (bs, 1H, NH), 10.93 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.1 (C_h), 40.0 (C_i), 55.5 (C_j), 107.2 (C_g), 111.5 (C_b), 116.5 (C_{o/q}), 116.8 (C_{o/q}), 118.2 (C_e), 119.0 (C_d), 120.3 (C_c), 122.0 (C_m), 125.6 (C_l), 128.3 (C_f), 130.0 (C_n), 135.9 (C_{a/k}), 136.5 (C_{a/k}), 157.7 (C_p)

HPLC : $t_R = 8.1$ min. **MS** : m/z 265 ($[M+H]^+$)

4-(2,3,4,9-Tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol, TFA salt (233)



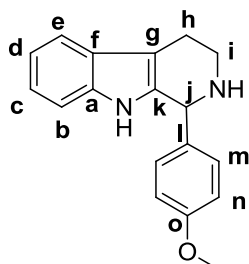
Yield : 83%
 Molecular formula : $C_{17}H_{16}N_2O \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 378.35 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 264.32 $g \cdot mol^{-1}$
 White powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.99-3.02 (m, 1H_h), 3.04-3.07 (m, 1H_h), 3.36-3.42 (m, 2H_i), 5.83 (s, 1H_j), 6.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H_n), 7.01-7.05 (m, 1H_{c/d}), 7.08-7.12 (m, 1H_{c/d}), 7.17 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H_m), 7.28 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H_b), 7.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 9.10 (bs, 1H, NH), 9.76 (bs, 1H, NH), 9.87 (s, 1H, OH), 10.88 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 55.3 (C_j), 107.1 (C_g), 111.5 (C_b), 115.5 (C_n), 118.1 (C_e), 119.0 (C_d), 121.9 (C_c), 124.7 (C_i), 125.7 (C_f), 128.8 (C_k), 131.2 (C_m), 136.5 (C_a), 158.8 (C_p)

HPLC : $t_R = 7.9$ min. **MS** : m/z 265 ($[M+H]^+$)

1-(4-Methoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (234)

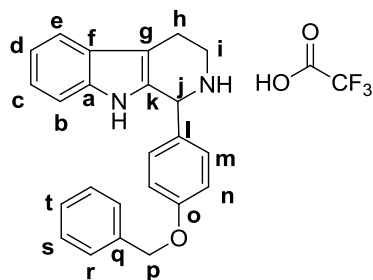


Yield : 39%
 Molecular formula : $C_{18}H_{18}N_2O$
 MW : 278.35 $g \cdot mol^{-1}$
 Beige solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.62-2.74 (m, 2H_h), 2.89-2.94 (m, 1H_i), 3.03-3.08 (m, 1H_i), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 5.03 (s, 1H_j), 6.83-6.86 (m, 3H_{c/d-n}), 6.91-7.00 (m, 2H_{b-c/d}), 7.20-7.25 (m, 2H_m), 7.39 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 10.39 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 22.3 (C_h), 41.4 (C_i), 55.0 (OCH₃), 56.7 (C_j), 108.2 (C_g), 111.1 (C_b), 114.3 (C_n), 117.6 (C_e), 118.3 (C_d), 120.7 (C_c), 126.9 (C_f), 129.2 (C_m), 135.3 (C_k), 136.0 (C_a), 144.8 (C_l), 159.3 (C_o)

HPLC : $t_R = 10.4$ min. **MS** : m/z 279 ($[M+H]^+$)

1-(4-(Benzyloxy)phenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (235)

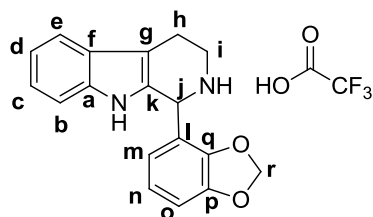
Yield : 23%
 Molecular formula : $C_{24}H_{22}N_2O \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 468.47 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 354.44 $g \cdot mol^{-1}$

White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.97-3.10 (m, 2H_h), 3.35-3.41 (m, 2H_i), 5.15 (s, 2H_p), 5.89 (s, 1H_j), 7.01-7.05 (m, 1H_{c,d}), 7.09-7.12 (m, 3H_{e/d-n}), 7.27-7.37 (m, 3H_{m-t}), 7.39 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H_{r/s}), 7.44 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H_{r/s}), 7.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H_e), 9.13 (s, 1H, NH), 9.73 (s, 1H, NH), 10.90 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 55.1 (C_j), 69.3 (C_p), 107.3 (C_g), 111.6 (C_b), 115.1 (C_n), 118.2 (C_e), 119.0 (C_d), 122.0 (C_c), 125.7 (C_m), 126.8 (C_l), 127.7 (C_r), 127.9 (C_t), 128.5 (C_s), 128.7 (C_k), 131.3 (C_m), 136.5 (C_a), 136.8 (C_q), 159.4 (C_o)

HPLC : $t_R = 15.2$ min. MS : m/z 355 ($[M+H]^+$)

1-(Benzo[d][1,3]dioxol-4-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (236)

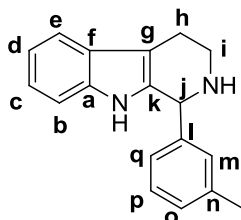
Yield : 38%
 Molecular formula : $C_{18}H_{16}N_2O_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 406.36 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 292.33 $g \cdot mol^{-1}$

White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.98-3.03 (m, 1H_h), 3.08-3.12 (m, 1H_h), 3.46-3.54 (m, 2H_i), 5.95 (s, 1H_j), 6.08 (s, 1H_r), 6.13 (s, 1H_r), 6.63 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_{m/o}), 6.86-6.90 (m, 1H_{m/o}), 7.02-7.05 (m, 2H_{c/d}), 7.09-7.13 (m, 1H_n), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.52 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 9.80 (bs, 2H, NH), 10.97 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.1 (C_i), 49.8 (C_j), 101.6 (C_r), 107.3 (C_g), 109.7 (C_o), 111.6 (C_b), 115.9 (C_n), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 122.0 (C_{c/k/m}), 122.1 (C_{c/k/m}), 122.2 (C_{c/k/m}), 125.7 (C_l), 127.7 (C_l), 136.6 (C_a), 146.6 (C_p), 147.6 (C_q)

HPLC : $t_R = 10.2$ min. MS : m/z 293 ($[M+H]^+$)

1-(*m*-Tolyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (237)

Yield : 64%
 Molecular formula : $C_{18}H_{18}N_2$
 MW : 262.35 $g \cdot mol^{-1}$

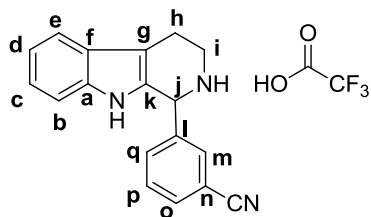
Beige solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.26 (s, 3H, CH₃), 2.62-2.74 (m, 2H_h), 2.87-2.93 (m, 1H_i), 3.03-3.08 (m, 1H_i), 5.02 (s, 1H_j), 6.91-7.00 (m, 2H_{c-d}), 7.05-7.09 (m, 3H_{m-o-q}), 7.18-7.21 (m, 2H_{b-p}), 7.39 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 10.37 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21.1 (CH₃), 22.2 (C_h), 41.4 (C_i), 56.8 (C_j), 108.2 (C_g), 111.1 (C_b), 117.5 (C_e), 118.2 (C_d), 120.5 (C_c), 125.7 (C_q), 126.9 (C_{f/o}), 127.9 (C_{f/o}), 128.0 (C_{m/p}), 129.0 (C_{m/p}), 135.5 (C_{a/k/l}), 136.0 (C_{a/k/l}), 137.1 (C_{a/k/l}), 143.2 (C_n)

HPLC : $t_R = 11.1$ min. MS : m/z 263 ($[M+H]^+$)

3-(2,3,4,9-Tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)benzonitrile, TFA salt (238)



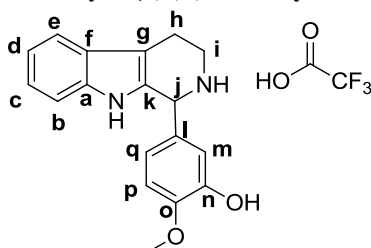
Yield : 81%
 Molecular formula : $C_{18}H_{15}N_3 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 387.36 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 273.33 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.99-3.05 (m, 1H_h), 3.09-3.14 (m, 1H_h), 3.40-3.50 (m, 2H_i), 6.06 (s, 1H_j), 7.04-7.07 (m, 1H_{e/d}), 7.11-7.15 (m, 1H_{e/d}), 7.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H_b), 7.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 7.69-7.72 (m, 2H_{p-q}), 7.86 (s, 1H_m), 7.98-7.99 (m, 1H_o), 9.82 (s, 2H, NH), 10.95 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.1 (C_i), 54.7 (C_j), 107.9 (C_g), 111.6 (C_b), 111.7 (C_n), 118.3 (CN), 118.4 (C_e), 119.2 (C_d), 122.2 (C_c), 125.7 (C_o), 127.6 (C_f), 130.1 (C_p), 133.5 (C_{l/m}), 133.7 (C_{l/m}), 134.8 (C_{a/k/q}), 136.2 (C_{a/k/q}), 136.6 (C_{a/k/q})

HPLC : $t_R = 9.3$ min. **MS** : m/z 274 ($[M+H]^+$)

2-Methoxy-5-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol, TFA salt (239)



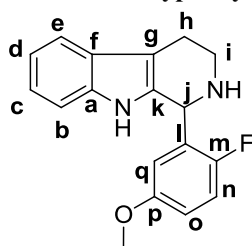
Yield : 60%
 Molecular formula : $C_{18}H_{18}N_2O_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 408.37 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 294.35 $g \cdot mol^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.96-3.00 (m, 1H_h), 3.04-3.11 (m, 1H_h), 3.35-3.45 (m, 2H_i), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 5.80 (s, 1H_j), 6.75 (s, 1H_m), 6.80 (dd, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, 1H_q), 7.00-7.05 (m, 2H_{e/d-p}), 7.09-7.12 (m, 1H_{e/d}), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 9.11 (bs, 1H, NH), 9.28 (s, 1H, OH), 9.79 (bs, 1H, NH), 10.89 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.0 (C_i), 55.4 (C_j), 55.8 (OCH₃), 107.2 (C_g), 111.6 (C_b), 112.2 (C_p), 116.7 (C_m), 118.2 (C_e), 119.0 (C_d), 121.0 (C_l), 121.9 (C_c), 125.7 (C_q), 126.9 (C_f), 128.9 (C_k), 136.5 (C_a), 146.7 (C_o), 148.9 (C_n)

HPLC : $t_R = 8.4$ min. **MS** : m/z 295 ($[M+H]^+$)

1-(2-Fluoro-5-methoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (240)



Yield : 91%
 Molecular formula : $C_{18}H_{17}FN_2O$
 MW : 296.34 $g \cdot mol^{-1}$
 Beige solid

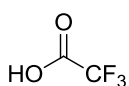
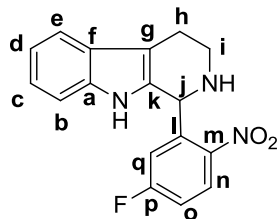
RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.62-2.67 (m, 1H_h), 2.71-2.74 (m, 1H_h), 2.92-2.97 (m, 1H_i), 3.03-3.07 (m, 1H_i), 3.60 (s, 3H, OCH₃), 5.36 (s, 1H_j), 6.47-6.49 (m, 1H_d), 6.86-6.90 (m, 1H_o), 6.92-6.96 (m, 1H_q), 6.98-7.02 (m, 2H_{c-d}), 7.15-7.22 (m, 2H_{b-n}), 7.41 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 10.47 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21.9 (C_h), 41.0 (C_i), 49.7 (d, $J = 2.5$ Hz, C_j), 55.5 (OCH₃), 108.8 (C_g), 111.1 (C_b), 113.3 (d, $J = 8.5$ Hz, C_{o/q}), 115.5 (d, $J = 4.0$ Hz, C_{o/q}), 115.9 (d, $J = 23.7$ Hz, C_n), 117.6 (C_e), 118.3 (C_d), 120.7 (C_c), 126.7 (C_f), 130.2 (d, $J = 15.2$ Hz, C_l), 133.7 (C_k), 135.9 (C_a), 154.8 (d, $J = 236.4$ Hz, C_m), 155.1 (d, $J = 1.4$ Hz, C_p)

RMN ^{19}F (160 MHz, CFCl₃) δ - 129.8

HPLC : $t_R = 10.3$ min. **MS** : m/z 297 ($[M+H]^+$)

1-(5-Fluoro-2-nitrophenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (241)



Yield : 80%
 Molecular formula : $C_{17}H_{14}FN_3O_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 425.33 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 311.31 $g \cdot mol^{-1}$

Yellow solid

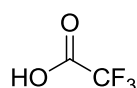
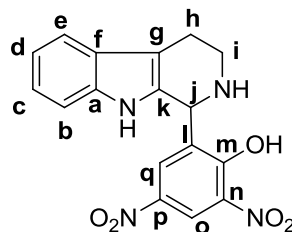
RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.96-3.03 (m, 1H_h), 3.12-3.18 (m, 1H_h), 3.38-3.45 (m, 1H_i), 3.56-3.60 (m, 1H_i), 6.46 (s, 1H_j), 7.01-7.09 (m, 2H_{c/d-q}), 7.13-7.17 (m, 1H_{c-d}), 7.34 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.58 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 7.64-7.68 (m, 1H_o), 8.43-8.47 (m, 1H_n), 9.45 (bs, 1H, NH), 10.19 (bs, 1H, 1NH), 10.75 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.1 (C_h), 40.2 (C_i), 50.2 (C_j), 108.6 (C_g), 111.7 (C_b), 118.3 (d, $J = 23.3$ Hz, C_o), 118.5 (C_e), 119.3 (C_d), 119.4 (d, $J = 25.1$ Hz, C_q), 122.5 (C_c), 125.4 (C_k), 126.6 (C_f), 129.0 (d, $J = 10.1$ Hz, C_n), 133.1 (d, $J = 8.4$ Hz, C_l), 136.6 (C_a), 145.4 (d, $J = 3.2$ Hz, C_m), 164.3 (d, $J = 254.2$ Hz, C_p)

RMN ^{19}F (160 MHz, $CFCl_3$) δ -74.3, -102.3

HPLC : $t_R = 10.2$ min. **MS** : m/z 312 ($[M+H]^+$)

2,4-Dinitro-6-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)benzoic acid, TFA salt (242)



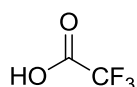
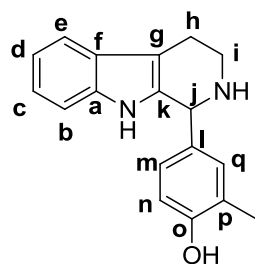
Yield : 56%
 Molecular formula : $C_{17}H_{14}N_4O_5 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 468.34 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 354.32 $g \cdot mol^{-1}$

Yellow solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.92-2.98 (m, 1H_h), 3.03-3.07 (m, 1H_h), 3.25-3.42 (m, 2H_i), 5.89 (s, 1H_j), 7.02-7.06 (m, 1H_{e/d}), 7.10-7.14 (m, 1H_{c-d}), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 7.64 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H_o), 8.68 (s, 1H, OH), 9.04 (bs, 1H, NH), 9.58 (bs, 1H, 1NH), 10.95 (s, 1H, 1NH)

MS : m/z 355 ($[M+H]^+$)

2-Methyl-4-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol, TFA salt (243)

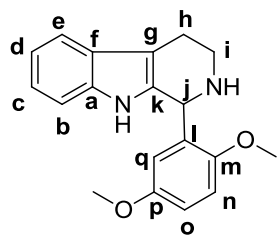


Yield : 60%
 Molecular formula : $C_{18}H_{16}N_2O \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 392.37 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 278.35 $g \cdot mol^{-1}$

White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.11 (s, 3H, CH₃), 2.95-3.00 (m, 1H_h), 3.04-3.11 (m, 1H_h), 3.38-3.45 (m, 2H_i), 5.78 (s, 1H_j), 6.84 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_n), 6.97-7.12 (m, 4H_{c-d-m-q}), 7.27 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 9.08 (bs, 1H, NH), 9.74 (bs, 1H, NH), 9.80 (s, 1H, OH), 10.85 (s, 1H, NH)

HPLC : $t_R = 9.5$ min. **MS** : m/z 279 ($[M+H]^+$)

1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (244)

Yield : 47%

Molecular formula : $C_{19}H_{20}N_2O_2$

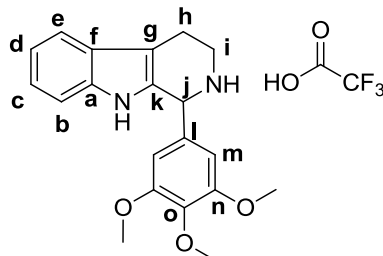
MW : 308.37 $g \cdot mol^{-1}$

Beige solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.61-2.70 (m, 2H_h), 2.88-2.91 (m, 1H_i), 2.97-3.01 (m, 1H_i), 3.56 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 5.40 (s, 1H_j), 6.37 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H_q), 6.80-6.83 (m, 1H_o), 6.91-7.00 (m, 3H_{e-d-n}), 7.21 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_b), 7.39 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 10.33 (s, 1H, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 22.2 (C_h), 40.8 (C_i), 50.1 (C_j), 55.3 (OCH₃), 56.0 (OCH₃), 108.6 (C_g), 111.1 (C_b), 111.8 (C_{n/o/q}), 111.9 (C_{n/o/q}), 115.7 (C_{n/o/q}), 117.5 (C_e), 118.2 (C_d), 120.5 (C_c), 126.8 (C_f), 131.8 (C_l), 134.8 (C_k), 135.9 (C_a), 151.2 (C_{m/p}), 152.8 (C_{m/p})

HPLC : $t_R = 11.3$ min. **MS** : m/z 309 ($[M+H]^+$)

1-(2,3,4-Trimethoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (245)

Yield : 40%

Molecular formula : $C_{20}H_{22}N_2O_2 \cdot TFA$

MW (TFA salt) : 452.42 $g \cdot mol^{-1}$

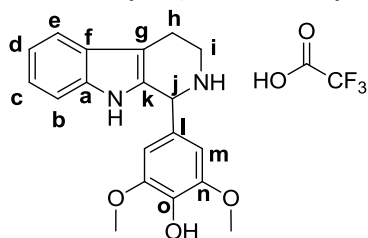
MW (free amine) : 338.40 $g \cdot mol^{-1}$

White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.99-3.14 (m, 2H_h), 3.42-3.46 (m, 1H_i), 3.59-3.63 (m, 1H_i), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 5.88 (s, 1H_j), 6.74 (s, 2H_m), 7.03-7.07 (m, 1H_{e/d}), 7.10-7.14 (m, 1H_{e/d}), 7.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.54 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 9.45 (bs, 1H, NH), 9.98 (bs, 1H, NH), 10.91 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.9 (C_i), 56.0 (OCH₃), 56.3 (OCH₃), 60.0 (C_j), 107.2 (C_m), 107.3 (C_g), 111.7 (C_b), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 122.0 (C_c), 125.8 (C_f), 128.6 (C_k), 130.0 (C_l), 136.6 (C_a), 138.5 (C_o), 153.1 (C_n)

HPLC : $t_R = 9.9$ min. **MS** : m/z 339 ($[M+H]^+$)

2,6-Dimethoxy-4-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol, TFA salt (246)

Yield : 63%

Molecular formula : $C_{19}H_{20}N_2O_3 \cdot TFA$

MW (TFA salt) : 438.40 $g \cdot mol^{-1}$

MW (free amine) : 324.37 $g \cdot mol^{-1}$

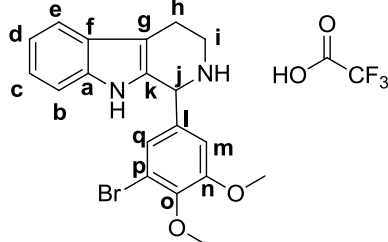
White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.97-3.01 (m, 1H_h), 3.09-3.13 (m, 1H_h), 3.35-3.42 (m, 1H_i), 3.54-3.57 (m, 1H_i), 3.70 (s, 6H, OCH₃), 5.82 (s, 1H_j), 6.67 (s, 2H_m), 7.01-7.05 (m, 1H_{e/d}), 7.08-7.12 (m, 1H_{e/d}), 7.29 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_b), 7.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 8.79 (s, 1H, OH), 9.25 (bs, 1H, NH), 9.89 (bs, 1H, NH), 10.85 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.7 (C_i), 56.1 (OCH₃), 56.4 (C_j), 107.1 (C_g), 107.4 (C_m), 111.6 (C_b), 118.2 (C_e), 119.0 (C_d), 121.9 (C_c), 124.1 (C_l), 125.8 (C_f), 128.9 (C_k), 136.6 (C_{a/o}), 137.1 (C_{a/o}), 148.0 (C_n)

HPLC : $t_R = 8.2$ min. **MS** : m/z 325 ($[M+H]^+$)

1-(3-Bromo-4,5-dimethoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (247)



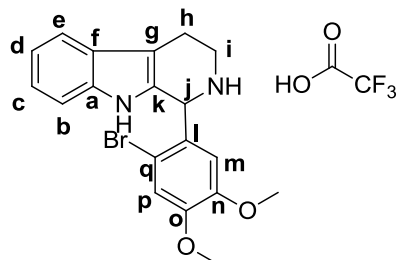
Yield : 86%
 Molecular formula : $C_{19}H_{19}BrN_2O_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) $501.29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 MW (free amine) $387.27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.98-3.02 (m, 1H_h), 3.07-3.10 (m, 1H_h), 3.40-3.43 (m, 1H_i), 3.52-3.54 (m, 1H_i), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 5.93 (s, 1H_j), 7.03-7.06 (m, 1H_{e/d}), 7.10-7.14 (m, 2H), 7.18 (d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H_{m/q}), 7.30 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H_b), 7.53 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H_e), 9.36 (bs, 1NH), 9.93 (bs, 1NH), 10.94 (s, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 40.6 (C_i), 55.2 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 60.1 (C_j), 107.6 (C_g), 111.7 (C_b), 114.2 (C_m), 116.8 (C_p), 118.4 (C_e), 119.0 (C_d), 122.2 (C_c), 125.4 (C_q), 125.7 (C_f), 128.0 (C_l), 132.0 (C_k), 136.6 (C_a), 146.8 (C_o), 153.5 (C_n)

HPLC : $t_R = 13.0 \text{ min}$. **MS** : m/z 387, 389 ($[M+H]^+$)

1-(2-Bromo-4,5-dimethoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (248)



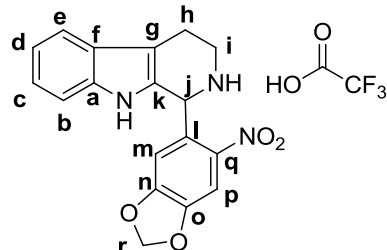
Yield : 60%
 Molecular formula : $C_{19}H_{19}BrN_2O_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) $501.29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 MW (free amine) $387.27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.97-3.01 (m, 1H_h), 3.12-3.16 (m, 1H_h), 3.54 (s, 3H, OCH₃), 3.55-3.60 (m, 2H_i), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 6.07 (s, 1H_j), 6.66 (s, 1H_m), 7.02-7.06 (m, 1H_{e/d}), 7.09-7.13 (m, 1H_{e/d}), 7.28 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H_b), 7.37 (s, 1H_p), 7.53 (d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H_e), 9.22 (bs, 1NH), 9.88 (bs, 1NH), 10.88 (s, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 41.2 (C_i), 55.6 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 56.2 (C_j), 107.5 (C_g), 111.7 (C_b), 113.4 (C_q), 115.6 (C_{m/p}), 115.8 (C_{m/p}), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 122.1 (C_c), 125.1 (C_{f/k/l}), 125.7 (C_{f/k/l}), 128.2 (C_{f/k/l}), 136.7 (C_a), 148.5 (C_o), 150.7 (C_n)

HPLC : $t_R = 10.9 \text{ min}$. **MS** : m/z 387, 389 ($[M+H]^+$)

1-(6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (249)



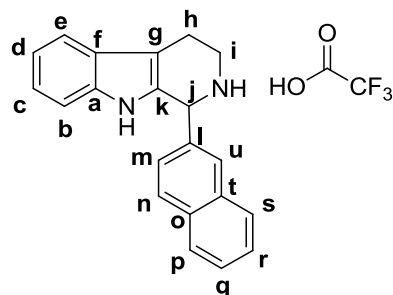
Yield : 79%
 Molecular formula : $C_{18}H_{15}N_3O_4 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) : $451.35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 MW (free amine) : $337.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 Yellow solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.94-3.02 (m, 1H_h), 3.11-3.15 (m, 1H_h), 3.36-3.39 (m, 1H_i), 3.54-3.57 (m, 1H_i), 6.26 (s, 1H_r), 6.28 (s, 1H_r), 6.36 (s, 1H_j), 6.61 (s, 1H_m), 7.04-7.08 (m, 1H_{e/d}), 7.12-7.16 (m, 1H_{e/d}), 7.33 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H_b), 7.56 (d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H_e), 7.93 (s, 1H_p), 9.31 (bs, 1H, NH), 10.10 (bs, 1H, NH), 10.75 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 50.5 (C_j), 104.2, 106.0, 108.4, 110.5, 111.7 (C_b), 118.5 (C_e), 119.2 (C_d), 122.4 (C_c), 125.5, 126.1, 127.3, 136.6 (C_a), 143.7 (C_q), 148.8 (C_o), 152.0 (C_n)

HPLC : $t_R = 10.3 \text{ min}$. **MS** : m/z 338 ($[M+H]^+$)

1-(Naphthalen-2-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (250)



Yield : 91%
 Molecular formula : $C_{21}H_{18}N_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 412.40 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 298.38 $g \cdot mol^{-1}$

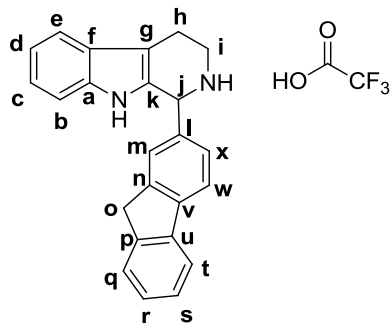
White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.03-3.09 (m, 1H_h), 3.13-3.19 (m, 1H_h), 3.49-3.57 (m, 2H_i), 6.12 (s, 1H_j), 7.04-7.08 (m, 1H_{c/d}), 7.10-7.14 (m, 1H_{c/d}), 7.27 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.50 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, 1H_m), 7.55-7.62 (m, 3H_{e-q,u}), 7.96-8.05 (m, 4H_{n-p,r-s}), 9.55 (bs, 1H, NH), 9.97 (bs, 1H, NH), 10.92 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.3 (C_h), 40.5 (C_i), 56.0 (C_j), 107.5 (C_g), 111.7 (C_b), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 122.1 (C_c), 125.8, 126.7, 126.8, 127.3, 127.7, 128.3, 128.6, 128.7, 129.8, 132.3, 132.6, 133.5, 136.7 (C_a)

HPLC : $t_R = 13.6$ min. **MS** : m/z 299 ($[M+H]^+$)

1-(9H-Fluoren-2-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (251)



Yield : 77%
 Molecular formula : $C_{24}H_{20}N_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 450.45 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 336.43 $g \cdot mol^{-1}$

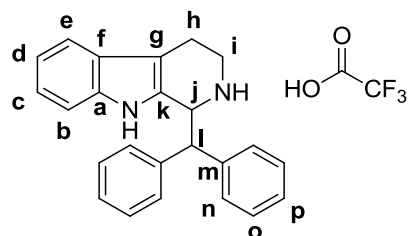
White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.01-3.05 (m, 1H_h), 3.12-3.16 (m, 1H_h), 3.45-3.49 (m, 2H_i), 3.94 (s, 2H_o), 6.04 (s, 1H_j), 7.04-7.07 (m, 1H_{c/d}), 7.10-7.14 (m, 1H_{c/d}), 7.13 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H_x), 7.28-7.45 (m, 3H_{b-m,r}), 7.54-7.61 (m, 3H_{e-q,s}), 7.96 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H_{t/w}), 8.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_{t/w}), 9.27 (bs, 1H, NH), 9.87 (bs, 1H, NH), 10.95 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 36.4 (C_o), 40.1 (C_i), 55.8 (C_j), 107.4 (C_g), 111.6 (C_b), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 120.3 (C_{q/t}), 120.5 (C_{q/t}), 122.0 (C_c), 125.3, 125.7, 126.5, 127.0, 127.5, 128.7, 128.8, 133.1 (C_k), 136.6 (C_a), 140.3 (C_{u/v}), 142.7 (C_{u/v}), 143.4 (C_{n-p})

HPLC : $t_R = 15.0$ min. **MS** : m/z 337 ($[M+H]^+$)

1-Benzylhydryl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (252)



Yield : 85%
 Molecular formula : $C_{24}H_{22}N_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 452.47 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 338.44 $g \cdot mol^{-1}$

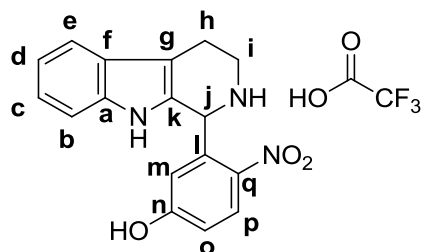
White powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.95-3.00 (m, 2H_h), 3.25-3.34 (m, 1H_i), 3.54-3.64 (m, 1H_i), 4.77 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H_j), 5.77 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H_j), 6.98-7.07 (m, 2H_{c-d}), 7.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.29-7.47 (m, 9H), 7.56-7.58 (m, 2H), 8.19-8.27 (m, 1H, NH), 9.30-9.41 (m, 2H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.1 (C_h), 53.3 (C_{j/l}), 53.9 (C_{j/l}), 106.8 (C_g), 111.8 (C_b), 118.0 (C_e), 119.1 (C_d), 122.0 (C_c), 125.5 (C_f), 1127.3, 127.6 (C_p), 128.5, 128.6 (C_n), 128.9 (C_k), 129.0, 129.1 (C_o), 136.1 (C_a), 139.4, 140.2 (C_m)

HPLC : $t_R = 14.4$ min. **MS** : m/z 339 ($[M+H]^+$)

4-Nitro-3-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol, TFA salt (253)



Yield : 85%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}N_3O_3 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 423.34 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 309.32 $g \cdot mol^{-1}$

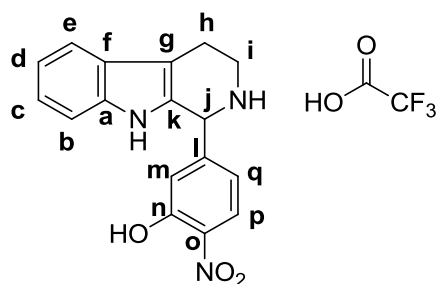
White powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.97-3.16 (m, 2H_h), 3.22-3.27 (m, 1H_i), 3.53-3.57 (m, 1H_i), 6.47 (s, 1H_j), 6.51 (s, 1H_m), 7.03-7.09 (m, 2H_{c/d-o}), 7.14-7.18 (m, 1H_{c/d}), 7.36 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 8.29 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H_p), 9.25 (bs, 1H, NH), 10.15 (bs, 1H, NH), 10.81 (s, 1H, NH), 11.32 (s, 1H, OH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.1 (C_h), 38.7 (C_i), 50.5 (C_j), 108.4 (C_g), 111.7 (C_b), 117.1 (C_o), 118.4 (C_e), 119.1 (C_{d/m}), 119.2 (C_{d/m}), 122.4 (C_c), 125.4 (C_{l/p}), 126.9 (C_f), 128.9 (C_{l/p}), 132.6 (C_q), 136.5 (C_{a/k}), 140.0 (C_{a/k}), 163.0 (C_n)

HPLC : $t_R = 8.6$ min. MS : m/z 310 ($[M+H]^+$)

6-Nitro-3-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol, TFA salt (254)



Yield : 96%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}N_3O_3 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 423.34 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 309.32 $g \cdot mol^{-1}$

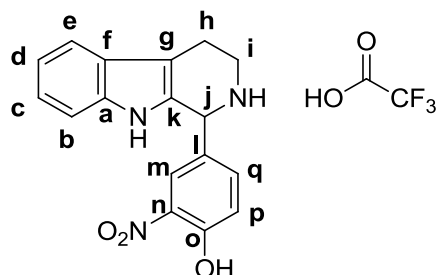
White powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.98-3.15 (m, 2H_h), 3.43-3.48 (m, 2H_i), 6.47 (s, 1H_j), 6.51 (s, 1H_m), 7.03-7.09 (m, 2H_{c/d-o}), 7.14-7.18 (m, 1H_{c/d}), 7.36 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 8.29 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H_p), 9.25 (bs, 1H, NH), 10.15 (bs, 1H, NH), 10.81 (s, 1H, NH), 11.32 (bs, 1H, OH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.1 (C_h), 40.3 (C_i), 54.7 (C_j), 107.6 (C_g), 111.6 (C_b), 118.3 (C_e), 119.2 (C_d), 120.4 (C_{m/q}), 120.5 (C_{m/q}), 122.2 (C_c), 125.6 (C_p), 125.6 (C_o), 127.6 (C_f), 136.6 (C_{a/k/l}), 137.9 (C_{a/k/l}), 141.0 (C_{a/k/l}), 151.7 (C_n)

HPLC : $t_R = 9.9$ min. MS : m/z 310 ($[M+H]^+$)

2-Nitro-4-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol, TFA salt (255)



Yield : 91%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}N_3O_3 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 423.34 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 309.32 $g \cdot mol^{-1}$

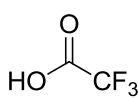
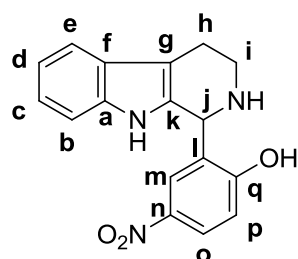
White powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.97-3.11 (m, 2H_h), 3.34-3.48 (m, 2H_i), 5.99 (s, 1H_j), 7.03-7.06 (m, 1H_{c/d}), 7.11-7.14 (m, 1H_{c/d}), 7.22 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H_p), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.46 (dd, $J_1 = 2.2$ Hz, $J_2 = 8.6$ Hz, 1H_q), 7.53 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 7.95 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H_m), 9.90 (bs, 2H, NH), 10.93 (s, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.1 (C_h), 40.0 (C_i), 54.4 (C_j), 107.6 (C_g), 111.6 (C_b), 118.3 (C_e), 119.2 (C_d), 119.5 (C_p), 122.1 (C_c), 125.2 (C_{l/m}), 125.7 (C_{l/m}), 127.0 (C_n), 127.9 (C_f), 136.2 (C_{a/k/q}), 136.5 (C_{a/k/q}), 136.8 (C_{a/k/q}), 153.3 (C_p)

HPLC : $t_R = 9.7$ min. MS : m/z 310 ($[M+H]^+$)

4-Nitro-2-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol, TFA salt (256)



Yield : 83%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}N_3O_3 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 423.34 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 309.32 g.mol⁻¹

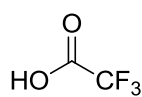
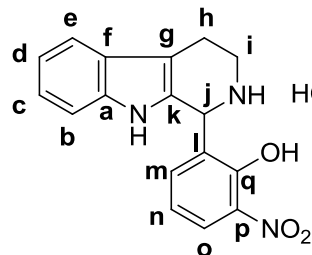
White powder

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.99-3.05 (m, 1H_h), 3.08-3.12 (m, 1H_h), 3.45-3.52 (m, 2H_i), 6.12 (s, 1H_j), 7.05-7.08 (m, 1H_{c/d}), 7.12-7.16 (m, 1H_{c/d}), 7.20 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H_p), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.56 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 7.77 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H_m), 8.25 (dd, $J_1 = 2.8$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz, 1H_o), 9.58 (bs, 2H, NH), 10.96 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_h), 40.3 (C_i), 49.8 (C_j), 107.9 (C_g), 111.6 (C_b), 116.3 (C_p), 118.3 (C_e), 119.2 (C_d), 121.7 (C_{l/o}), 122.2 (C_c), 125.6 (C_{l/o}), 126.7 (C_m), 127.3 (C_k), 136.5 (C_a), 139.2 (C_n), 162.8 (C_q)

HPLC : $t_R = 10.3$ min. **MS** : m/z 310 ([M+H]⁺)

6-Nitro-2-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol, TFA salt (257)



Yield : 88%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}N_3O_3 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 423.34 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 309.32 g.mol⁻¹

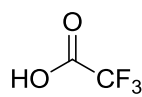
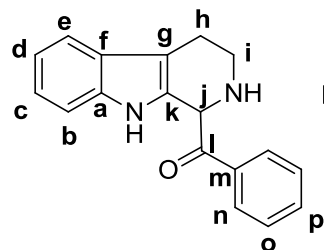
White powder

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.00-3.03 (m, 1H_h), 3.06-3.08 (m, 1H_h), 3.28-3.34 (m, 1H_i), 3.48-3.54 (m, 1H_i), 6.17 (s, 1H_j), 7.01-7.07 (m, 2H_{c/d-n}), 7.11-7.15 (m, 1H_{c/d}), 7.24 (dd, $J_1 = 1.4$ Hz, $J_2 = 7.4$ Hz, 1H_m), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.54 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 8.09 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H_o), 9.69 (bs, 2H, NH), 10.95 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_h), 39.6 (C_i), 49.3 (C_j), 107.8 (C_g), 111.5 (C_b), 118.2 (C_e), 119.1 (C_{d/n}), 119.3 (C_{d/n}), 122.1 (C_c), 125.6 (C_{o/n}), 126.0 (C_{o/n}), 126.7 (C_p), 127.4 (C_f), 136.5 (C_{a/k/m}), 136.5 (C_{a/k/m}), 137.0 (C_{a/k/m}), 151.4 (C_q)

HPLC : $t_R = 9.9$ min. **MS** : m/z 310 ([M+H]⁺)

Phenyl(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)methanone, TFA salt (258)



Yield : 6%
 Molecular formula : $C_{18}H_{16}N_2O \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 390.36 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 276.33 g.mol⁻¹

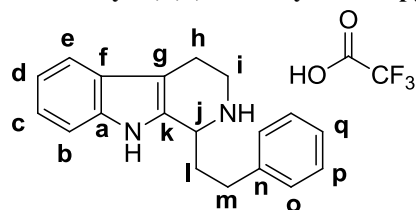
White solid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (TFA salt) 3.51-3.54 (m, 2H_h), 3.64-3.68 (m, 2H_i), 5.71 (s, 1H_j), 7.13-7.17 (m, 1H_{c/d}), 7.36-7.49 (m, 7H), 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H_{b/e}), 10.04 (bs, 2H, NH), 11.78 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (free amine) 22.9 (C_h), 45.1 (C_i), 68.0 (C_j), 113.2, 120.8, 121.9, 122.0, 126.9, 127.6, 129.2, 129.7 (C_o), 130.2 (C_k), 132.0 (C_n), 134.8 (C_a), 138.3 (C_m), 186.9 (C_l)

HPLC : $t_R = 8.4$ min. **MS** : m/z 277 ([M+H]⁺)

1-Phenethyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (259)



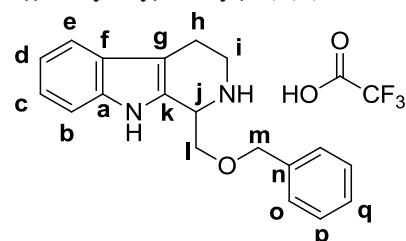
Yield : 46%
 Molecular formula : $C_{19}H_{20}N_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 390.40 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 276.39 g.mol⁻¹
 White powder

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.10-2.18 (m, 1H_m), 2.77-2.90 (m, 2H_i), 2.92-3.00 (m, 2H_h), 3.35-3.43 (m, 1H_i), 3.66-3.69 (m, 1H_i), 4.75 (s, 1H_j), 7.02-7.05 (m, 1H_{c/d}), 7.11-7.15 (m, 1H_{c/d}), 7.22-7.25 (m, 1H_q), 7.29-7.38 (m, 5H_{b-p-q}), 7.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 9.04 (bs, 1H, NH), 9.50 (bs, 1H, NH), 11.17 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_h), 30.8 (C_m), 33.5 (C_i), 40.1 (C_i), 52.5 (C_j), 105.9 (C_g), 111.4 (C_b), 118.1 (C_e), 119.0 (C_d), 121.8 (C_c), 125.8 (C_{f/q}), 126.1 (C_{f/q}), 128.3 (C_{o/p}), 128.5 (C_{o/p}), 130.0 (C_k), 136.3 (C_a), 140.8 (C_n)

HPLC : t_R = 12.8 min. **MS** : m/z 277 ([M+H]⁺)

1-((Benzyloxy)methyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (260)



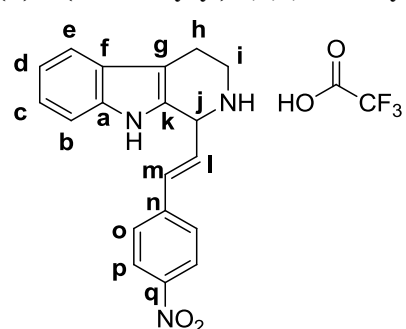
Yield : 36%
 Molecular formula : $C_{19}H_{20}N_2O \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 406.40 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 292.39 g.mol⁻¹
 White powder

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.91-3.00 (m, 2H_h), 3.35-3.42 (m, 1H_i), 3.60-3.63 (m, 1H_i), 3.86-3.90 (m, 1H_i), 4.13-4.16 (m, 1H_i), 4.63 (s, 2H_m), 4.93-4.95 (m, 1H_j), 7.02-7.05 (m, 1H_{c/d}), 7.12-7.15 (m, 1H_{c/d}), 7.30-7.44 (m, 6H_{b-n-o-p}), 7.49 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 9.11 (bs, 1H, NH), 9.60 (bs, 1H, NH), 11.16 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_h), 40.9 (C_i), 52.1 (C_j), 68.5 (C_m), 72.7 (C_i), 106.9 (C_g), 111.5 (C_b), 118.1 (C_e), 119.1 (C_d), 121.9 (C_c), 125.9 (C_{f/k/q}), 126.9 (C_{f/k/q}), 127.7 (C_{f/k/q}), 127.8 (C_{o/p}), 128.3 (C_{o/p}), 136.4 (C_a), 137.6 (C_n)

HPLC : t_R = 12.3 min. **MS** : m/z 293 ([M+H]⁺)

(E)-1-(4-Nitrostyryl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (261)



Yield : 59%
 Molecular formula : $C_{19}H_{17}N_3O_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 433.38 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 319.37 g.mol⁻¹

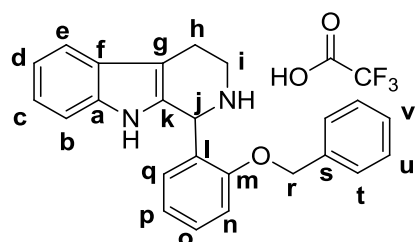
Yellow solid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.95-3.03 (m, 2H_h), 3.46-3.52 (m, 1H_i), 3.62-3.66 (m, 1H_i), 5.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_j), 6.73-6.79 (m, 1H_i), 7.02-7.14 (m, 3H_{c-d-m}), 7.35 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H_b), 7.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 7.81 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H_o), 8.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H_p), 9.56 (bs, 1H, NH), 9.71 (bs, 1H, NH), 11.15 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.2 (C_h), 53.7 (C_j), 106.2 (C_p), 111.6 (C_b), 118.3 (C_e), 119.1 (C_d), 122.0 (C_c), 124.1 (C_o), 125.9 (C_i), 127.4 (C_f), 128.1 (C_m), 128.1 (C_p), 134.8 (C_k), 136.6 (C_a), 142.1 (C_n), 147.1 (C_q)

HPLC : t_R = 13.0 min. **MS** : m/z 320 ([M+H]⁺)

1-(2-(Benzyloxy)phenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (**262**)



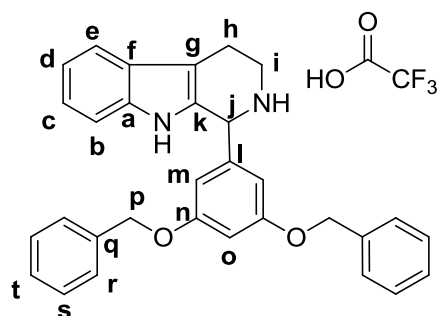
Yield : 52%
 Molecular formula : $C_{24}H_{22}N_2O \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 468.47 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 354.44 g.mol⁻¹
 Yellow powder

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.96-3.10 (m, 2H_h), 3.37-3.41 (m, 1H_i), 3.45-3.54 (m, 1H_i), 5.22 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H_r), 5.26 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H_r), 6.13 (s, 1H_j), 6.96-7.01 (m, 3H), 7.12-7.15 (m, 1H), 7.30-7.38 (m, 5H), 7.45-7.52 (m, 3H_{t,q}), 7.55 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 8.88 (bs, 1H, NH), 9.92 (bs, 1H, NH), 10.96 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.9 (C_h), 50.3 (C_j), 70.1 (C_r), 108.0 (C_g), 111.9 (C_b), 113.0 (C_n), 118.6, 119.5, 121.2, 122.5, 122.9, 122.9, 126.1 (C_o), 127.8 (C_t), 128.3 (C_v), 128.8 (C_u), 131.1 (C_{q/s}), 131.9 (C_{q/s}), 136.9 (C_{a/k}), 137.1 (C_{a/k}), 156.8 (C_m)

HPLC : t_R = 15.1 min. **MS** : m/z 355 ([M+H]⁺)

1-(3,5-Bis(benzyloxy)phenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (**263**)



Yield : 36%
 Molecular formula : $C_{31}H_{28}N_2O_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 574.59 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 460.57 g.mol⁻¹

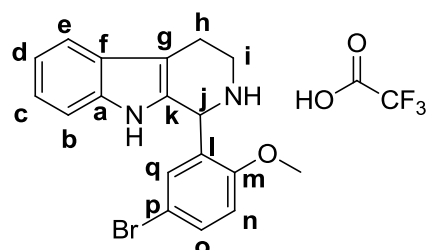
Grey solid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.99-3.09 (m, 2H_h), 3.36-3.44 (m, 2H_i), 5.08 (s, 4H_p), 5.88 (s, 1H_j), 6.66 (s, 2H_m), 6.85 (s, 1H_o), 7.05-7.08 (m, 1H_{e/d}), 7.13-7.18 (m, 1H_{e/d}), 7.31-7.42 (m, 11H), 7.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 9.29 (bs, 1H, NH), 9.92 (bs, 1H, NH), 10.93 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.1 (C_h), 55.4 (C_j), 69.5 (C_p), 102.5 (C_o), 107.2 (C_g), 108.9 (C_m), 111.6 (C_b), 118.2 (C_e), 119.0 (C_d), 122.0 (C_c), 125.6 (C_t), 127.7 (C_r), 127.9 (C_t), 128.0 (C_i), 128.4 (C_s), 136.5 (C_a), 136.5 (C_q), 137.8 (C_k), 159.7 (C_n)

HPLC : t_R = 17.6 min. **MS** : m/z 461 ([M+H]⁺)

1-(3-Bromo-6-methoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (**264**)



Yield : 48%
 Molecular formula : $C_{18}H_{17}BrN_2O \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 471.27 g.mol⁻¹
 MW (free amine) 357.24 g.mol⁻¹

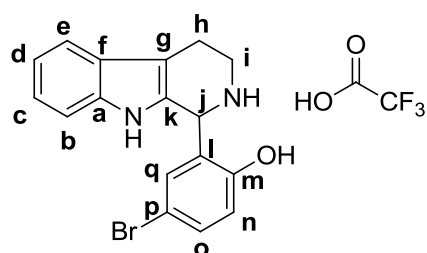
Ochre powder

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.66-2.77 (m, 2H_h), 2.90-3.02 (m, 2H_i), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 5.45 (s, 1H_j), 6.93-7.01 (m, 4H_{c-d-n-o}), 7.25 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.41-7.46 (m, 2H_{e-q}), 10.37 (s, 1NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 22.5 (C_h), 41.3 (C_j), 55.3 (OCH₃), 56.4 (C_j), 109.3 (C_n), 111.5 (C_b), 112.0 (C_g), 113.9, 117.5, 118.2, 120.6, 126.7, 130.8, 131.0, 133.2 (C_k), 134.0 (C_q), 135.8 (C_a), 156.2 (C_m)

HPLC : t_R = 13.3 min. **MS** : m/z 357, 359 ([M+H]⁺)

4-Bromo-2-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol, TFA salt (265)



Yield : 87%
 Molecular formula : $C_{17}H_{15}BrN_2O \cdot TFA$
 MW (TFA salt) $457.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 MW (free amine) $343.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

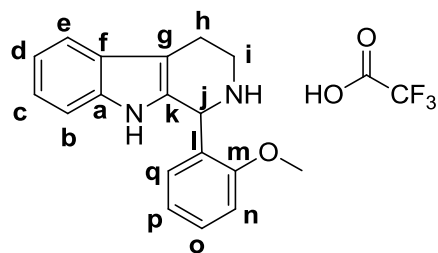
Yellow powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.95-3.02 (m, 1H_h), 3.06-3.13 (m, 1H_h), 3.33-3.40 (m, 1H_i), 3.44-3.50 (m, 1H_i), 6.03 (s, 1H_j), 6.96 (d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 1 H_q), 7.02 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H_n), 7.04-7.08 (m, 1H_{e/d}), 7.12-7.16 (m, 1H_{e/d}), 7.33 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H_b), 7.49 (dd, $J_1 = 2.4 \text{ Hz}$, $J_2 = 8.8 \text{ Hz}$, 1H_o), 7.53 (d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H_e), 9.01 (bs, 1NH), 9.85 (bs, 1NH), 10.96 (s, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.7 (C_h), 49.8 (C_j), 107.6 (C_g), 109.9 (C_b), 111.5 (C_p), 117.9 (C_{d/e/l}), 118.2 (C_{d/e/l}), 119.1 (C_{d/e/l}), 122.0 (C_o), 123.1 (C_e), 125.6 (C_n), 127.6 (C_f), 132.4 (C_k), 133.6 (C_q), 136.4 (C_a), 155.4 (C_m)

HPLC : $t_R = 12.3 \text{ min}$. **MS** : m/z 343, 345 ($[M+H]^+$)

1-(2-Methoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (266)



Yield : 54%
 Molecular formula : $C_{18}H_{18}N_2O \cdot TFA$
 MW (TFA salt) $392.37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 MW (free amine) $278.35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

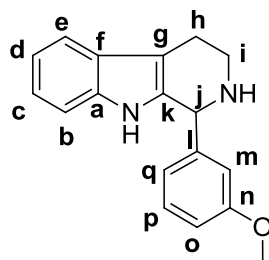
Grey powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.99-3.12 (m, 2H_h), 3.20-3.27 (m, 1H_i), 3.45-3.48 (m, 1H_i), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 6.08 (s, 1H_j), 6.88 (d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H_n), 6.96-7.00 (m, 1H_o), 7.03-7.07 (m, 1H_{e/d}), 7.11-7.14 (m, 1H_{e/d}), 7.21 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 1H_q), 7.30 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 1H_b), 7.46-7.54 (m, 2H_{e-p}), 8.87 (bs, 1H, NH), 9.72 (bs, 1H, NH), 10.93 (s, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.3 (C_h), 40.2 (C_i), 49.4 (C_j), 55.8 (OCH₃), 107.7 (C_g), 111.4 (C_{b/n}), 111.5 (C_{b/n}), 118.2 (C_e), 119.1 (C_d), 120.5 (C_p), 122.0 (C_e), 122.3 (C_i), 125.7 (C_f), 127.9 (C_o), 130.4 (C_k), 131.4 (C_q), 136.5 (C_a), 157.3 (C_n)

HPLC : $t_R = 11.0 \text{ min}$. **MS** : m/z 279 ($[M+H]^+$)

1-(3-Methoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (267)



Yield : 65%
 Molecular formula : $C_{18}H_{18}N_2O \cdot TFA$
 MW (TFA salt) $392.37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 MW (free amine) $278.35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

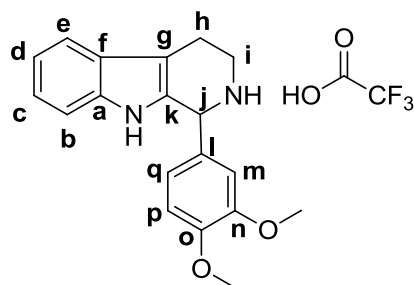
Green powder

RMN 1H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.98-3.04 (m, 1H_h), 3.07-3.14 (m, 1H_h), 3.38-3.47 (m, 2H_i), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 5.91 (s, 1H_j), 7.03-7.06 (m, 3H), 7.10-7.14 (m, 1H), 7.29-7.32 (m, 3H), 7.53 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H_e), 9.18 (bs, 1H, NH), 9.82 (bs, 1H, NH), 10.88 (s, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.1 (C_h), 55.1 (OCH₃), 55.3 (C_j), 107.2 (C_g), 111.5 (C_b), 114.2 (C_{m/o}), 114.5 (C_{m/o}), 118.1 (C_e), 119.0 (C_d), 121.9 (C_e), 125.6 (C_q), 126.4 (C_f), 128.6 (C_p), 131.2 (C_{k-l}), 136.5 (C_a), 160.3 (C_n)

HPLC : $t_R = 10.4 \text{ min}$. **MS** : m/z 279 ($[M+H]^+$)

1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (268)



Yield : 54%
 Molecular formula : $C_{19}H_{20}N_2O_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 422.40 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 308.37 $g \cdot mol^{-1}$

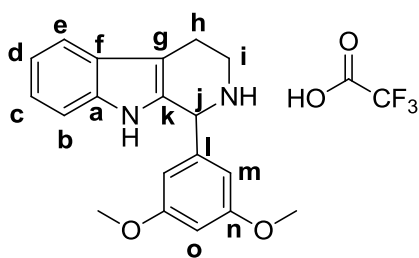
Yellow powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.61-2.65 (m, 1H_h), 2.71-2.75 (m, 1H_h), 2.88-2.94 (m, 1H_i), 3.07-3.12 (m, 1H_i), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 5.01 (s, 1H_j), 6.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_q), 6.87-6.99 (m, 4H_{c-d-m-p}), 7.20 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.37-7.39 (m, 1H_e), 10.32 (s, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.2 (C_h), 55.6 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 55.6 (C_j), 107.1 (C_g), 111.5 (C_{b/m}), 111.7 (C_{b/m}), 113.3 (C_p), 118.1 (C_e), 119.0 (C_d), 121.9 (C_c), 122.4 (C_q), 125.6 (C_f), 126.6 (C_l), 128.6 (C_k), 136.5 (C_a), 148.8 (C_{n/o}), 149.9 (C_{n/o})

HPLC : $t_R = 9.4$ min. **MS** : m/z 309 ($[M+H]^+$)

1-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (269)



Yield : 49%
 Molecular formula : $C_{19}H_{20}N_2O_2 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 422.40 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 308.37 $g \cdot mol^{-1}$

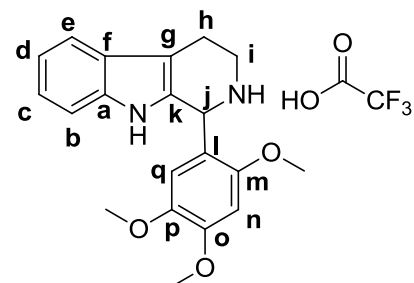
Ochre powder

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.62-2.77 (m, 2H_h), 2.90-2.96 (m, 1H_i), 3.09-3.14 (m, 1H_i), 3.71 (s, 6H, OCH₃), 5.02 (s, 1H_j), 6.43 (s, 1H_o), 6.49 (s, 2H_m), 6.91-6.99 (m, 2H_{c-d}), 7.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.40 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_e), 10.35 (s, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 22.5 (C_h), 42.0 (C_i), 55.3 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 57.3 (C_j), 99.4 (C_o), 107.0 (C_m), 108.4 (C_g), 111.5 (C_b), 118.0 (C_e), 118.6 (C_d), 121.0 (C_c), 127.3 (C_f), 135.5 (C_{a/k}), 136.4 (C_{a/k}), 145.6 (C_l), 160.8 (C_n)

HPLC : $t_R = 11.4$ min. **MS** : m/z 309 ($[M+H]^+$)

1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole, TFA salt (270)



Yield : 30%
 Molecular formula : $C_{20}H_{22}N_2O_3 \cdot TFA$
 MW (TFA salt) 452.42 $g \cdot mol^{-1}$
 MW (free amine) 338.40 $g \cdot mol^{-1}$

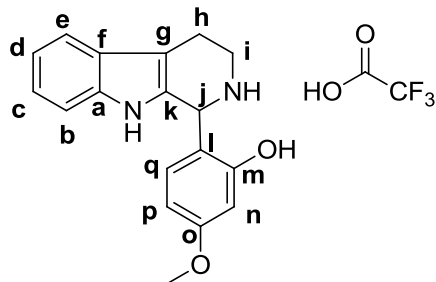
White solid

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.01 (m, 2H_h), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.80-3.84 (m, 8H, 2H_i + OCH₃), 6.71 (s, 1H_j), 6.96 (m, 1H_{e/d}), 7.05 (m, 1H_{e/d}), 7.14 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H_n), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.40 (s, 1H_q), 7.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_c), 10.77 (s, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 26.9 (C_h), 55.7 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 56.4 (OCH₃), 61.9 (C_j), 97.8 (C_n), 108.9 (C_g), 111.2 (C_b), 112.5 (C_q), 115.7 (C_l), 118.1 (C_e), 118.5 (C_d), 120.7 (C_c), 122.7 (C_f), 127.3 (C_k), 136.6 (C_a), 143.5, 152.6 (C_{m/o/p}), 154.2 (C_{m/o/p}), 155.6 (C_{m/o/p})

HPLC : $t_R = 11.5$ min. **MS** : m/z 339 ($[M+H]^+$)

5-Methoxy-2-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol (271)



Yield : 34%
 Molecular formula : $C_{18}H_{18}N_2O_2$
 MW : 294.35 $g \cdot mol^{-1}$

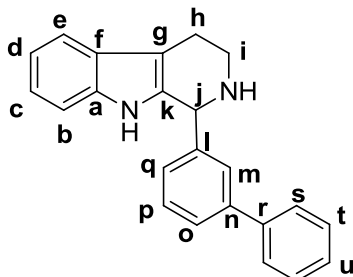
Brown oil

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.13-3.16 (m, 2H_h), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.81-3.87 (m, 2H_i), 6.32 (dd, $J_1 = 2.2$ Hz, $J_2 = 8.6$ Hz, 1H_q), 6.40 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H_j), 6.95-6.99 (m, 2H_{n-p}), 7.14-7.23 (m, 2H_{c-d}), 7.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_b), 7.64 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H_e), 7.89 (s, 1H, OH), 8.48 (bs, 1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ 26.5 (C_h), 54.9 (C_i), 55.2 (OCH₃), 56.2 (C_j), 101.1 (C_n), 105.7 (C_g), 111.2, 111.4, 111.4, 118.3, 118.3, 120.9, 123.0, 127.1, 133.4 (C_k), 136.2 (C_a), 164.5 (C_{m/o}), 167.1 (C_{m/o})

HPLC : $t_R = 11.2$ min. **MS** : m/z 295 ($[M+H]^+$)

1-([1,1'-Biphenyl]-3-yl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (272)



Yield : 83%
 Molecular formula : $C_{23}H_{20}N_2$
 MW : 324.43 $g \cdot mol^{-1}$

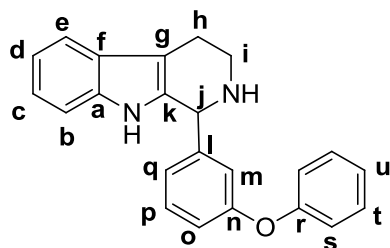
Pink powder

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.87 (bs, 1NH), 2.81-2.85 (m, 1H_h), 2.93-2.99 (m, 1H_h), 3.03-3.09 (m, 1H_i), 3.29-3.34 (m, 1H_i), 5.10 (s, 1H_j), 7.13-7.19 (m, 4H_{c-d-o-q}), 7.33-7.42 (m, 4H), 7.49-7.51 (m, 3H), 7.55-7.60 (m, 2H_{e-m}), 8.59 (1H, NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 22.5 (C_h), 42.8 (C_i), 58.2 (C_j), 110.0 (C_{b/g}), 111.1 (C_{b/g}), 118.2 (C_e), 119.2 (C_d), 121.6 (C_e), 126.8, 126.9, 127.0, 127.1, 127.3, 127.5, 128.9, 129.1, 134.4 (C_k), 136.1 (C_a), 140.6 (C_{l/n/r}), 141.7 (C_{l/n/r}), 142.6 (C_{l/n/r})

HPLC : $t_R = 14.7$ min. **MS** : m/z 325 ($[M+H]^+$)

1-(3-Phenoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (273)



Yield : 48%
 Molecular formula : $C_{23}H_{20}N_2O$
 MW : 340.42 $g \cdot mol^{-1}$

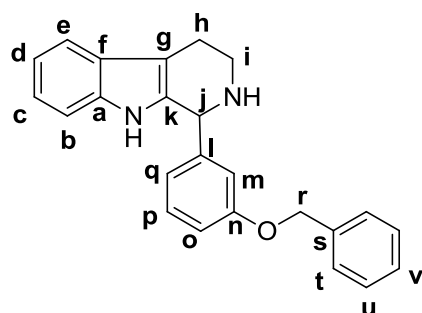
Ochre powder

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.91 (bs, 1NH), 2.81-2.97 (m, 2H_h), 3.06-3.12 (m, 1H_i), 3.33-3.39 (m, 1H_i), 5.07 (s, 1H_j), 6.96-7.04 (m, 5H), 7.12-7.17 (m, 4H), 7.25-7.35 (m, 4H), 7.58-7.60 (m, 1H), 8.04 (s, 1NH)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 22.2 (C_h), 41.2 (C_i), 56.3 (C_j), 108.3 (C_g), 111.0 (C_b), 117.3 (C_{m/o}), 117.6 (C_{m/o}), 118.2 (C_e), 118.4 (C_s), 118.8 (C_d), 120.6 (C_c), 123.3 (C_{q/u}), 123.6 (C_{q/u}), 126.8 (C_t), 129.6 (C_p), 130.0 (C_t), 135.0 (C_k), 135.9 (C_a), 145.5 (C_l), 156.4 (C_{n/r}), 156.6 (C_{n/r})

HPLC : $t_R = 14.7$ min. **MS** : m/z 341 ($[M+H]^+$)

1-(3-(Benzyloxy)phenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (274)



Yield : 32%
Molecular formula : C₂₄H₂₂N₂O
MW : 354.44 g.mol⁻¹

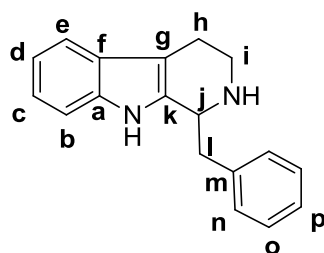
Ochre powder

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.93 (bs, 1NH), 2.82-2.99 (m, 2H_h), 3.05-3.10 (m, 1H_i), 3.28-3.34 (m, 1H_i), 4.96 (s, 2H_r), 5.04 (s, 1H_j), 6.90 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H_{o/q}), 6.95 (s, 1H_m), 6.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H_{o/q}), 7.13-7.44 (m, 8H), 7.61-7.63 (m, 1H_e), 8.35 (s, 1NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 22.5 (C_h), 42.6 (C_i), 58.0 (C_j), 70.0 (C_r), 110.0 (C_{b/g}), 111.1 (C_{b/g}), 114.7, 115.0, 118.2, 119.3, 121.2, 121.7, 127.6 (C_t), 128.0 (C_v), 128.6 (C_u), 129.8 (C_p), 134.3 (C_{a/k/s}), 136.1 (C_{a/k/s}), 136.9 (C_{a/k/s}), 143.6 (C_t), 159.2 (C_n)

HPLC : t_R = 15.1 min. **MS** : *m/z* 355 ([M+H]⁺)

1-Benzyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (275)



Yield : 38%
Molecular formula : C₁₈H₁₈N₂
MW : 262.35 g.mol⁻¹

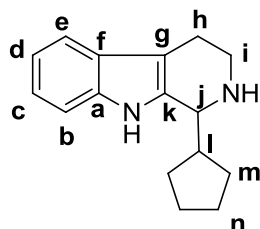
Ochre powder

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.87 (bs, 1H, NH), 2.75-2.85 (m, 2H_h), 3.01-3.10 (m, 3H_{i,l}), 3.35-3.40 (m, 1H_j), 4.40 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H_j), 7.12-7.19 (m, 2H_{c-d}), 7.23 (d, *J*_l = 7.6 Hz, 1H_p), 7.30-7.42 (m, 5H), 7.53 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_e), 7.60 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 22.8 (C_h), 41.9 (C_i), 42.6 (C_j), 54.2 (C_j), 109.5 (C_g), 110.9 (C_b), 118.3 (C_e), 119.2 (C_d), 121.7 (C_c), 127.1 (C_p), 127.4 (C_f), 129.0 (C_n), 129.5 (C_o), 135.7 (C_{a/k}), 135.8 (C_{a/k}), 138.4 (C_m)

HPLC : t_R = 10.6 min. **MS** : *m/z* 263 ([M+H]⁺)

1-Cyclopentyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (276)



Yield : 4%
Molecular formula : C₁₆H₂₀N₂
MW : 240.16 g.mol⁻¹

Beige solid

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.50-1.67 (m, 6H), 1.81-1.93 (m, 2H), 2.89-3.11 (m, 4H), 3.20-3.28 (m, 1H_i), 3.50-3.55 (m, 1H_j), 4.41 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H_j), 6.97 (dd, *J*₁ = 7.2 Hz, *J*₂ = 7.6 Hz, 1H_{c/d}), 7.06 (dd, *J*₁ = 7.2 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H_{c/d}), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H_{b/e}), 7.36 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_{b/e}), 10.20 (bs, 1NH)

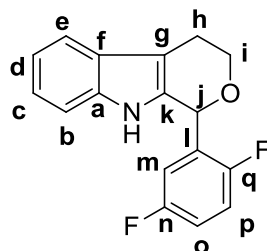
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.6 (C_h), 25.0 (C_n), 25.5 (C_n), 28.9 (C_m), 29.3 (C_m), 41.4 (C_i), 42.6 (C_j), 56.4 (C_j), 106.6 (C_g), 111.7 (C_b), 118.0 (C_e), 119.4 (C_d), 122.1 (C_c), 125.9 (C_f), 129.5 (C_k), 136.8 (C_a)

HPLC : t_R = 9.7 min. **MS** : *m/z* 241 ([M+H]⁺)

General Procedure for the Preparation of compounds 277-284.

To a solution of aldehyde (1.86 mmol) in dry dichloromethane (10 mL) was added a solution of 3-(2-hydroxyethyl)indole (1.24 mmol) in dry dichloromethane (4 mL). This solution was placed under argon. Then a solution of trifluoroacetic acid (0.37 mmol) in dry dichloromethane (1 mL) was slowly added. The resulting mixture was stirred for 20 min at room temperature and further refluxed for 3-4 hours. Solvent evaporation under reduced pressure followed by chromatography (SiO₂, cHex/AcOEt 94/6) afforded title compound.

1-(2,5-Difluorophenyl)-1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-*b*]indole (277)



Yield : 19%
 Molecular formula : C₁₇H₁₃F₂NO
 MW : 285.29 g.mol⁻¹
 White solid

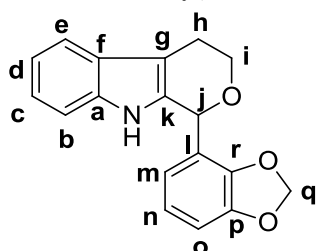
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.80-2.86 (m, 1H_h), 3.05-3.13 (m, 1H_h), 3.98-4.05 (m, 1H_i), 4.34-4.38 (m, 1H_i), 6.20 (s, 1H_j), 6.98-7.03 (m, 1H_m), 7.07-7.13 (m, 4H_{c-d-o-p}), 7.29 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_b), 7.55 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_e), 7.67 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 22.4 (C_h), 65.2 (C_i), 70.1 (d, *J* = 3.1 Hz, C_j), 109.3 (C_g), 111.3 (C_b), 116.0 (dd, *J*₁ = 4.6 Hz, *J*₂ = 25.1 Hz, C_m), 116.5-117.0 (m, C_{o-p}), 118.6 (C_e), 120.0 (C_d), 122.5 (C_c), 127.0 (C_f), 129.2 (dd, *J*₁ = 6.9 Hz, *J*₂ = 16.0 Hz, C_l), 132.1 (C_{a/k}), 136.3 (C_{a/k}), 156.5 (dd, *J*₁ = 2.3 Hz, *J*₂ = 240.0 Hz, C_q), 159.2 (dd, *J*₁ = 2.3 Hz, *J*₂ = 242.4 Hz, C_n)

RMN ¹⁹F (160 MHz, CFCl₃) δ -125.36 (d, *J* = 7.5 Hz), -117.44 (d, *J* = 7.5 Hz)

MS : *m/z* 286 ([M+H]⁺). **HRMS :** calculated 284.0887 found 284.0885 ([M-H]⁻)

1-(Benzo[d][1,3]dioxol-4-yl)-1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-*b*]indole (278)



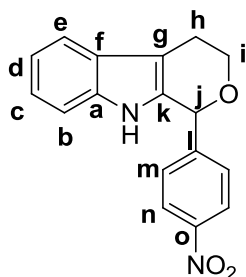
Yield : 20%
 Molecular formula : C₁₈H₁₅NO₃
 MW : 293.32 g.mol⁻¹
 White solid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.80-2.87 (m, 1H_h), 3.03-3.07 (m, 1H_h), 3.99-4.05 (m, 1H_i), 4.34-4.37 (m, 1H_i), 5.99 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H_q), 6.08 (s, 1H_j), 6.09 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H_r), 6.79-6.83 (m, 3H_{m-n-o}), 7.11-7.17 (m, 2H_{c-d}), 7.28 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_b), 7.55 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_e), 7.77 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 22.5 (C_h), 65.1 (C_i), 70.1 (C_j), 101.4 (C_q), 109.0 (C_b), 109.1 (C_g), 111.2 (C_o), 118.5 (C_e), 119.8 (C_d), 121.2 (C_m), 121.6 (C_f), 122.2 (C_{e/n}), 122.2 (C_{e/n}), 127.1 (C_l), 132.9 (C_{a/k}), 136.2 (C_{a/k}), 145.6 (C_{p/r}), 147.8 (C_{p/r})

MS : *m/z* 294 ([M+H]⁺). **HRMS :** calculated 292.0974 found 292.0981 ([M-H]⁻)

1-(4-Nitrophenyl)-1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-*b*]indole (**279**)



Yield : 20%
Molecular formula : $C_{17}H_{14}N_2O_3$
MW : 294.30 $g \cdot mol^{-1}$

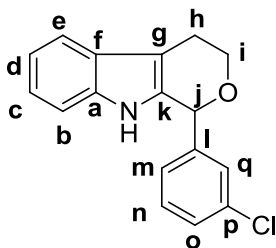
Yellow powder

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.85-2.89 (m, 1H_h), 3.07-3.14 (m, 1H_h), 3.98-4.04 (m, 1H_i), 4.30-4.34 (m, 1H_i), 5.91 (s, 1H_j), 7.13-7.21 (m, 2H_{c-d}), 7.29 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_b), 7.45 (sl, 1H, NH), 7.57-7.59 (m, 3H_{e-l}), 8.23 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H_m)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 22.4 (C_h), 65.1 (C_i), 75.2 (C_j), 109.5 (C_g), 111.3 (C_b), 118.7 (C_e), 120.2 (C_d), 122.7 (C_c), 124.2 (C_n), 127.0 (C_f), 129.3 (C_m), 132.2 (C_a), 136.4 (C_k), 146.9 (C_l), 148.3 (C_o)

MS : m/z 295 ($[M+H]^+$). **HRMS** : calculated 293.0926 found 293.0935 ($[M-H]^-$)

1-(3-Chlorophenyl)-1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-*b*]indole (**280**)



Yield : 23%
Molecular formula : $C_{17}H_{14}ClNO$
MW : 283.75 $g \cdot mol^{-1}$

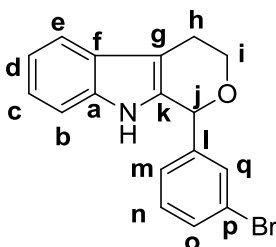
White powder

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.82-2.88 (m, 1H_h), 3.07-3.15 (m, 1H_h), 3.96-4.02 (m, 1H_i), 4.29-4.34 (m, 1H_i), 5.76 (s, 1H_j), 7.14-7.21 (m, 2H_{c-d}), 7.23-7.31 (m, 2H), 7.32-7.39 (m, 3H), 7.52 (bs, 1H, NH), 7.58 (d, $J = 7.2$ Hz, H_o)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 22.4 (C_h), 65.1 (C_i), 75.7 (C_j), 109.2 (C_g), 111.3 (C_d), 118.6 (C_a), 120.0 (C_b), 122.4 (C_c), 126.7, 127.1, 128.7, 129.3, 130.3, 133.0 (C_{a/p}), 135.0 (C_{a/p}), 136.3 (C_k), 141.8 (C_l)

MS : m/z 284 ($[M+H]^+$). **HRMS** : calculated 282.0686 found 282.0693 ($[M-H]^-$)

1-(3-Bromophenyl)-1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-*b*]indole (**281**)



Yield : 19%
Molecular formula : $C_{17}H_{14}BrNO$
MW : 328.20 $g \cdot mol^{-1}$

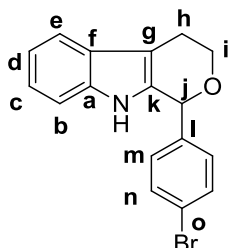
Yellow solid

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.83-2.88 (m, 1H_h), 3.07-3.15 (m, 1H_h), 3.95-4.02 (m, 1H_i), 4.29-4.34 (m, 1H_i), 5.75 (s, 1H_j), 7.15-7.22 (m, 2H_{c-d}), 7.24-7.28 (m, 2H), 7.32 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H_b), 7.50-7.55 (m, 3H), 7.59 (d, $J = 7.2$ Hz, H_o)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 22.4 (C_h), 65.0 (C_i), 75.6 (C_j), 109.2 (C_g), 111.3 (C_d), 118.6 (C_a), 120.0 (C_b), 122.4 (C_c), 123.1 (C_p), 127.1 (C_f), 127.2 (C_m), 130.6 (C_{n/o/q}), 131.5 (C_{n/o/q}), 132.2 (C_{n/o/q}), 132.9 (C_a), 136.3 (C_k), 142.0 (C_l)

MS : m/z 328, 330 ($[M+H]^+$). **HRMS** : calculated 326.0181 found 326.0192 ($[M-H]^-$)

1-(4-Bromophenyl)-1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-*b*]indole (282)



Yield : 22%
Molecular formula : C₁₇H₁₄BrNO
MW : 328.20 g.mol⁻¹

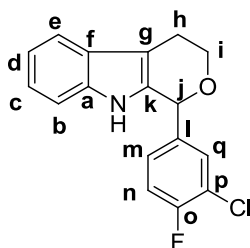
Yellow powder

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.85-2.89 (m, 1H_h), 3.08-3.16 (m, 1H_h), 3.97-4.03 (m, 1H_i), 4.28-4.33 (m, 1H_i), 5.74 (s, 1H_j), 7.17-7.26 (m, 5H_{b-c-d-m}), 7.53 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H_n), 7.55-7.58 (m, 1H), 7.59-7.62 (m, 1H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 22.4 (C_h), 64.9 (C_i), 75.6 (C_j), 109.2 (C_g), 111.2 (C_b), 118.6 (C_e), 120.0 (C_d), 122.3 (C_c), 123.1 (C_o), 127.1 (C_f), 130.3 (C_m), 132.1 (C_n), 133.1 (C_a), 136.3 (C_k), 138.7 (C_l)

MS : *m/z* 328, 330 ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 326.0181 found 326.0188 ([M-H]⁻)

1-(3-Chloro-4-fluorophenyl)-1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-*b*]indole (283)



Yield : 16%
Molecular formula : C₁₇H₁₃FCINO
MW : 301.74 g.mol⁻¹

Yellow solid

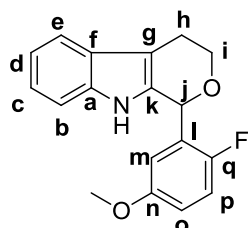
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.84-2.89 (m, 1H_h), 3.07-3.15 (m, 1H_h), 3.96-4.02 (m, 1H_i), 4.27-4.32 (m, 1H_i), 5.75 (s, 1H_j), 7.13-7.23 (m, 3H_{c-d-n}), 7.24-7.28 (m, 2H_{b-m}), 7.44 (dd, *J*₁ = 2.0 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, 1H_q), 7.57 (bs, 1H, NH), 7.60 (d, *J* = 7.6 Hz, H_e)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 22.4 (C_h), 65.0 (C_i), 75.1 (C_j), 109.5 (C_g), 111.3 (C_b), 117.1 (d, *J* = 21.1 Hz, C_n), 118.7 (C_e), 120.1 (C_d), 121.7 (d, *J* = 17.8 Hz, C_p), 122.5 (C_c), 127.1 (C_f), 128.4 (d, *J* = 7.6 Hz, C_m), 130.9 (C_q), 132.8 (C_a), 136.4 (C_k), 137.0 (d, *J* = 3.6 Hz, C_l), 158.5 (d, *J* = 249.1 Hz, C_o)

RMN ¹⁹F (160 MHz, CFCl₃) δ - 114.8

MS : *m/z* 302 ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 300.0591 found 300.0597 ([M-H]⁻)

1-(2-Fluoro-5-methoxyphenyl)-1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-*b*]indole (284)



Yield : 19%
Molecular formula : C₁₈H₁₆FNO₂
MW : 297.32 g.mol⁻¹

Yellow solid

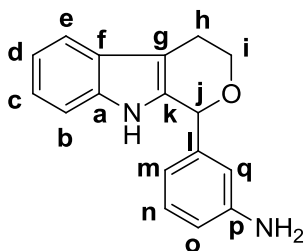
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.83-2.87 (m, 1H_h), 3.10-3.18 (m, 1H_h), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 4.01-4.07 (m, 1H_i), 4.39-4.43 (m, 1H_i), 6.22 (s, 1H_j), 6.83-6.87 (m, 1H_{o/p}), 6.91-6.93 (m, 1H_{o/p}), 7.07-7.12 (m, 1H_{c/d/m}), 7.14-7.21 (m, 2H_{c/d/m}), 7.25-7.28 (m, 1H_b), 7.57-7.59 (m, 1H_e), 7.81 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 22.4 (C_h), 56.0 (OCH₃), 65.4 (C_i), 69.2 (d, *J* = 3.2 Hz, C_j), 109.0 (C_g), 111.3 (C_b), 113.6 (d, *J* = 3.7 Hz, C_m), 115.6 (d, *J* = 8.0 Hz, C_o), 116.3 (d, *J* = 23.7 Hz, C_p), 118.5 (C_e), 119.9 (C_d), 122.2 (C_c), 127.1 (C_f), 127.8 (d, *J* = 15.0 Hz, C_l), 132.9 (C_a), 136.2 (C_k), 155.4 (d, *J* = 236.7 Hz, C_q), 156.3 (d, *J* = 1.9 Hz, C_n)

RMN ¹⁹F (160 MHz, CFCl₃) δ - 130.2

MS : *m/z* 298 ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 296.1087 found 296.1082 ([M-H]⁻)

3-(1,3,4,9-Tetrahydropyrano[3,4-*b*]indol-1-yl)aniline (286)



Yield : 87%
Molecular formula : C₁₇H₁₆N₂O
MW : 264.32 g.mol⁻¹

Orange solid

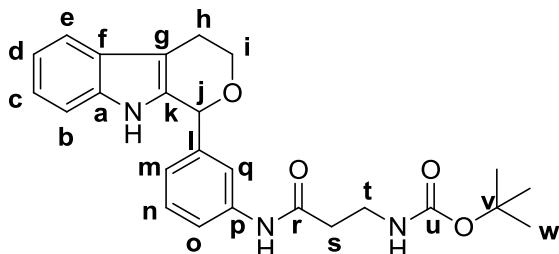
Compound **191** (1.70 mmol) is dissolved in methanol (80 mL) and 10% w/w Pd/C (0.17 mmol) is then added under hydrogen atmosphere. After stirring for 2 hours at room temperature, the mixture is filtered on a Celite pad and the filtrate concentrated *in vacuo* to afford title compound.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.78-2.82 (m, 1H_h), 3.02-3.06 (m, 1H_h), 3.89-3.93 (m, 1H_i), 3.95 (bs, 2H, NH₂), 4.26-4.28 (m, 1H_i), 5.60 (s, 1H_j), 6.61 (s, 1H_q), 6.70 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H_m), 6.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_o), 7.02-7.10 (m, 4H_{b-c-d-n}), 7.55-7.57 (m, 1H_a), 7.93 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 22.5 (C_h), 65.2 (C_i), 76.4 (C_j), 108.7 (C_g), 111.2 (C_b), 115.1 (C_{o/q}), 116.1 (C_{o/q}), 118.5 (C_e), 119.1 (C_m), 119.8 (C_d), 122.1 (C_e), 127.2 (C_f), 130.0 (C_m), 134.0 (C_a), 136.2 (C_k), 140.9 (C_l), 146.6 (C_p)

MS : *m/z* 265 ([M+H]⁺). **HRMS** : calculated 263.1184 found 263.1188 ([M-H]⁻)

Tert-butyl (3-oxo-3-((3-(1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-*b*]indol-1-yl)phenyl)amino)propyl)carbamate (287)



Yield : 92%
Molecular formula : C₂₅H₂₉N₃O₄
MW : 435.52 g.mol⁻¹

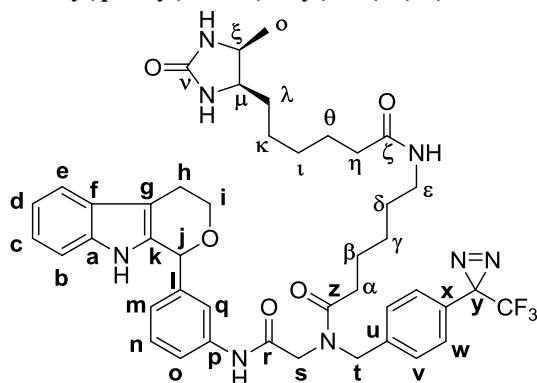
White solid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.40 (s, 9H_w), 2.48-2.53 (m, 2H_s), 2.79-2.83 (m, 1H_h), 3.02-3.08 (m, 1H_h), 3.42-3.44 (m, 2H_t), 3.94-3.97 (m, 1H_i), 4.29-4.32 (m, 1H_i), 5.14 (bs, 1H, NH), 5.74 (s, 1H_j), 7.09-7.16 (m, 3H_{c-d-m}), 7.22 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H_b), 7.32 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H_n), 7.42 (bs, 1H, NH), 7.53 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H_o), 7.62 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H_e), 7.71 (s, 1H_q), 7.86 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 22.5 (C_h), 28.6 (C_w), 28.6 (C_s), 37.9 (C_t), 65.2 (C_i), 76.1 (C_v), 77.4 (C_j), 108.8 (C_g), 111.3 (C_b), 118.6, 119.8, 119.9, 120.7, 122.2, 124.4 (C_m), 127.2 (C_f), 129.8 (C_n), 133.6 (C_l), 136.3 (C_{a/k}), 138.4 (C_{a/k}), 140.8 (C_p), 156.5 (C_u)

MS : *m/z* 458 ([M+Na]⁺). **HRMS** : calculated 434.2080 found 434.2087 ([M-H]⁻)

6-(6-((4R,5S)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexanamido)-N-(2-oxo-2-((3-(1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)amino)ethyl)-N-(4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzyl)hexanamide (288)



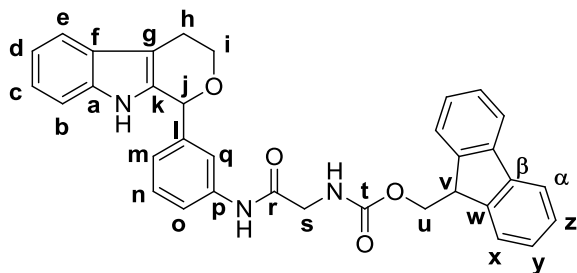
Yield : 44%
Molecular formula : C₄₄H₅₁F₃N₈O₅
MW : 828.92 g.mol⁻¹

White solid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (mix of diastereomers) 1.03-1.42 (m, 17H), 1.95-2.03 (m, 2H), 2.29-2.32 (m, 2H _{η}), 2.78-2.82 (m, 1H _{h}), 3.00-3.07 (m, 1H _{h}), 3.13-3.16 (m, 2H _{i}), 3.55-3.57 (m, 1H), 3.70-3.73 (m, 1H), 3.92-3.99 (m, 2H), 4.05-4.11 (m, 1H), 4.24-4.27 (m, 1H), 4.58-4.69 (m, 3H), 5.29-5.30 (m, 1H _{j}), 5.61-5.74 (m, 2H), 7.07-7.12 (m, 3H), 7.15-7.23 (m, 4H), 7.27-7.30 (m, 1H), 7.35-7.42 (m, 1H), 7.50-7.52 (m, 1H), 7.55-7.65 (m, 1H), 8.45-8.47 (m, 1H, NH), 9.11-9.25 (m, 1H, NH)

MS : *m/z* 827 ([M-H]). **HRMS** : calculated 827.3856 found 827.3873 ([M-H])

(9H-Fluoren-9-yl)methyl (2-oxo-2-((3-(1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)amino)ethyl) carbamate (289)



Yield : 67%
Molecular formula : C₃₄H₂₉N₃O₄
MW : 543.61 g.mol⁻¹

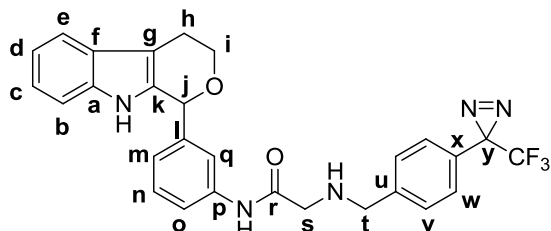
White solid

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.70-2.80 (m, 1H _{h}), 2.96-3.04 (m, 1H _{h}), 3.81 (s, 2H _{s}), 3.88-3.93 (m, 1H _{i}), 4.15 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H _{v}), 4.23-4.26 (m, 1H _{i}), 4.37 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H _{u}), 5.54 (bs, 1H, NH), 5.67 (s, 1H _{j}), 7.09-7.13 (m, 3H), 7.18-7.20 (m, 2H), 7.26-7.29 (m, 2H), 7.35-7.38 (m, 2H), 7.51-7.52 (m, 3H), 7.56-7.58 (m, 1H), 7.73 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H _{a}), 7.89 (bs, 1H, NH), 8.14 (bs, 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 24.3 (C _{h}), 42.7 (C _{s/v}), 43.7 (C _{s/v}), 61.2 (C _{u}), 67.4 (C _{i}), 77.9 (C _{j}), 110.4 (C _{g}), 115.2 (C _{h}), 120.2, 120.3, 122.6, 124.3, 125.2, 125.3, 127.3 (C _{x/y}), 127.3 (C _{x/y}), 127.6, 127.9 (C _{z/a}), 128.0 (C _{z/a}), 128.5, 129.2, 137.5, 141.5, 141.5, 143.8 (C _{w/β}), 144.0 (C _{w/β}), 156.6 (C _{t}), 172.0 (C _{r})

MS : *m/z* 544 ([M+H]⁺)

N-(3-(1,3,4,9-Tetrahydropyrano[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)-2-((4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzyl) amino)acetamide (290)



Yield : 35%
Molecular formula : C₂₈H₂₄F₃N₅O₂
MW : 519.52 g.mol⁻¹

Yellow powder

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.65-1.69 (m, 1H, NH), 2.80-2.84 (m, 1H _{h}), 3.07-3.14 (m, 1H _{h}), 3.32 (s, 2H _{i}), 3.81 (s, 2H _{s}), 3.96-4.02 (m, 1H _{i}), 4.32-4.37 (m, 1H _{i}), 5.77 (s, 1H _{j}), 7.11-7.17 (m, 5H _{$m-v-w$}), 7.23-7.24 (m, 1H _{n}), 7.31-7.36 (m, 3H _{$b-c-d$}), 7.41 (bs, 1H, NH), 7.54-7.57 (m, 1H _{o}), 7.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H _{e}), 7.76 (s, 1H _{q}), 9.08 (s, 1H, NH)

MS : *m/z* 520 ([M+H]⁺)

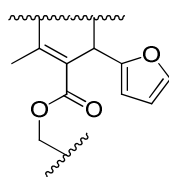
Annexes

<u>Annexe I</u> : Calcul des PSA.....	A-I
<u>Annexe II</u> : Diffraction aux rayons X de (S)- ITB₂	A-II
<u>Annexe III</u> : Résultats du criblage des chimiothèques sur le pharmacophore.....	A-IV
<u>Annexe IV</u> : Structures et activités des analogues d' ITB₂	A-VII
<u>Annexe V</u> : Structures et activités des analogues d' ITB₂	A-IX

Annexe I : Calcul des PSA

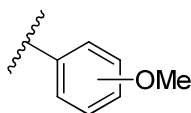
Les contributions des différents fragments moléculaires à la PSA sont indiquées en utilisant les valeurs et la nomenclature de Ertl & al. (Ertl P, Rohde B, Selzer P, *J. Med. Chem* **2000**, *43*, 3714-3717)

Fragment 1 :



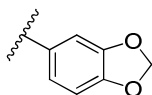
$$[o] : * : * (13.14) + [O]=* (17.07) + [O]-*-* (9.23) \rightarrow 39.44 \text{ \AA}^2$$

Fragment 2 :



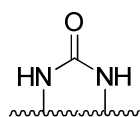
$$[O]-*-* (9.23) \rightarrow 9.23 \text{ \AA}^2$$

Fragment 3 :



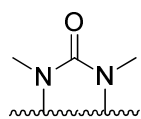
$$[O]-*-* (9.23) + [O]-*-* (9.23) \rightarrow 18.46 \text{ \AA}^2$$

Fragment 4 :



$$[NH]-*-* (12.03) + [NH]-*-* (12.03) + [O]=* (17.07) \rightarrow 41.13 \text{ \AA}^2$$

Fragment 5 :



$$[N]-*-*-* (3.24) + [N]-*-*-* (3.24) + [O]=* (17.07) \rightarrow 23.55 \text{ \AA}^2$$

Calcul des PSA des composés :

$$\text{PSA [127]} = \text{PSA [1+2+4]} = 89.8 \text{ \AA}^2$$

$$\text{PSA [49]} = \text{PSA [1+2+4]} = 89.8 \text{ \AA}^2$$

$$\text{PSA [128]} = \text{PSA [1+3+4]} = 99.03 \text{ \AA}^2$$

$$\text{PSA [134]} = \text{PSA [1+2+5]} = 72.22 \text{ \AA}^2$$

$$\text{PSA [135]} = \text{PSA [1+2+5]} = 72.22 \text{ \AA}^2$$

$$\text{PSA [136]} = \text{PSA [1+3+5]} = 81.45 \text{ \AA}^2$$

Annexe II : Diffraction aux rayons X de (S)-ITB₂

- Distances interatomiques (en \AA) :

O1 N3	1.226	C4 C5	1.503	C16 C17	1.388
O2 N3	1.226	C4 H4A	0.970	C16 H16	0.930
O3 C19	1.422	C4 H4B	0.970	C17 C18	1.389
O3 H3	0.9216	C5 C6	1.364	C17 H17	0.930
O4 C20	1.257	C5 C8	1.432	C18 H18	0.930
O5 C20	1.242	C7 C12	1.394	C19 C21	1.520
N1 C7	1.374	C7 C8	1.424	C19 C20	1.545
N1 C6	1.379	C8 C9	1.403	C19 H19	0.980
N1 H1	0.894	C9 C10	1.386	C21 C22	1.389
N2 C3	1.499	C9 H9	0.930	C21 C26	1.394
N2 C1	1.510	C10 C11	1.406	C22 C23	1.397
N2 H2A	0.882	C10 H10	0.930	C22 H22	0.930
N2 H2B	0.925	C11 C12	1.382	C23 C24	1.386
N3 C15	1.473	C11 H11	0.930	C23 H23	0.930
C1 C6	1.493	C12 H12	0.930	C24 C25	1.385
C1 C13	1.518	C13 C14	1.386	C24 H24	0.930
C1 H1A	0.980	C13 C18	1.399	C25 C26	1.389
C3 C4	1.531	C14 C15	0.389	C25 H25	0.930
C3 H3A	0.970	C14 H14	0.930	C26 H26	0.930
C3 H3B	0.970	C15 C16	1.378		

Annexes

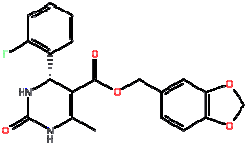
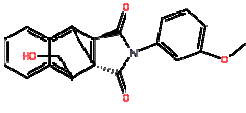
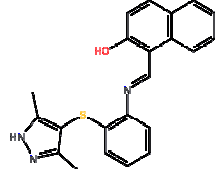
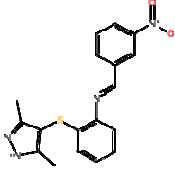
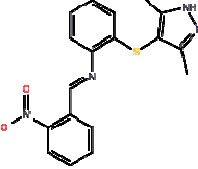
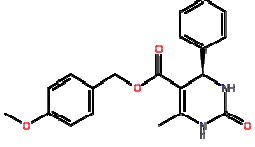
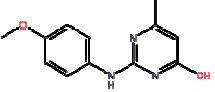
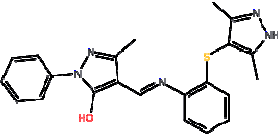
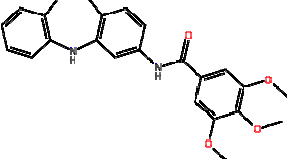
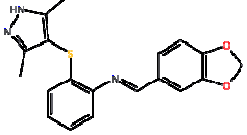
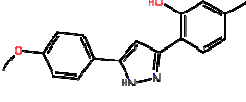
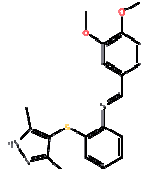
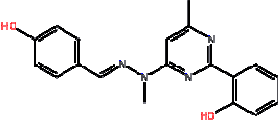
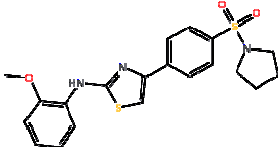
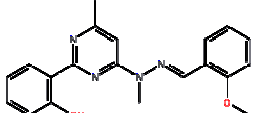
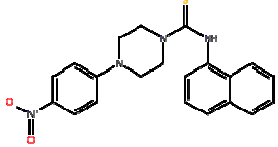
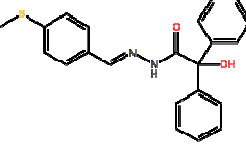
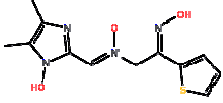
- *Angles dièdres (en °) :*

C19 O3 H3	106.7	N1 C7 C12	129.5	O3 C19 C20	108.7
C7 N1 C6	107.9	N1 C7 C8	108.3	C21 C19 C20	113.7
C7 N1 H1	126.8	C12 C7 C8	122.1	O3 C19 H19	107.5
C6 N1 H1	125.2	C9 C8 C7	118.4	C21 C19 H19	107.5
C3 N2 C1	112.7	C9 C8 C5	135.4	C20 C19 H19	107.5
C3 N2 H2A	106.5	C7 C8 C5	106.2	O5 C20 O4	126.8
C1 N2 H2A	110.7	C10 C9 C8	119.6	O5 C20 C19	118.2
C3 N2 H2B	113.9	C10 C9 H9	120.2	O4 C20 C19	115.0
C1 N2 H2B	105.7	C8 C9 H9	120.2	C22 C21 C26	118.9
H2A N2 H2B	107.3	C9 C10 C11	120.7	C22 C21 C19	120.8
O1 N3 O2	123.4	C9 C10 H10	119.7	C26 C21 C19	120.3
O1 N3 C15	118.1	C11 C10 H10	119.7	C21 C22 C23	120.3
O2 N3 C15	118.4	C12 C11 C10	121.3	C21 C22 H22	119.9
C6 C1 N2	106.2	C12 C11 H11	119.3	C23 C22 H22	119.9
C6 C1 C13	112.7	C10 C11 H11	119.3	C24 C23 C22	120.3
N2 C1 C13	111.0	C11 C12 C7	117.8	C24 C23 H23	119.8
C6 C1 H1A	108.9	C11 C12 H12	121.1	C22 C23 H23	119.8
N2 C1 H1A	108.9	C7 C12 H12	121.1	C25 C24 C23	119.5
C13 C1 H1A	108.9	C14 C13 C18	119.5	C25 C24 H24	120.3
N2 C3 C4	110.8	C14 C13 C1	120.2	C23 C24 H24	120.3
N2 C3 H3A	109.5	C18 C13 C1	120.2	C24 C25 C26	120.3
C4 C3 H3A	109.5	C13 C14 C15	118.3	C24 C25 H25	119.9
N2 C3 H3B	109.5	C13 C14 H14	120.8	C26 C25 H25	119.9
C4 C3 H3B	109.5	C15 C14 H14	120.8	C25 C26 C21	120.6
H3A C3 H3B	108.1	C16 C15 C14	123.0	C25 C26 H26	119.7
C5 C4 C3	110.4	C16 C15 N3	118.2	C21 C26 H26	119.7
C5 C4 H4A	109.6	C14 C15 N3	118.7		
C3 C4 H4A	109.6	C15 C16 C17	118.4		
C5 C4 H4B	109.6	C15 C16 H16	120.8		
C3 C4 H4B	109.6	C17 C16 H16	120.8		
H4A C4 H4B	108.1	C16 C17 C18	119.8		
C6 C5 C8	106.8	C16 C17 H17	120.1		
C6 C5 C4	122.4	C18 C17 H17	120.1		
C8 C5 C4	130.8	C17 C18 C13	120.9		
C5 C6 N1	110.7	C17 C18 H18	119.5		
C5 C6 C1	126.0	C13 C18 H18	119.5		
N1 C6 C1	123.2	O3 C19 C21	111.6		

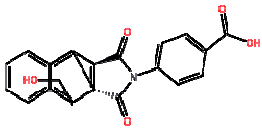
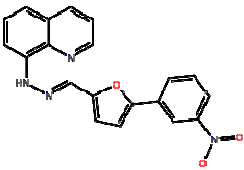
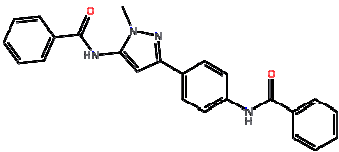
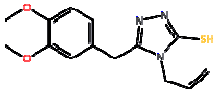
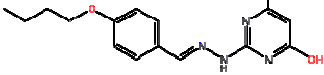
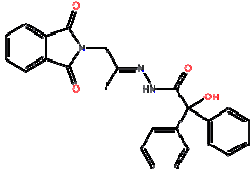
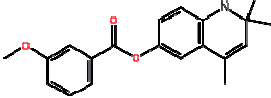
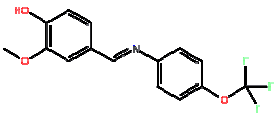
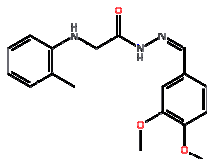
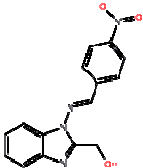
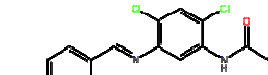
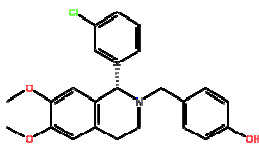
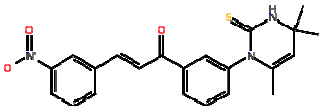
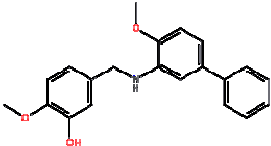
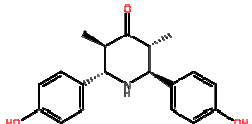
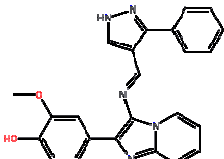
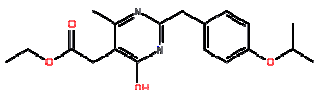
Annexe III : Résultats du criblage des chimiothèques sur le pharmacophore

Molécules sélectionnées avec un score supérieur à 0,10. En vert sont indiquées les structures représentatives qui ont été retenues pour le criblage expérimental. Les dihydropyrimidinones ont été éliminées et les structures proches regroupées ; certains scores faibles ont été écartés.

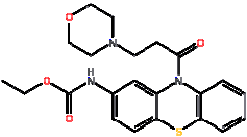
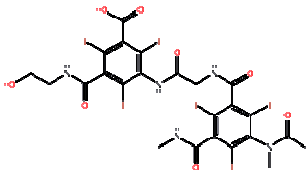
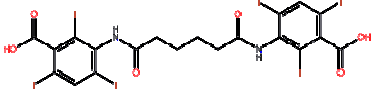
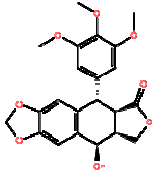
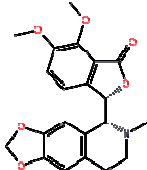
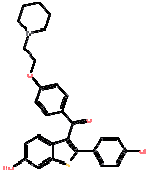
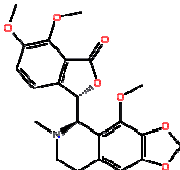
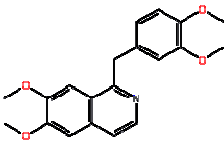
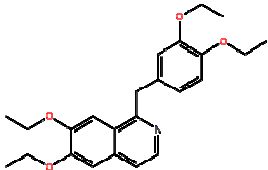
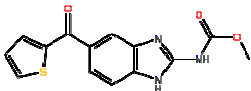
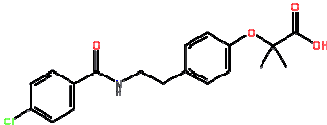
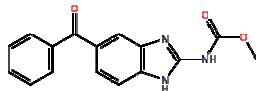
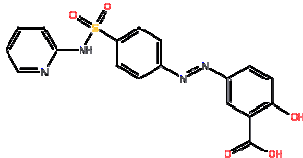
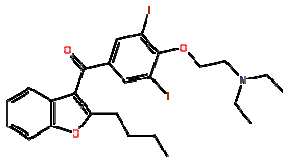
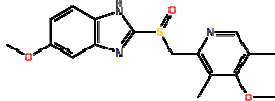
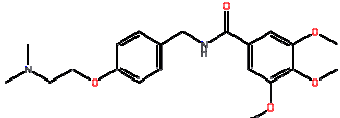
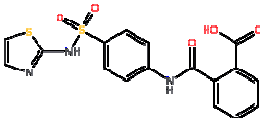
Chimiothèque ChemBridge (les dihydropyrimidines sont indiquées en rouge):

 title: 5614292 FitValue: 2.903	 title: 5652693 FitValue: 2.653	 title: 5483468 FitValue: 2.084
 title: 5486923 FitValue: 2.053	 title: 5485034 FitValue: 1.927	 title: 5603529 FitValue: 1.844
 title: 5340566 FitValue: 1.825	 title: 5488026 FitValue: 1.716	 title: 5304883 FitValue: 1.505
 title: 5486906 FitValue: 1.452	 title: 5480860 FitValue: 1.31	 title: 5482495 FitValue: 1.262
 title: 5256625 FitValue: 1.129	 title: 5303845 FitValue: 0.922	 title: 5256629 FitValue: 0.905
 title: 5221329 FitValue: 0.866	 title: 5529739 FitValue: 0.792	 title: 5548174 FitValue: 0.767

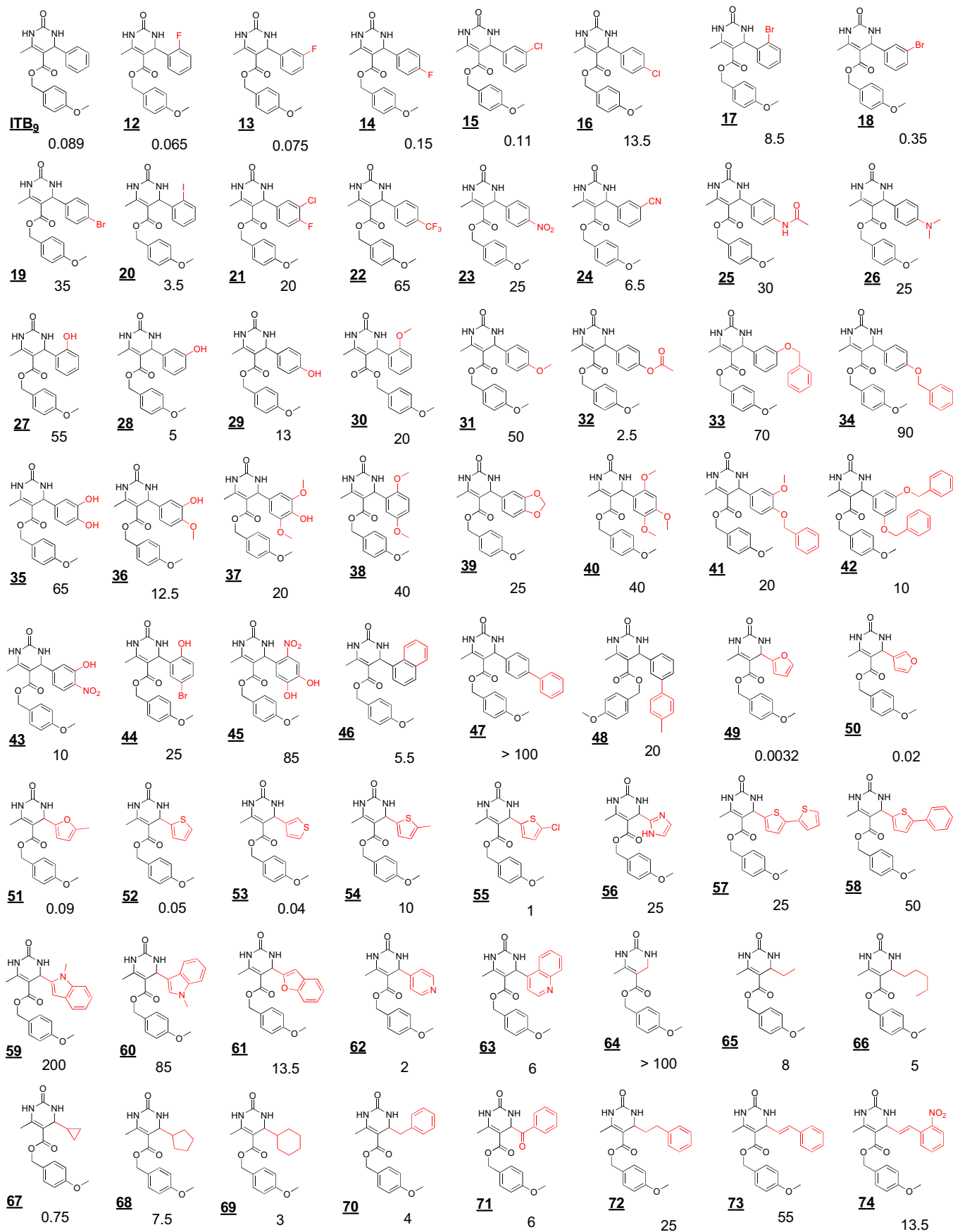
Annexes

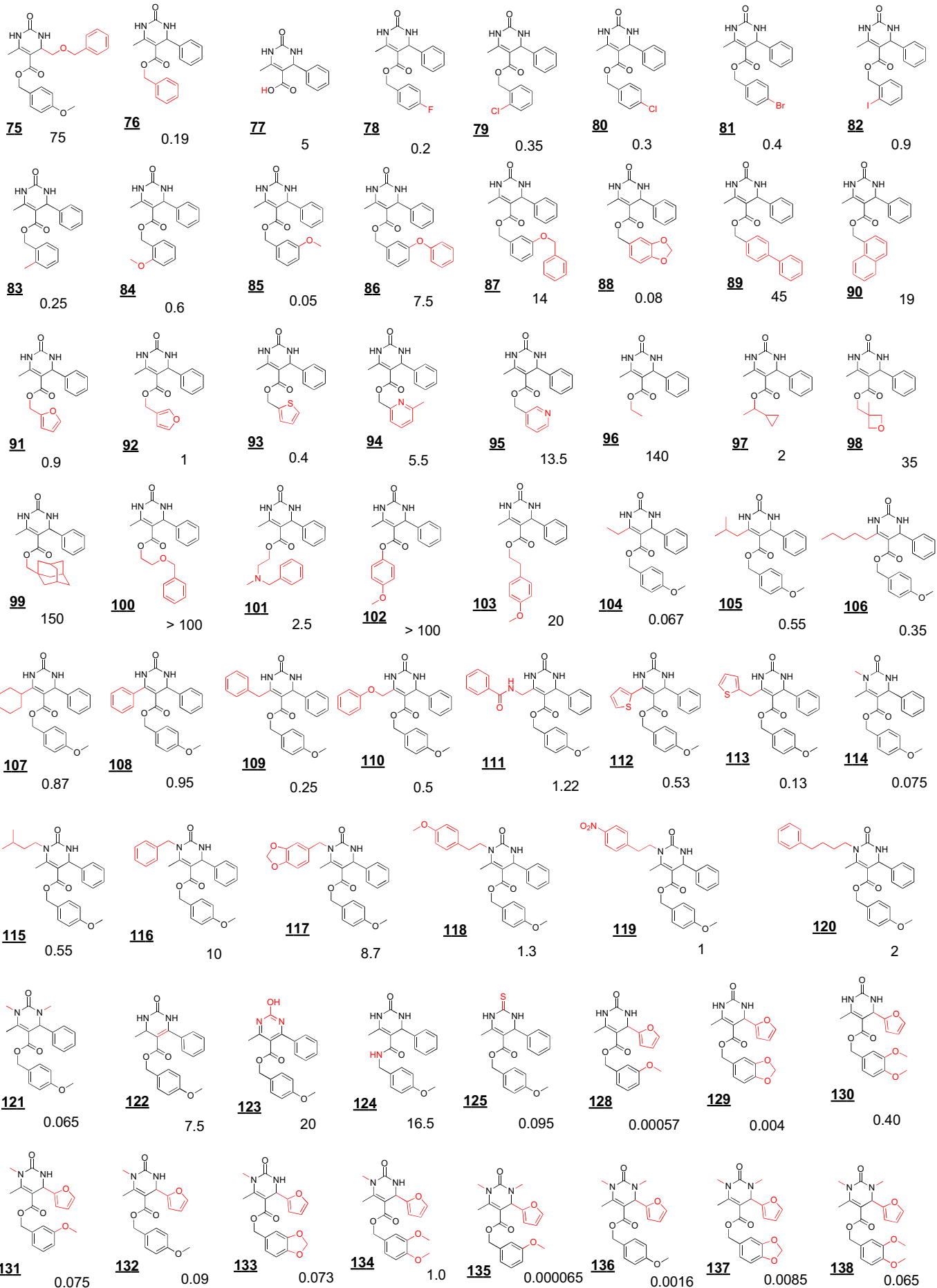
 <p>title: 5656453 FitValue: 0.694</p>	 <p>title: 5621250 FitValue: 0.691</p>	 <p>title: 5257007 FitValue: 0.614</p>
 <p>title: 5647448 FitValue: 0.604</p>	 <p>title: 5340585 FitValue: 0.57</p>	 <p>title: 5361551 FitValue: 0.499</p>
 <p>title: 5310024 FitValue: 0.48</p>	 <p>title: 5375309 FitValue: 0.421</p>	 <p>title: 5561443 FitValue: 0.382</p>
 <p>title: 5565891 FitValue: 0.311</p>	 <p>title: 5285014 FitValue: 0.302</p>	 <p>title: 5641691 FitValue: 0.226</p>
 <p>title: 5572643 FitValue: 0.214</p>	 <p>title: 5464479 FitValue: 0.214</p>	 <p>title: 5342882 FitValue: 0.194</p>
 <p>title: 5653661 FitValue: 0.121</p>	 <p>title: 5647473 FitValue: 0.105</p>	

Chimiothèque Prestwick :

		
title: 14B02 FitValue: 2.065	title: 14C03 FitValue: 1.898	title: 12F10 FitValue: 1.897
		
title: 10G03 FitValue: 1.806	title: 08C02 FitValue: 1.693	title: 11G03 FitValue: 1.223
		
title: 08A04 FitValue: 1.186	title: 08C04 FitValue: 1.162	title: 11C11 FitValue: 1.058
		
title: 02B11 FitValue: 0.918	title: 05F09 FitValue: 0.851	title: 03F08 FitValue: 0.695
		
title: 07D11 FitValue: 0.504	title: 06A10 FitValue: 0.459	title: 07B04 FitValue: 0.357
		
title: 01H11 FitValue: 0.179	title: 11G10 FitValue: 0.125	

Annexe IV : Structures et activités des analogues d'ITB₉ (123 composés, 12 à 138)





Annexe V : Structures et activités des analogues d'ITB₂ (109 composés, 162 à 286)

