



HAL
open science

Développement de nouveaux ligands sélectifs des récepteurs CB2 et de nouveaux inhibiteurs de la FAAH dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Aurélien Tourteau

► **To cite this version:**

Aurélien Tourteau. Développement de nouveaux ligands sélectifs des récepteurs CB2 et de nouveaux inhibiteurs de la FAAH dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S019 . tel-00992024

HAL Id: tel-00992024

<https://theses.hal.science/tel-00992024>

Submitted on 16 May 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 DE LILLE 2 – DROIT ET SANTE
INSTITUT DE CHIMIE PHARMACEUTIQUE ALBERT LESPAGNOL

THESE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Spécialité : *Sciences du médicament*

Présentée et soutenue publiquement le 27 septembre 2013

par

Aurélien TOURTEAU

Développement de nouveaux ligands sélectifs des récepteurs CB₂ et de nouveaux inhibiteurs de la fatty acid amide hydrolase dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Membres du jury

Directeurs de thèse :	Pr Régis MILLET	Professeur, Université de Lille 2
	Pr Benoît RIGO	Professeur, Université Catholique de Lille, HEI
Rapporteurs :	Pr Marc LE BORGNE	Professeur, Université de Lyon 1
	Dr Jean-François BRIERE	Chargé de Recherche CNRS, Université et INSA de Rouen
Examineurs :	Pr Philippe CHAVATTE	Professeur, Université de Lille 2
	Dr John SPENCER	Reader, University of Sussex

« Les cons, ça ose tout ! C'est même à ça qu'on les reconnaît »

Michel Audiard

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol, au sein de l'équipe d'accueil 4481, sous la co-direction du Professeur Régis Millet et du Professeur Benoît Rigo. Ce projet a été financé par l'Université de Lille 2 et la Région Nord Pas-de-Calais.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements :

- A mes directeurs de thèse : Monsieur le Professeur Régis Millet et Monsieur le Professeur Benoît Rigo. Je vous remercie de m'avoir fait confiance, de m'avoir accompagné ainsi que de m'avoir permis d'effectuer mes mandats aux différents conseils de l'Université. Ces 3 années ont été une expérience formidable grâce à vous et je suis pleinement conscient de la chance de vous avoir eu comme directeurs de thèse. En espérant continuer à travailler ensemble. Merci.

- A mes rapporteurs : Monsieur le Docteur Jean-François Brière et Monsieur le Professeur Marc Le Borgne. Je suis très sensible à l'intérêt que vous avez porté à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Soyez assurés de toute ma gratitude.

- A mes examinateurs :

Monsieur le Professeur John Spencer, Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté de siéger à mon jury de thèse. Qu'il me soit permis de vous remercier pour l'intérêt que vous portez à ce travail.

Monsieur le Professeur Philippe Chavatte, je vous remercie tout d'abord de m'avoir accueilli au sein de l'ICPAL. Je tiens également à vous remercier pour tous les conseils et les discussions variées que nous avons pu avoir ainsi que pour le temps pris à tous mes déboires administratifs. Un grand merci pour ces trois années, en espérant rester en contact.

Aux personnes ayant contribué au bon déroulement de cette thèse :

Madame le Professeur Patricia Melnyk et Monsieur le Professeur Jean-Paul Bonte, je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe de recherche.

Monsieur le Professeur Pierre Desreumaux, Je vous remercie d'avoir accepté de collaborer sur ce projet. Grâce à vous, des résultats prometteurs sont venus étoffer ce travail.

Monsieur le Docteur Christophe Furman, merci beaucoup de m'avoir accueilli à la plateforme de binding, de m'avoir formé aux risques radioactifs et de l'aide apportée à la mise en place des tests biologiques.

Madame le Docteur Natascha Leleu-Chavain, je ne pense pas que ces quelques lignes pourront traduire toute ma reconnaissance. En tout cas, je ne serais jamais arrivé là où je suis sans toi. Les publis ou la thèse, tu as toujours été prête à m'aider. Je te souhaite le meilleur pour toi et ta famille.

Madame le Docteur Mathilde Body-Malapel et Monsieur Madjid Djouina, je vous remercie d'avoir réalisé les évaluations pharmacologiques *in vivo* présentées dans ce mémoire. Mathilde, tu as toujours été très disponible pour toutes mes questions ainsi que pour la publi, merci beaucoup.

Madame le Docteur Roxane Mansouri, je te remercie de m'avoir formé aux tests de binding et de fonctionnalité. Je ne regrette pas du tout de m'être détourné (un temps) de la chimie pour le couloir sombre de la biochimie. A bientôt et encore merci.

Monsieur le Docteur Nicolas Renault, un grand merci pour tout le temps que tu as pris pour m'expliquer la modélisation. Merci d'avoir toujours été disponible. Je te souhaite le meilleur.

Madame le Docteur Virginie Lucas-Andrzejak, un grand merci à toi Ginie, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir remotivé au début de ma thèse. Cela a été un honneur pour moi d'être au labo 1 et j'espère avoir été à la hauteur. A très vite Docteur Lucas.

Madame Amélie Barczyk, je tiens à te remercier d'avoir effectué une bonne partie des évaluations pharmacologiques *in vitro* présentées dans cette thèse. Je t'adresse un grand merci également pour ces 3 années de fou rire, de belote et de concours culinaire.

Monsieur le Docteur Xavier Dezitter, je te remercie pour ta disponibilité et ta sympathie, un homme de plus n'a pas été de trop à l'étage (surtout pour la belote). J'espère que nous garderons contact. A très bientôt.

Madame Perrine Six, merci pour ta bonne humeur et ton aide dans les analyses LCMS. Merci également pour toutes les parties de belote et les bons moments passés à l'ICP. A très vite.

Madame Frédérique Klupsh, je te remercie pour le temps passé aux analyses LCMS. Merci aussi d'avoir répondu à toutes mes questions de chimie. Merci pour ta gentillesse et ces trois années. Je t'encourage une dernière fois à t'inscrire en thèse, tu es la meilleure de nous tous.

Monsieur le futur Docteur *es vino* Davy Baudalet, je te remercie pour tes conseils, ta bonne humeur et ton amitié. Tu es une belle personne mon petit Davy, je suis sûr que tu iras très loin, le doctorat n'est qu'une formalité. A très vite l'ami.

Monsieur Lucas Lemaire, je ne peux que te remercier pour tout. Je n'aurais pas pu rêver meilleur collègue de labo. Il n'y a rien de plus motivant que de venir travailler en sachant qu'une bonne ambiance et l'amitié sont au rendez-vous. Je te souhaite le meilleur et je te dis à très vite pour boire un coup.

Madame Séverine Ravez, merci à toi (et à Chris aussi) pour ton amitié et ton soutien pendant ces trois années. Je me souviendrais de tes mythiques soirées, de nos visionnages de VBB et de tes stagiaires inoubliables. Je vous souhaite une belle réussite.

Madame le Docteur Pauline Gilleron, je te remercie de m'avoir supporté au labo 1. Je te souhaite la réussite dans tes études et le meilleur pour toi et ta famille.

Monsieur Xavier Laurent, je te remercie pour ta disponibilité et pour ta sympathie. Membre de la fabuleuse promo MDD 2012, je te souhaite le meilleur pour l'avenir.

Monsieur le Docteur Jamal El Bakali, merci de m'avoir préparé au grand jury et pour tes précieux conseils. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Mesdames Elise Vanderbielt, Coralie Sommerville, Tiphaine Bras-Antunes, Alexandrica Celina et Téodora Tarantus, Vous avez activement participé aux synthèses présentées dans cette thèse et je vous en remercie. Je vous souhaite bonne chance pour la suite de vos futures (grandes) carrières.

Aux personnes rencontrées durant cette thèse :

Monsieur le Professeur Patrick Depreux, je tiens à vous remercier pour votre disponibilité ainsi que pour l'ensemble des cours que vous m'avez fourni durant mon master.

Madame le Docteur Laurence Goossens, je te remercie pour ta disponibilité, ta gentillesse ainsi que pour les cours en Master et en Mastère. A très bientôt.

Madame Frédérique Crépel, un grand merci pour ta joie de vivre et ta disponibilité. Je me souviendrai de tes fous rires et tes coups de gueule. L'ICPAL ne serait pas la même chose sans toi. Je te souhaite le meilleur (et bon courage pour la cat. B).

Monsieur le Docteur Pascal Carato, je tiens à te dire merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur et tes conseils. Je me souviendrai encore longtemps des soirées lyonnaises.

Madame le Docteur Emmanuelle Lipka, merci pour ta gentillesse, tes conseils et aussi pour les kramieks qui ont contribué à renforcer ma double couche lipidique.

Monsieur le Docteur Amaury Farce, cela fut un grand plaisir de te rencontrer et d'avoir suivi tes mémorables cours en Master. A très bientôt.

Madame le Docteur Delphine Le Broc, je te remercie pour ta joie de vivre et tous les bons moments que nous avons passés. Un grand merci aussi pour ton écoute et tes conseils. Je te souhaite le meilleur pour toi et ta famille. Nous nous reverrons, j'en suis sûr. A très vite.

Madame le Docteur Ophélie Milhomme, tu as su renforcer les troupes de chimistes complètement dingues de l'ICPAL. Merci pour les soirées et tous les bons moments, même s'il faudra s'améliorer à la belote.

Monsieur Jean-Jacques Hauser, je vous remercie d'avoir toujours été disponible et de m'avoir épaulé tout au long de mon mandat au CS. L'école doctorale et les doctorants ont beaucoup de chance d'avoir un coordonateur aussi impliqué.

Madame Laurence Fofana et Monsieur François Delcroix, vous avez toujours été disponible lors de ces 3 années ainsi qu'à l'écoute de mes difficultés administratives, et je vous en remercie.

Mesdames Sophie Hennion, Stéphanie Genay, Florence Bourdon et Messieurs Sébastien Bontemps-Gallo, Pierre Martinez, Kevin Quintard, je vous remercie de votre amitié et de l'ambiance de notre petite équipe de représentants. Même si nous n'avons pas effectué l'ensemble des points qui nous tenaient à cœur, nous avons essayé de faire bouger les choses dans un gouvernement universitaire statique. Merci à vous.

Marion Donnier-Marechal, Valéria Héloire, Elodie Landagaray, Marouan Rami, compagnons de thèse et de MDD, cela a été un plaisir de vous rencontrer et d'avoir passé de bons moments lors de congrès ou lorsque j'étais dans les couloirs...j'espère que nous garderons contact.

A mes parents, je vous dis un grand merci de m'avoir toujours soutenu et poussé à aller toujours plus loin. Je vous remercie de m'avoir emmené aux quatre coins du monde mais aussi de m'avoir permis d'effectuer de longues études. Je vous remercie pour toutes les belles rencontres que j'ai faites grâce à vous.

A Caro, mon pilier, mon binôme, mon amour, je ne peux que te répéter combien tu comptes pour moi et combien je te remercie d'être là chaque jour. A toute la vie...

LISTE DES ABREVIATIONS

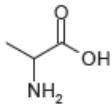
AAI	Aminoalkylindoles
ABP	Acyl chain binding pocket
ABHD 4	α / β hydrolase domain 4
ABHD 6	α / β hydrolase domain 6
ABHD 12	α / β hydrolase domain 12
AC	Adénylate cyclase
AChE	Acétylcholinestérase
AcOEt	Acétate d'éthyle
ACPA	Arachidonylcyclopropylamide
AEA	Anandamide
2-AG	2-Arachidonoylglycérol
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AlMe ₃	Triméthylaluminium
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
AP	Acide phosphatidique
APCI ⁺	Ionisation chimique positive à pression atmosphérique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
5-ASA	Acide 5-aminosalicylique
AUC	Aire sous la courbe
AVC	Accident vasculaire cérébral
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BSA	Albumine de sérum bovin
CB ₁	Récepteur aux cannabinoïdes de type 1
CB ₂	Récepteur aux cannabinoïdes de type 2
CBAH	Conjugated bile acid hydrolase
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CDTA	Transacylase calcium-dépendante
CE ₅₀	Concentration efficace à 50 %
CHO	Cellules d'ovaires de hamster chinois
CI ₅₀	Concentration inhibitrice à 50 %
Cl _{int}	Clairance intrinsèque
CLUHP	Chromatographie liquide à ultra haute performance
COX	Cyclooxygénase
CSP	Cholangite sclérosante primitive
CYP450	Cytochrome P450
DAG	Diacylglycérol
DAGL	Diacylglycérol lipase
DAI	Indice d'activité de la maladie
DIEA	<i>N, N</i> -Diisopropyléthylamine
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	Diméthylformamide
DMS	Sulfure de diméthyle
DMSO-D6	Diméthylsulfoxyde deutéré
DNBS	Acide 2,4-dinitrobenzene sulfonique
DNFB	2,4-dinitrofluorobenzene
DPPA	Azide de diphénylphosphoryle
DSS	Sulfate de dextran sodique
EC	Endocannabinoïde

EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EET-EA	Acides époxyeicosatriénoïque-éthanolamides
EFCCA	European Federation of Crohn's and ulcerative Colitis Associations
E _{max}	Efficacité maximale
EMT	Protéines de transport membranaire
Equiv	Equivalent
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Et ₃ N	Triéthylamine
EtOH	Ethanol
EtONa	Ethanolate de sodium
Et ₃ SiH	Triéthylsilane
FAAH	Fatty acid amide hydrolase
FAK	Focal adhesion kinase
FAN	Factor associated with neutral sphingomyelinase activation
FAPB	Fatty acid binding protein
FLAT	FAAH-like anandamide transporter
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GDE1	Glycérophosphodiesterase 1
GPR55	G protein-coupled receptor 55
GRα	Récepteur α aux glucocorticoïdes
GTPγS	Guanosine triphosphate radiomarquée
HBTU	Hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium
HEH	Ester de Hantzsch
HMDO	Hexaméthylidisiloxane
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HRMS	Spectroscopie moléculaire à haute résolution
ICPAL	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol
IL1-β	Interleukine 1-β
IL-4	Interleukine 4
IL-8	Interleukine 8
IFN-γ	Interféron γ
IP	Intrapéritonéale
IP ₃	Inositol-(1,4,5)-triphosphate
JNK	c-Jun N-terminal-kinase
k	Constante d'élimination
k _i	Constante d'affinité
kc	Chemokine ligand 1
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à une spectroscopie de masse
LOX	Lipoxygénase
Lyso-PI	2-Arachidonoyl-lysophosphatidylinositol
Lyso-PLC	Lysophospholipase C
MAC	Membrane access channel
MAGL	Monoacylglycérol lipase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MC	Maladie de Crohn
MeCN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MPD	2-Méthyl-2,4-pentanediol
MPO	Myéloperoxydase

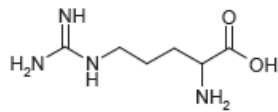
MTS	3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium
NAAA	<i>N</i> -Acyléthanolamine acyl amidase
NADA	<i>N</i> -Arachidonoyldopamine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NAE	<i>N</i> -Acyléthanolamine
NAM	<i>N</i> -Arachydonoyl maleimide
NArPE	<i>N</i> -Arachidonoyl phosphatidyléthanolamine
NAPE-PLD	<i>N</i> -Acylphosphatidyléthanolamine-selective phospholipase D
NAT	<i>N</i> -Acyltransférerase
NT-R	Récepteur des neurotransmetteurs
OEA	Oléoyléthanolamide
PA-hydrolase	Phosphatidic acid hydrolase
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Réaction en chaîne par polymérerase
Pd(PPh ₃) ₄	Palladium triphénylphosphine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEA	Palmitoyléthanolamide
Pf	Point de fusion
PG-EA	Esters de prostaglandine éthanolamide
PG-GE	Esters de prostaglandine-glycérols
PHARC	Polyneuropathies, pertes de l'audition, ataxies, rétinites pigmentaires et cataractes
PI	Phosphatidylinositol
PI ₃ K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLA ₁	Phosphatidylinositol-phospholipase A1
PLC-β	Phospholipase C β
PLD	Phospholipase D
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonique
POLR2A	Polymérerase (ARN) II (ADN dirigé) polypeptide A
PPA	Acide polyphosphorique
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
RCH	Rectocolite hémorragique
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RSA	Relations structure-activité
SEA	Stéaroyléthanolamide
SEP	Sclérose en plaques
SNC	Système nerveux central
pSTAT6	Signal transducer and activator of transcription 6 protein
SVF	Sérum de veau fœtal
t _{1/2}	Temps de demi-vie
T.A.	Température ambiante
TFA	Acide trifluoroacétique
Tf ₂ O	Anhydride triflique
Δ ⁹ -THC	(-)-Δ ⁹ -Tétrahydrocannabinol
THF	Tétrahydrofurane

TNBS	Acide 2,4,6-trinitrobenzene sulfonique
TNF- α	Facteur de nécrose tumoral α
TRPV1	Transient receptor potential vanilloide 1
TRPV4	Transient receptor potential vanilloide 4
TrK	Récepteurs aux neurotrophines à activité tyrosine kinase
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR-2	Récepteur aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire de type 2

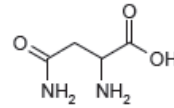
PRINCIPAUX ACIDES AMINES



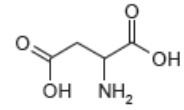
Alanine
(Ala / A)



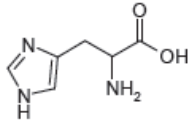
Arginine
(Arg / R)



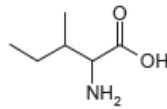
Asparagine
(Asn / N)



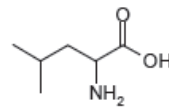
Acide Aspartique
(Asp / D)



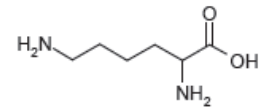
Histidine
(His / H)



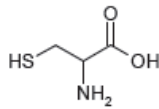
Isoleucine
(Ile / IL)



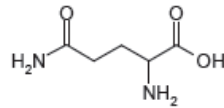
Leucine
(Leu / L)



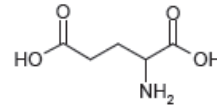
Lysine
(Lys / K)



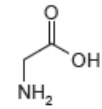
Cystéine
(Cys / C)



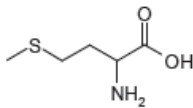
Glutamine
(Gln / Q)



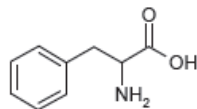
Acide Glutamique
(Glu / E)



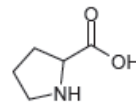
Glycine
(Gly / G)



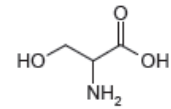
Méthionine
(Met / M)



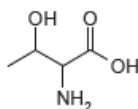
Phénylalanine
(Phe / F)



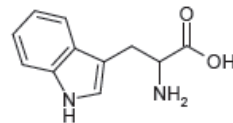
Proline
(Pro / P)



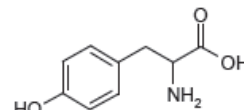
Sérine
(Ser / S)



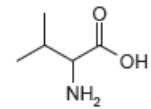
Thrénine
(Thr / T)



Tryptophane
(Trp / W)



Tyrosine
(Tyr / Y)



Valine
(Val / V)

SOMMAIRE

Remerciements	III
Liste des abréviations	VII
Principaux acides aminés	XI
Introduction	1
I. Généralités sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	2
1. Epidémiologie, étiologie et aspects lésionnels des MICI	2
2. Symptômes, complications et évaluations des MICI	6
3. Traitements actuels des MICI	9
II. Le système endocannabinoïde	14
1. Les récepteurs aux cannabinoïdes	15
a. Le récepteur CB ₁	16
i. Structure	16
ii. Distribution	18
iii. Les agonistes du récepteur CB ₁	18
iv. Les antagonistes / agonistes inverses du récepteur CB ₁	20
b. Le récepteur CB ₂	22
i. Structure	22
ii. Distribution	24
iii. Les agonistes du récepteur CB ₂	25
iv. Les antagonistes / agonistes inverses du récepteur CB ₂	28
2. Les endocannabinoïdes	30
a. L'anandamide	30
b. Le 2-arachidonoylglycérol	32
3. Les <i>N</i> -acyléthanolamides associés aux endocannabinoïdes	33
a. Le palmitoylethanolamide	33
b. L'oléoylethanolamide	33
c. Le stéaroylethanolamide	34
4. Les voies de biosynthèse des endocannabinoïdes	35
a. Biosynthèse de l'anandamide	35
b. Biosynthèse du 2-arachidonoylglycérol	37
5. Les voies de signalisation intracellulaire des récepteurs aux cannabinoïdes	39
a. Voies de transduction du récepteur CB ₁	39
b. Voies de transduction du récepteur CB ₂	44
6. Les voies de biodégradation des endocannabinoïdes	47
a. La fatty acid amide hydrolase	47
i. Structure et distribution	47

ii. Propriétés catalytiques	50
iii. Les inhibiteurs de la FAAH	51
b. La monoacylglycerol lipase	58
i. Structure et distribution	58
ii. Propriétés catalytiques	61
iii. Les inhibiteurs de la MAGL	62
c. La <i>N</i> -acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase	65
i. Structure et distribution	65
ii. Propriétés catalytiques	66
iii. Les inhibiteurs de la NAAA	68
d. Les α/β hydrolases domain 6 and 12	70
i. Structure et distribution	70
ii. Propriétés catalytiques	72
iii. Les inhibiteurs de l'ABHD6 et de l'ABHD12	72
e. Les autres voies de dégradation	73
7. Le transport des endocannabinoïdes	75
III. Intérêt du récepteur CB₂ et de la FAAH en tant que cibles thérapeutiques	80
1. La douleur	80
a. Le récepteur CB ₂ et la douleur	81
b. La FAAH et la douleur	83
2. L'inflammation	85
a. Le récepteur CB ₂ et l'inflammation	85
b. La FAAH et l'inflammation	87
3. Les autres applications thérapeutiques	88
a. Les autres applications thérapeutiques du récepteur CB ₂	88
b. Les autres applications thérapeutiques de la FAAH	90
Conception	93
I. Conception d'inhibiteurs de la FAAH de type 2-benzoxazolinone – Série A	95
1. L'URB597 : un lead	95
2. Pharmacomodulations envisagées autour de la 2-benzoxazolinone	96
3. Sélection de composés de type 2-benzoxazolinone dans la chimiothèque	97
II. Conception d'inhibiteurs de la FAAH et d'agonistes du récepteur CB₂ de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole	101
1. Inhibiteurs de la FAAH de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole – Série B	101
a. Les travaux antérieurs	101
b. Pharmacomodulations de l'ALIAE202	104

2. Agonistes sélectifs du récepteur CB ₂ de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole – Série C	105
---	-----

Stratégie de synthèse	107
------------------------------	------------

I. Stratégie de synthèse des inhibiteurs de la FAAH de type 2-benzoxazolinone – Série A	108
--	------------

1. Acylation de Friedel-Crafts de la position C-6 de la 2-benzoxazolinone : synthèse des composés 1 à 4	108
a. Synthèse de la 6-benzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (1)	108
i. En présence du réactif d'Eaton	108
ii. En présence de l'acide polyphosphorique	109
b. Synthèse du 6-[(E)-3-phényl-2-propenoyl]-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (2)	109
i. En présence du réactif d'Eaton	109
ii. En présence de l'acide polyphosphorique	110
c. Synthèse du 6-(3,4,5-trifluorobenzoyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (3)	110
d. Synthèse de la 6-(4-trifluorométhylbenzoyl)-2,3-dihydro-1,3- benzoxazol-2-one (4)	111
2. Modulations du carbonyle en position C-6 du composé 6-benzoyl-2,3-dihydro-1,3- benzoxazol-2-one : synthèse des composés 5 à 7	111
a. Synthèse de la 6-benzyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (5)	111
b. Synthèse de la 6-(hydroxyiminobenzyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (6)	112
c. Synthèse de la 6-thiobenzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (7)	112
3. Substitution nucléophile de type 2 : synthèse des composés 8 à 21	113
a. Synthèse des 6-benzoyl-3-alkyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-ones (8 - 15)	113
b. Synthèse des 3-phenalkyl-6-[(E)-3-phényl-2-propenoyl]-2,3-dihydro-1,3- benzoxazol-2-ones (16 - 20)	113
c. Synthèse de la 3-(5-phénylpentyl)-6-(3,4,5-trifluorobenzoyl)-2,3-dihydro-1,3- benzoxazol-2-one (21)	114

II. Stratégie de synthèse des inhibiteurs de la FAAH de type 3-carboxamido-5-aryl- isoxazoles – Série B	117
--	------------

1. Synthèse du N3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-N3-méthyl-5-(4-biphényl)-3- isoxazolecarboxamide (22)	117
2. Synthèse de la N3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-3- isoxazoleméthylamine (23)	118
a. Réduction de l'amide : voie de synthèse n°1	118
b. Réduction de l'amide : voie de synthèse n°2	119
c. Réduction de l'amide : voie de synthèse n°3	120
d. Réduction de l'amide : voie de synthèse n°4	120

3. Synthèse du <i>N</i> 3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-3-isoxazolecarbothioamide (24)	122
4. Synthèse de la <i>N</i> 3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)- <i>N</i> '3-hydroxy-3-isoxazolecarboximidamide (25)	123
5. Synthèse du <i>N</i> 1-(5-(4-biphényl)-3-isoxazolyl)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-propanamide (27)	124
a. Réarrangement de Curtius : synthèse du composé 26	124
b. Couplage de type peptidique : synthèse du composé 27	125
6. Synthèse du <i>N</i> 5-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-3-(4-biphényl)-5-isoxazolecarboxamide (31)	127
a. Oximation : synthèse du composé 28	127
b. Cyclisation : synthèse du composé 29	128
c. Saponification : synthèse du composé 30	129
d. Couplage de type peptidique : synthèse du composé 31	129
7. Synthèse du <i>N</i> 4-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-2-(4-biphényl)-1,3-oxazole-4-carboxamide (34)	130
a. Couplage de Suzuki : synthèse du composé 32	130
b. Saponification : synthèse du composé 33	132
c. Couplage de type peptidique : synthèse du composé 34	132
8. Synthèse du <i>N</i> 5-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-3-(4-biphényl)-1,2,4-oxadiazole-5-carboxamide (40)	133
a. Formation de la carboxamidine : synthèse du composé 35	134
b. Cyclisation en 1,2,4-oxadiazole : synthèse du composé 36	135
c. Synthèse du composé 40 : voie de synthèse n°1	135
i. Saponification : synthèse du composé 37	136
ii. Couplage de type peptidique : synthèse du composé 40	136
d. Synthèse du composé 40 : voie de synthèse n°2	136
e. Synthèse du composé 40 : voie de synthèse n°3	137
i. Substitution du chlorure d'éthyloxalyle et saponification : Synthèse du composé 38	137
ii. Addition de la carboxamidine 35 : Synthèse du composé 40	138
f. Synthèse du composé 40 : voie de synthèse n°4	139
9. Synthèse du <i>N</i> 2-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-1,3,4-oxadiazole-2-carboxamide (44)	140
a. Substitution du chlorure d'éthyloxalyle : synthèse du composé 41	141
b. Cyclisation en 1,3,4-oxadiazole : synthèse du composé 42	142
c. Synthèse du composé 44	143
i. Voie de synthèse n°1 : Saponification de l'ester et couplage de type peptidique	143
ii. Voie de synthèse n°2 : Amidification par AlMe ₃	144

III. Stratégie de synthèse des agonistes sélectifs du récepteur CB₂ de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole – Série C	146
1. Réaction de <i>O</i> -alkylation : synthèse du composé 45	148
2. Réaction de Claisen : synthèse du composé 46	148
3. Réaction de cyclisation en isoxazole : synthèse du composé 47	149
4. Saponification de l'ester : synthèse du composé 48	151
5. Couplage peptidique : synthèse des composés finaux 49 à 58	151
Evaluations pharmacologiques	153
I. Méthodes des évaluations pharmacologiques	154
1. Mesure de l'activité inhibitrice des composés vis-à-vis de la FAAH	154
2. Mesure de l'activité cytotoxique des composés	155
3. Mesure de l'affinité des composés vis-à-vis des récepteurs CB ₁ et CB ₂	156
4. Mesure de l'activité fonctionnelle des composés vis-à-vis des récepteurs CB ₁ et CB ₂	157
5. Mesure de la stabilité des composés en présence de microsomes hépatiques	158
6. Mesure de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> des composés	159
II. Résultats pharmacologiques des composés de la série A	161
III. Résultats pharmacologiques des composés de la série B	168
IV. Résultats pharmacologiques des composés de la série C	171
1. Affinité des composés vis-à-vis des récepteurs CB ₁ et CB ₂	173
2. Activité fonctionnelle des composés vis-à-vis des récepteurs CB ₁ et CB ₂	177
3. Activité cytotoxique des composés	178
4. Stabilité des composés en présence de microsomes hépatiques	179
5. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> des composés 50 et 52	181
a. Evolution de la masse corporelle des souris	181
b. Evaluation des dégâts coliques et effet protecteur des composés 50 et 52	182
c. Quantification des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et Kc	184
6. Activité inhibitrice des composés vis-à-vis de la FAAH	186
Conclusion et perspectives	189

Partie expérimentale	195
I. Synthèse des composés de type 2-benzoxazolinone 1 à 21 – Série A	197
II. Synthèse des composés de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole 22 à 44 – Série B	219
III. Synthèse des composés de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole 45 à 58 – Série C	245
IV. Test de fonctionnalité au [³⁵S]-GTPγS	261
V. Culture cellulaire et test de prolifération cellulaire	261
VI. Les animaux	262
VII. Induction et détermination du score de la colite	262
VIII. Analyses histopathologiques	263
IX. Extraction de l'ARN et qPCR en temps-réel	264
X. Analyses statistiques	264

INTRODUCTION

I. Généralités sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupant la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), sont des affections qui résultent de l'inflammation chronique, intermittente ou continue, d'une partie de la paroi intestinale. Elles frappent avec prédilection l'adulte jeune et évoluent par poussées entrecoupées de périodes de rémission. Cette évolution particulière est notamment à l'origine de lésions d'âge différent que l'on peut distinguer macroscopiquement et histologiquement en lésions aiguës et chroniques.

La pathogénèse des MICI n'est que partiellement connue à ce jour. Des facteurs génétiques et environnementaux tels qu'une modification de la flore bactérienne intra-luminale et une perméabilité intestinale accrue jouent un rôle dans la dérégulation de l'immunité intestinale, avec pour effet des lésions gastro-intestinales.

1. *Epidémiologie, étiologie et aspects lésionnels des MICI*

Ces maladies sont caractérisées par une inflammation de la paroi du tube digestif, liée à une hyperactivité du système immunitaire, source de lésions destructrices (ulcérations). L'EFCCA (European Federation of Crohn's and ulcerative Colitis Associations), dans son étude clinique IMPACT effectuée de novembre 2010 à août 2011, a estimé à plus de 2,2 millions le nombre de personnes affectées par les MICI en Europe.¹ En France, environ 6000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année ; avec une incidence de la RCH de 7,2 pour 100 000 entre 2000 et 2002 dans le Nord de la France.² Si aujourd'hui ce chiffre demeure stable, ce n'était pas le cas il y a une trentaine d'années puisqu'on estime qu'entre 1945 et 1980, l'incidence de ces maladies a été multipliée par 10 dans les pays industrialisés.

¹ <http://www.efcca.org/index.php/about-efcca/what-are-ibd>. Accédé le 09 avril 2013.

² Bernstein, C. N.; Shanahan, F. Disorders of a modern lifestyle : reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* **2008**, *57*, 1185 - 1191.

Aussi, on constate une disparité des cas de MICI dans le monde où les pays du Nord semblent nettement plus touchés que les pays du Sud. En effet, l'augmentation de l'incidence des MICI dans les pays en développement semble parallèle à une occidentalisation du mode de vie. Ainsi, la prévalence de la MC paraît être plus élevée dans les régions urbaines que dans les régions rurales et dans les classes socio-économiques plus privilégiées. La plupart des études montrent que, lorsque l'incidence commence à augmenter c'est la classe sociale la plus élevée qui est concernée mais qu'avec le temps la maladie a tendance à toucher tout le monde. S'il est difficile d'expliquer ce phénomène, les chercheurs émettent cependant plusieurs hypothèses. Notamment l'hypothèse que certains facteurs environnementaux comme la pollution, l'alimentation, le mode de vie ou encore le stress plus présents dans les pays développés ou en cours de développement, favoriseraient l'apparition de ces maladies. Ainsi que « l'hypothèse de l'hygiène », selon laquelle les personnes qui ont été moins exposées à des infections ou à des conditions sanitaires insalubres dans l'enfance, ont tendance à perdre les organismes potentiellement « bienveillants » et/ou les organismes qui favorisent le développement des cellules T régulatrices ; ou alors que leur système immunitaire ne développe pas une réponse immune suffisamment étendue faute d'avoir été exposé à des organismes nocifs. De telles personnes ont une incidence plus élevée de maladies immunitaires chroniques, y compris les MICI.

La MC et la RCH apparaissent généralement à l'adolescence, suggérant l'impact de facteurs hormonaux, et dans un quart des cas, l'ensemble des symptômes apparaît avant l'âge de 25 ans. Une disparité selon le sexe existe également. En effet, chez les jeunes enfants, la MC se rencontre plus fréquemment chez les filles que chez les garçons, même si l'incidence de la MC a été plus élevée chez les garçons que chez les filles ces 10 dernières années. Aussi il est probable qu'avec le temps nous allons voir une égalisation du ratio homme / femme, ce qui est déjà le cas pour la RCH.

Toujours d'après l'étude IMPACT de l'EFCCA, parmi les hommes souffrant de MICI dans les 21 pays d'Europe de l'étude, 61 % sont atteints de la MC et 36 % de la RCH.

Et parmi les femmes atteintes de MICI, 64 % souffrent de la MC et 32 % de la RCH.³ Cependant, dans les pays en voie de développement dans lesquels les MICI sont en train de faire leur apparition, la RCH est plus fréquente que la MC, avec pour exemple l'Inde avec un rapport RCH / MC de 8 / 1.

Les causes de ces maladies ne sont que partiellement connues à ce jour. De nombreux facteurs de risques environnementaux ont été évoqués dans les MICI, comme ceux précédemment cités, mais les seuls clairement établis sont le tabac et l'appendicectomie.

Le tabac a des effets opposés au cours des MICI. Il protège de la RCH mais favorise la survenue de la MC. Aussi, le risque de RCH est réduit d'environ 40 % chez les fumeurs alors que les anciens fumeurs ont un risque plus important de 70 % de développer une RCH par rapport aux non-fumeurs.⁴ De plus, l'appendicectomie est également un autre facteur avec des effets potentiellement opposés. Elle semble protéger avec une réduction de près de 70% du risque de RCH, tout en ayant soit aucun effet, soit un effet prédisposant à la survenue de la MC.⁵ Cependant le rôle biologique de l'appendice n'est pas encore caractérisé, et l'impact de sa présence ou de son absence sur le développement d'une forme de MICI à l'autre reste insaisissable.

Il apparaît également que ces pathologies multifactorielles impliquent ces facteurs environnementaux sur un terrain génétiquement prédisposé. En effet, une étude réalisée sur une population représentative de jumeaux mono- et dizygotes a permis de mettre en évidence que, pour la MC, le taux de concordance chez les monozygotes (58,3%) était significativement supérieur à celui observé chez les dizygotes (3,9 %).⁶ Cette découverte a donc naturellement incité les scientifiques à rechercher les gènes susceptibles d'influencer le développement des MICI. Sur ces bases, trois équipes européennes et américaines ont mis en évidence, en 2001, le premier gène de susceptibilité pour la MC.

³ <http://efcca-solutions.net/european.php>. From Survey Solution, Charts, tables, and graphs. Accédé le 9 avril 2013.

⁴ Calkins, B. M. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **1989**, *34*, 1841 - 1854.

⁵ Russel, M. G.; Dorant, E.; Brummer, R. J.; Van de Kruijs, M. A.; Muris, J. W.; Bergers, J. M.; Goedhard J.; Stockbrügger, R.W. Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease : results of a large case-control study. *South Limburg Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology* **1997**, *113*, 377 - 382.

⁶ Tysk, C.; Lindberg, E.; Jarnerot, G.; Floderus-Myrhed, B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* **1988**, *29*, 990 - 996.

Il s'agit du gène NOD2/CARD15 situé sur le chromosome 16.^{7,8,9} Plus récemment, deux autres gènes de susceptibilité ont été identifiés sur les chromosomes 5 et 10 et nommés respectivement OCTN et DLG5.¹⁰ D'autres gènes, non impliqués dans la susceptibilité aux MICI, pourraient moduler leur expression clinique. Ainsi, certains allèles HLA de classe II ont été associés à des formes plus sévères de la RCH, et d'autres à la survenue de manifestations extra-intestinales. Il semblerait ainsi que les MICI fassent partie des pathologies oligogéniques (maladies génétiques héréditaires).

Malgré de nombreuses similitudes épidémiologiques et étiologiques entre la MC et la RCH, ces pathologies diffèrent par la localisation et la profondeur des lésions. En effet, alors que la MC affecte l'ensemble du tube digestif de façon discontinue, la RCH atteint uniquement de manière continue le côlon et le rectum. Au niveau macroscopique, la MC affecte le tube digestif de manière asymétrique : les bords mésentériques de l'intestin sont plus touchés que pour la RCH où les lésions sont homogènes, avec une certaine diversité lésionnelle. Enfin, au niveau microscopique, on remarque des infiltrations lymphoplasmocytaires avec conservation de la mucosécrétion chez les patients atteints de la MC, alors qu'en cas de RCH, on observe des infiltrations de polynucléaires sous forme de cryptites accompagnées d'une diminution de la mucosécrétion.

Les MICI sont caractérisées par une réponse immunitaire inadaptée à l'encontre des bactéries de la flore intestinale, qui, chez le sujet sain, sont considérées comme du soi. Ainsi, la dysrégulation du système immunitaire muqueux est perpétuée par le maintien de l'activation des lymphocytes T et un dérèglement du ratio cytokines pro-inflammatoires sur cytokines anti-inflammatoires.

⁷ Hugot, J. P.; Chamaillard, M.; Zouali, H.; Lesage, S.; Cézard, J. P.; Belaiche, J.; Almer, S.; Tysk, C.; O'Morain, C. A.; Gassull, M.; Binder, V.; Finkel, Y.; Cortot, A.; Modigliani, R.; Laurent-Puig, P.; Gower-Rousseau, C.; Macry, J.; Colombel, J. F.; Sahbatou, M.; Thomas, G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **2001**, *411*, 599 – 603.

⁸ Ogura Y.; Bonen D. K.; Inohara, N.; Nicolae, D. L.; Chen, F. F.; Ramos, R.; Britton, H.; Moran, T.; Karaliuskas, R.; Duerr, R. H.; Achkar, J. P.; Brant, S. R.; Bayless, T. M.; Kirschner, B. S.; Hanauer, S. B.; Nunez, G.; Cho, J. H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **2001**, *411*, 603 - 606

⁹ Hampe, J.; Cuthbert, A.; Croucher, P. J.; Mirza, M. M.; Mascheretti, S.; Fisher, S.; Frenzel, H.; King, K.; Hasselmeier, A.; MacPherson, A. J.; Bridger, S.; Van Deventer, S.; Forbes, A.; Nikolaus, S.; Lennard-Jones, J. E.; Foelsch, U. R.; Krawczak, M.; Lewis, C.; Schreiber, S.; Mathew, C. G. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* **2001**, *357*, 1925 - 1928.

¹⁰ Cucchiara, S.; Latiano, A.; Palmieri, O.; Staiano, A. M.; D'Incà, R.; Guariso, G.; Vieni, G.; Rutigliano, V.; Borrelli, O.; Valvano, M. R.; Annese, V. Role of CARD15, DLG5 and OCTN genes polymorphisms in children with inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 1221 - 1229.

L'étude des cytokines dans les modèles expérimentaux de colite et chez les patients atteints de MICI a permis de mettre en évidence le rôle prédominant des cytokines pro-inflammatoires (ex : tumor necrosis factor- α (TNF- α) et interleukine 1 β (IL-1 β)),¹¹ et immunorégulatrices (ex : interferon- γ (IFN- γ) et interleukine 4 (IL-4)). Il a notamment été montré que les cytokines pro-inflammatoires secrétées en cas de MICI, telles que TNF- α et IL-1 β , activaient à long terme la fibrogénèse, la production de collagène et les métalloprotéases tissulaires ce qui conduit inéluctablement à des remaniements de la muqueuse. De même, les cytokines immunorégulatrices dont Mosmann *et al* ont décrit deux entités, type 1 (ex : IFN- γ) et type 2 (ex : IL-4),^{12,13} ont été associées à des lésions d'âge différent. L'analyse des lésions dites aiguës montrait un profil d'expression de cytokines de type 2 alors que celle des lésions dites chroniques mettait en évidence un profil de type 1.¹⁴ Ces études immunologiques sont à l'origine d'une meilleure compréhension de la physiopathologie des MICI.

2. Symptômes, complications et évaluations des MICI

Les MICI sont des maladies intermittentes qui sont souvent à l'origine de symptômes gênants altérant la qualité de vie des patients et responsables du caractère tabou des ces pathologies. Ces symptômes peuvent varier de légers à sévères pendant les rechutes et peuvent disparaître ou diminuer pendant les rémissions, cela dépendant du segment de l'intestin atteint.

Les symptômes dus à une atteinte inflammatoire du tractus digestif sont la diarrhée (avec mucus ou sang dans les selles et une incontinence fécale), une constipation qui peut aller jusqu'à l'obstruction intestinale, des douleurs lors de la défécation voire des ténésmes, des urgences défécatoires sévères et des crampes abdominales. D'autres symptômes peuvent aussi être associés dans certains cas à la RCH et à la MC, notamment la fièvre, une fatigue, des sudations nocturnes, un retard de croissance, une perte de poids et une anorexie.

¹¹ Neurath, M. F.; Fuss, I.; Pasparakis, M.; Alexopoulou, L.; Haralambous, S.; Meyer zum Büschenfelde, K. H.; Strober, W.; Kollias, G. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*, 1743 - 1750.

¹² Mosmann, T. R.; Cherwinski, H.; Bond, M. W.; Giedlin, M. A.; Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **1986**, *136*, 2348 - 2357.

¹³ Clerici, M.; Shearer, G. M. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol. Today* **1994**, *15*, 575-581.

¹⁴ Desreumaux, P.; Brandt, E.; Gambiez, L.; Emilie, D.; Geboes, K.; Klein, O.; Ectors, N.; Cortot, A.; Capron, M.; Colombel, J. F. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* **1997**, *113*, 118 - 126.

Les complications associées à la RCH et à la MC peuvent être réparties en deux classes, les complications intestinales et les complications extra-intestinales. Parmi les complications intestinales se retrouvent des hémorragies liées à la présence d'ulcères, des perforations intestinales, des sténoses, des fistules, des maladies péri-anales, des abcès intra-abdominaux dans le cas de la MC et plus rarement des cas de mégacôlon toxique potentiellement mortel. Le risque de cancer du côlon est significativement augmenté 8 ans après le diagnostic de la RCH, ainsi que dans la MC si une partie importante du côlon est touchée. Ce risque dépend de la durée de la maladie, du début de la maladie à un âge jeune et de l'existence d'antécédents familiaux. Des cas de cholangite sclérosante primitive (CSP) et d'adénocarcinome de l'intestin grêle sont aussi associés respectivement à la RCH et à la MC.

Les complications extra-intestinales frappent jusqu'à 25% des personnes souffrant de MICI. Ces complications extra-intestinales sont des arthrites dans la majorité des cas, des spondylites ankylosantes, des CSP et d'autres maladies inflammatoires (uvéites, iritis,...) ainsi que des cas de stéatoses hépatiques non alcooliques. Des néphrolithiases et des calculs biliaires sont aussi associés à la MC.

En plus des complications, il a été remarqué que des troubles de l'humeur (anxiété et dépression), de l'ostéoporose, des maladies thrombo-emboliques et des épisodes artériels ischémiques sont plus fréquemment rencontrés chez les personnes souffrant de MICI que dans la population générale.

L'évaluation des patients atteints de MICI s'effectue dans un premier temps par un premier examen clinique ainsi qu'un examen de laboratoire avec analyses sanguines et des selles. Puis, dans un second temps, un examen par imagerie et endoscopie est effectué. Ces examens permettent alors aux médecins d'établir le diagnostic d'une MICI, qu'ils vont caractériser en RCH ou MC, dans la majorité des cas (*cf.* Tableau 1).

Tableau 1. Caractéristiques permettant de faire la différence entre la RCH et la MC.

	Caractéristiques typiques de la RCH	Caractéristiques typiques de la MC
Cliniques	Diarrhées fréquentes de petit volume généralement sanglantes, avec besoins impérieux	Diarrhées accompagnées de douleurs abdominales et de malnutrition ; Stomatite ; Masse abdominale ; Lésions péri-anales
Endoscopiques et radiologiques	Inflammation colique superficielle diffuse; Atteinte du rectum mais peut être inégale; Erosions et ulcères superficiels; Saignements spontanés	Lésions asymétriques transmuraux; Atteinte de l'iléon et du côlon droit; Aspect pavimenteux; Ulcères longitudinaux; Fissures profondes
Histopathologiques	Inflammation diffuse de la muqueuse ou de la sous-muqueuse; Déformation de l'architecture des cryptes	Inflammation granulomateuse; Fissures ou ulcères aphtoides présents; Inflammation transmurale fréquente
Marqueurs sérologiques	Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires	Anticorps anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Des scores d'activité de la RCH et de la MC vont ensuite être attribués aux patients afin d'évaluer la gravité de leur maladie (cf. tableaux 2 et 3).

Tableau 2. Score d'activité de la rectocolite hémorragique.¹⁵

	Légère	Modérée	Sévère
Nombre de selles sanglantes / jour	< 4	4 ou plus <i>si</i>	≥ 6 <i>et</i>
Pouls	< 90 / min	≤ 90 / min	> 90 / min <i>ou</i>
Température	< 37,5 °C	≤ 37,8 °C	> 37,8 °C <i>ou</i>
Hémoglobine	> 11,5 g / dL	≥ 10,5 g / dL	< 10,5 g / dL <i>ou</i>
VS	< 20 mm / h	≤ 30 mm / h	> 30 mm / h <i>ou</i>
Ou PCR	Normale	≤ 30 mg / L	> 30 mg / L

PCR, protéine C-réactive ; VS, vitesse de sédimentation.

Tableau 3. Score d'activité de Harvey-Bradshaw pour la MC.¹⁶

Score	0	1	2	3	4
Bien-être général	Bon	Moyen	Médiocre	Mauvais	Très mauvais
Douleurs abdominales	Absentes	Légères	Modérées	Sévères	
Diarrhée	1 point pour chaque selle liquide par jour				
Masse abdominale	Absente	Douteuse	Certaine	Certaine, avec défense	
Complications	1 point pour chaque item présent : arthralgie, uvéite, érythème noueux, pyoderma gangrenosum, aphte, fissure anale, nouvelle fistule ou abcès				

Total du score d'activité (= somme des sous-scores): score ≤ 4 : rémission; score 5–8 : maladie modérément active; score ≥ 9 : activité marquée.

¹⁵ Stange, E. F.; Travis, S. P. L.; Vermeire, S.; Reinisch, W.; Geboes, K.; Barakauskiene, A.; Feakins, R.; Fléjou, J. F.; Herfarth, H.; Hommes, D. W.; Kupcinskas, L.; Lakatos, P. L.; Mantzaris, G. J.; Schreiber, S.; Villanacci, V.; Warren, B. F. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and colitis* **2008**, 2, 1 - 23.

¹⁶ Harvey, R. F.; Bradshaw, J. M. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* **1980**, 315, 514.

Ainsi il est facilement compréhensible que les MICI sont très invalidantes pour les patients et nécessitent une prise en charge rapide de la maladie.

3. Traitements actuels des MICI

Les traitements médicaux des MICI, dont nous disposons aujourd'hui, permettent, dans les meilleurs cas, d'induire une rémission clinique, puis tentent de stabiliser la maladie et de prévenir la récurrence. Cependant, aucun de ces traitements n'est en mesure d'apporter la guérison du patient. Aussi, la prise en charge des MICI requiert souvent un traitement à long terme avec une combinaison de médicaments, suivi souvent par une intervention chirurgicale.

Actuellement, la prise en charge des patients se base sur un diagnostic différentiel de la MC vs la RCH, la localisation et le phénotype de l'atteinte, la sévérité de la maladie, les complications associées et la réponse symptomatique individuelle. L'accès aux soins, la tolérance à la prise en charge médicale et l'évolution antérieure de la maladie sont aussi des paramètres pris en compte par le médecin lors de la prise en charge du patient.

Un régime alimentaire et un changement de style de vie peuvent être considérés comme le premier traitement des patients atteints de MICI. Même si l'impact du régime alimentaire sur l'activité inflammatoire de la RCH et de la MC est mal connu, des modifications diététiques peuvent aider à une baisse de la symptomatologie. Il est notamment souhaitable de diminuer son apport en fibres alimentaires et en résidus alimentaires dans les périodes de poussées afin de diminuer la fréquence des selles. Un régime liquidien ou un jeûne contribue également à baisser les symptômes obstructifs. Enfin, une meilleure gestion du stress peut améliorer les symptômes ainsi que la gestion psychologique de la maladie par le patient.

Les traitements pharmacologiques des MICI représentent une étape nécessaire à la prise en charge des patients.

Aussi, les anti-inflammatoires dérivés des 5-aminosalicylés (cf. figure 1) comme la sulfasalazine (Salazopyrine[®]), la mésalamine (Pentasa[®], Rowasa[®]), la balsalazide (Colazal[®]) et l'olsalazine (Dipentum[®]) sont prescrits en première intention, avec une posologie de 2,0 à 4,8 g / jour, chez 85% des patients atteints de MICI, ceci en raison de leur bonne tolérance et des faibles effets secondaires qu'ils présentent.¹⁷

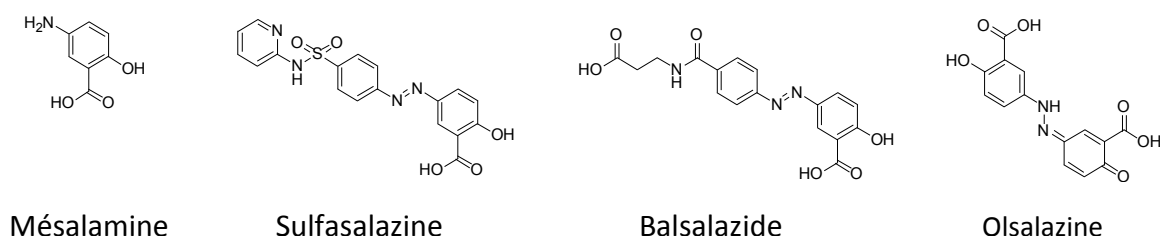


Figure 1. Principaux 5-aminosalicylés

En seconde intention ou en cas de poussées graves, des corticoïdes sont prescrits. Parmi ces corticoïdes se retrouvent le budésônide (Entocort[®]), la prédnisolone (Solupred[®]) et la dexaméthasone par voie orale, et la méthylprédnisolone (Solu-Médrol[®]) et l'hydrocortisone (Solu-Cortef[®]) par voie intraveineuse (cf. figure 2). Les corticoïdes suppriment généralement efficacement l'inflammation et produisent un soulagement rapide des symptômes. Cependant, ils ne jouent pas le rôle dans le maintien de la rémission et leurs effets secondaires (hypokaliémie, alcalose métabolique, hypertension artérielle, insuffisance cardiaque congestive, syndrome de Cushing iatrogène) en limitent l'utilisation à long terme.

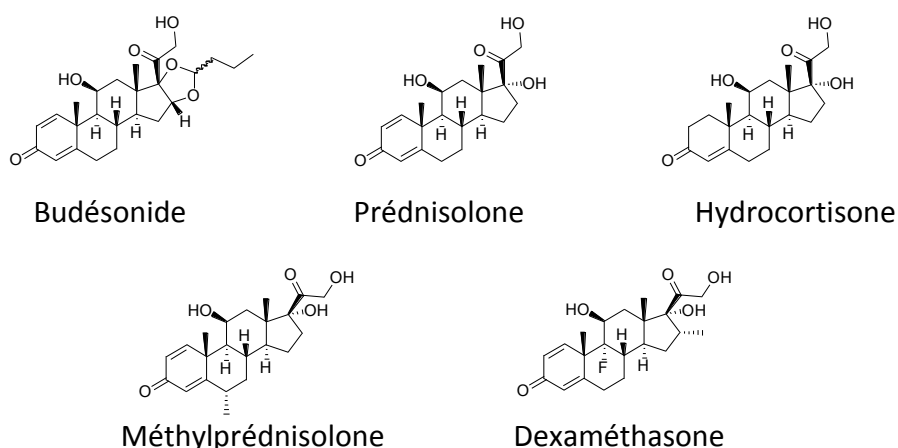


Figure 2. Principaux corticoïdes utilisés dans le traitement des MICI

¹⁷ Kruis, W.; Schreiber, S.; Theuer, D.; Brandes, J. W.; Schütz, E.; Howaldt, S.; Krakamp, B.; Hämling, J.; Mönnikes, H.; Koop, I.; Stolte, M.; Pallant, D.; Ewald, U. Low dose balsalazide (1.5 g twice daily) and mesalazine (0.5 g three times daily) maintained remission of ulcerative colitis but high dose balsalazide (3.0 g twice daily) was superior in preventing relapses. *Gut* **2001**, *49*, 783 - 789

Les immunosuppresseurs sont utilisés dans les MICI comme un traitement d'entretien visant à prévenir l'apparition de nouvelles poussées, mais également comme traitement de substitution quand les corticoïdes se sont révélés inefficaces ou lorsqu'ils ont provoqué une dépendance chez le patient. Parmi ces immunosuppresseurs (cf. figure 3) se retrouvent les thiopurines, comme la 6-mercaptopurine et l'azathioprine (Imurel[®]), ainsi que le méthotrexate (Méthotrexate[®]), qui sont souvent associés à la ciclosporine afin d'augmenter la rapidité de la réponse thérapeutique (2 à 3 mois sans la ciclosporine, 1 semaine avec la ciclosporine). Ces immunosuppresseurs sont également utilisés comme traitement primaire des fistules et traitement alternatif lors d'une rechute de la MC après traitement aux stéroïdes.

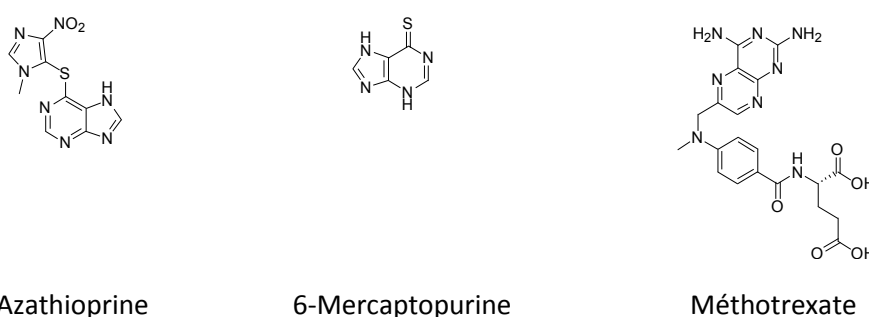


Figure 3. Immunosuppresseurs utilisés en traitement d'entretien

Des antibiotiques, comme le métronidazole ou la ciprofloxacine, sont très souvent utilisés dans le traitement de la MC (cf. figure 4). Ils sont utilisés pour traiter les complications de la MC, surtout les maladies péri-anales et les fistules. Il existe cependant un risque accru pour les patients sous antibiotiques de développer une affection à *Clostridium difficile* responsable de diarrhée voire de colite pseudo-membraneuse.



Figure 4. Antibiotiques utilisés en traitement d'entretien

Lorsqu'aucune réponse suffisante n'a pas été observée avec les traitements standards, alors les patients sont traités avec des anticorps monoclonaux anti-TNF α , comme l'Infliximab (Remicade[®]), l'Adalimumab (Humira[®]) et le Certolizumab (Cimzia[®]). Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire qui semble exercer un rôle majeur dans l'inflammation chronique en général et au cours de la MC. Ces biothérapies sont très intéressantes face à des formes sévères de MICI mais leur association avec des immunosuppresseurs reste contestée et leur coût (environ 4000€ / injection) en limite l'utilisation.

Qu'il s'agisse de la MC ou de la RCH, la chirurgie est très souvent envisagée. 70 à 75% des patients souffrant de la MC auront besoin d'une intervention chirurgicale contre 25 à 30% des patients souffrant de RCH. Ces interventions chirurgicales comprennent des drainages d'abcès, des résections segmentaires ou encore des colectomies totales et des iléostomies temporaires ou définitives. Ces traitements chirurgicaux permettent la diminution de l'intensité des symptômes. Par ailleurs, la résection segmentaire est considérée comme curative dans le cas de la RCH. Cependant, les interventions chirurgicales ne guérissent pas de la MC et les rechutes sont fréquentes.

La recherche thérapeutique a été considérable sur ces MICI, mais le peu de traitements disponibles ainsi que leur prise en charge lourde et coûteuse nécessitent de continuer la recherche afin de développer de nouvelles classes thérapeutiques plus facilement administrables au patient et moins coûteuses, tout en étant autant efficaces que les molécules déjà commercialisées.

Actuellement, la recherche s'intéresse aux probiotiques, étant donné que des modifications de la flore intestinale pourraient être à l'origine ou aggraver une MICI.¹⁸

D'autres classes thérapeutiques ciblant d'autres facteurs de l'inflammation seraient aussi susceptibles de compléter les traitements existants.

¹⁸ Veerappan, G. R.; Betteridge, J.; Young, P. E. Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2012**, *14*, 324 - 333.

Il s'agit des molécules anti-adhésions, comme l' α 4-intégrine/MAdCAM-1 et la β 2-intégrine/ICAM-1, qui jouent un rôle de médiateur entre les lymphocytes T et les cellules endothéliales dans l'inflammation,¹⁹ mais aussi les cellules souches mésenchymales qui ont montré dernièrement leurs effets bénéfiques chez les patients atteints de MICI avec fistules.²⁰

Une nouvelle génération de dérivés 5-aminosalicylés est également à l'étude avec des molécules plus efficaces, un effet anti-inflammatoire mais également préventif sur certain cancer.

Enfin, des études sur le système endocannabinoïde démontrent que ce système est présent au sein du tractus gastro-intestinal des patients atteints de MICI.^{21,22,23} Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence le rôle bénéfique exercé par le système endocannabinoïde sur l'inflammation intestinale.^{22,24,25,26} Le système endocannabinoïde apparaît donc comme une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement des MICI.²⁷

¹⁹ Ghosh, S.; Panaccione, R.; Anti-adhesion molecule therapy for inflammatory bowel disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **2010**, *3*, 239 - 258.

²⁰ Ciccocioppo, R.; Bernardo, M. E.; Sgarella, A.; Maccario, R.; Avanzini, M. A.; Ubezio, C.; Minelli, A.; Alvisi, C.; Vanoli, A.; Calliada, F.; Dionigi, P.; Perotti, C.; Locatelli, F.; Corazza, G. R. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut* **2011**, *60*, 788 - 798.

²¹ Di Marzo, V.; Izzo, A. A. Endocannabinoid overactivity and intestinal inflammation. *Gut* **2006**, *55*, 1373 - 1376.

²² Wright, K.; Rooney, N.; Feeney, M.; Tate, J.; Robertson, D.; Welham, M.; Ward, S. Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* **2005**, *129*, 437 - 453.

²³ Marquez, L.; Suarez, J.; Iglesias, M.; Bermudez-Silva, F. J.; Rodriguez de Fonseca, F.; Andreu, M. Ulcerative colitis induces changes on the expression of the endocannabinoid system in the human colonic tissue. *PLoS One* **2009**, *4*, e6893

²⁴ Engel, M. A.; Kellermann, C. A.; Rau, T.; Burnat, G.; Hahn, E. G.; Konturek, P. C. Ulcerative colitis in AKR mice is attenuated by intraperitoneally administered anandamide. *J. Physiol. Pharmacol.* **2008**, *59*, 673 - 689.

²⁵ Di Sabatino, A.; Battista, N.; Biancheri, P.; Rapino, C.; Rovedatti, L.; Astarita, G.; Vanoli, A.; Dainese, E.; Guerci, M.; Piomelli, D.; Pender, S. L.; MacDonald, T. T.; Maccarrone, M.; Corazza, G. R. The endogenous cannabinoid system in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol.* **2011**, *4*, 574 - 583.

²⁶ Storr, M. A.; Keenan, C. M.; Zhang, H.; Patel, K. D.; Makriyannis, A.; Sharkey, K. A. Activation of the cannabinoid 2 receptor (CB2) protects against experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15*, 1678 - 1685.

²⁷ Alhouayek, M.; Muccioli, G. G. The endocannabinoid system in inflammatory bowel diseases : from pathophysiology to therapeutic opportunity. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 615 - 625.

II. Le système endocannabinoïde

Le cannabis, appelé également la « plante aux deux visages » ou chanvre indien, est l'une des plus anciennes plantes cultivées par l'Homme. A l'origine, sa culture s'étendait de l'Asie centrale à la Chine. Ses fibres étaient utilisées pour la fabrication de papiers, de cordages et de tissus. Alors que sa résine s'utilisait comme médication pour soulager les crampes, les spasmes, les troubles du sommeil et les douleurs.²⁸ Le cannabis était aussi largement utilisé dans des rites religieux, où les pouvoirs hallucinogènes et enivrants de celui-ci étaient recherchés. Mais ce n'est qu'au début du XIX^{ème} siècle que les soldats de Napoléon Bonaparte et des médecins anglais de retour des Indes vont ramener le cannabis en Europe.

Le cannabis contient plus de 489 substances chimiques connues, dont plus de 70 représentent les cannabinoïdes.²⁹ C'est en 1964 que Gaoni et Mechoulam ont identifié (-)- Δ^9 -tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, cf. figure 5) comme étant le principal composé psychoactif du cannabis.³⁰

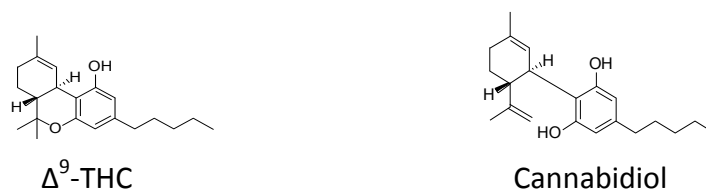


Figure 5. Structure chimique du Δ^9 -THC et du Cannabidiol

Aujourd'hui, les Etats-Unis et le Canada prescrivent deux préparations à base de cannabis, le dronabinol (Marinol[®]) et le nabilone (Césamet[®]), dans les cas de nausées et vomissements engendrés par une chimiothérapie et chez les malades atteints du SIDA afin de stimuler leur appétit. Le Sativex[®], dont les principes actifs sont le Δ^9 -THC et le cannabidiol (cf. figure 5), a reçu une AMM en 2005 au Canada et 2010 en Grande-Bretagne pour le traitement des douleurs neuropathiques résistantes chez les personnes atteintes de sclérose en plaques.

²⁸ Lambert, D. M. Les vertus thérapeutiques du cannabis à travers les millénaires. *J. Pharm. Belg.* **2002**, 57, 21 - 29

²⁹ Elsohly, M. A.; Slade, D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* **2005**, 78, 539 - 548.

³⁰ Gaoni, Y.; Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 1647 - 1657.

Ce spray oral s'est révélé être une bonne alternative à la consommation de cannabis *via* des cigarettes, qui à long terme peut provoquer des cancers des poumons.

En France, l'utilisation des dérivés de cannabis à visée thérapeutique est, à ce jour, interdite par décret. Cependant dernièrement, le décret n° 2013-473 du 5 juin 2013, paru le 7 juin 2013 au Journal Officiel, autorise l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) à examiner les demandes de mise sur le marché de médicaments à base de cannabis.³¹

Le Δ^9 -THC se lie à un récepteur membranaire appelé CB₁. Ce récepteur a été mis en évidence en 1988 au niveau du cerveau de rat³² et a été cloné en 1990 par Matsuda *et al.*³³ Ces études ont permis de rapidement mettre en évidence un deuxième récepteur membranaire aux cannabinoïdes, le récepteur CB₂ cloné en 1993.³⁴ Les récepteurs CB₁ et CB₂ possèdent en plus du Δ^9 -THC, des ligands endogènes, appelés endocannabinoïdes. Ce sont ces récepteurs ainsi que les ligands associés qui forment le système endocannabinoïde.

1. Les récepteurs aux cannabinoïdes

Deux récepteurs aux cannabinoïdes (CB₁ et CB₂) ont été identifiés et clonés, à ce jour, dans les tissus de mammifères. Cependant, il a récemment été montré que certains ligands endogènes des récepteurs aux cannabinoïdes se lient à des récepteurs orphelins appelés GPR55^{35,36} et GPR119³⁷ qui ne présentent que peu d'homologie avec les récepteurs CB₁ et CB₂. Le récepteur GPR55 est couplé à la sous-unité G_{α13} et peut moduler l'activation de rhoA, cdc42 et rac1.

³¹ Décret n° 2013-473 du 5 juin 2013 modifiant en ce qui concerne les spécialités pharmaceutiques les dispositions de l'article R. 5132-86 du code de la santé publique relatives à l'interdiction d'opérations portant sur le cannabis ou ses dérivés. *Journal Officiel de la République Française n°0130. 7 juin 2013*, p. 9469.

³² Devane, W.A.; Dysarz, F. A. 3rd.; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; Howlett, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 605 - 613.

³³ Matsuda, L. A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C.; Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **1990**, *346*, 561 - 564.

³⁴ Munro, S.; Thomas, K. L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. **1993**, *365*, 61 - 65.

³⁵ Pertwee, R. G. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 984 - 986.

³⁶ Ryberg, E.; Larsson, N.; Sjögren, S.; Hjorth, S.; Hermansson, N. O.; Leonova, J.; Elebring, T.; Nilsson, K.; Drmota, T.; Greasley, P. J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 1092 - 1101.

³⁷ Hansen K. B.; Rosenkilde, M. M.; Knop, F. K.; Wellner, N.; Diep, T. A.; Rehfeld, J. F.; Andersen, U. B.; Holst, J. J.; Hansen, H. S. 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 1409 - 1417.

Plusieurs auteurs ont décrit le récepteur GPR55 comme étant un nouveau récepteur aux cannabinoïdes, mais selon d'autres rien ne permet réellement de l'affirmer.^{38,39} En effet, des cannabinoïdes atypiques non-CB₁ et non-CB₂ (comme le cannabidiol ou l'O-1602, cf. figures 5 et 6) ont présenté un effet vasodilatateur^{40,41} et induisent une baisse de la pression sanguine⁴² *via* un récepteur aux cannabinoïdes encore inconnu à ce jour. Une publication récente a montré que le récepteur GPR55 est activé par ces cannabinoïdes atypiques mais n'entraîne pas d'effet vasodilatateur.⁴³ Au contraire, GPR55 n'est pas stimulé par le WIN-55,212-2 (cf. figure 6), un agoniste des récepteurs CB₁ et CB₂.⁴⁴ Toutes ces études suggèrent alors l'existence d'un troisième récepteur aux cannabinoïdes, autre que le GPR55.

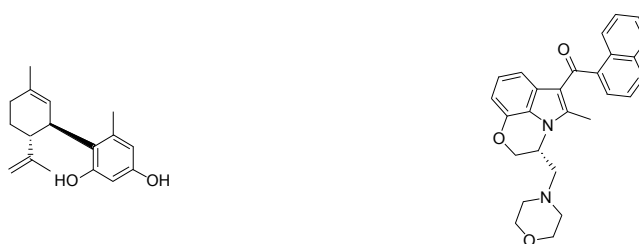


Figure 6. Structures chimiques de l'O-1602 (à gauche) et du R-(+)-WIN55,212-2 (à droite)

a. Le récepteur CB₁

i. Structure

Le récepteur CB₁ fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) à sept hélices transmembranaires (cf. figure 7). Il est encodé par le gène *CNR1* et se compose de 472 acides aminés.⁴⁵ La séquence du récepteur CB₁ est assez bien conservée entre les espèces. Par exemple, le récepteur CB₁ humain présente 97 % d'homologie avec le récepteur de souris (100 % lorsque l'on compare les régions transmembranaires).

³⁸ Petitet, F.; Donlan, M.; Michel, A. GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 252 - 253.

³⁹ Godlewski, G.; Offertaler, L.; Wagner, J. A.; Kunos, G. Receptors for acylethanolamides – GPR55 and GPR119. *Prostaglandins & other Lipid Mediators.* **2009**, *89*, 105 - 111.

⁴⁰ Gong, J. P.; Onaivi, E. S.; Ishiguro, H.; Liu, Q. R.; Tagliaferro, P. A.; Brusco, A.; Uhl, G. R. Cannabinoid CB2 receptors : Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* **2006**, *1071*, 10 - 23.

⁴¹ Wagner, J. A.; Varga, K.; Jarai, Z.; Kunos, G. Mesenteric vasodilatation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension* **1999**, *33*, 429 - 434.

⁴² Adams, M. D.; Earnhardt, J. T.; Martin, B. R.; Harris, L. S.; Dewey, W. L.; Razdan, R. K. A cannabinoid with cardiovascular activity but no overt behavioral effects. *Experientia* **1977**, *33*, 1204 - 1205.

⁴³ Johns, D. G.; Behm, D. J.; Walker, D. J.; Ao, Z.; Shapland, E. M.; Daniels, D. A.; Riddick, M.; Dowell, S.; Staton, P. C.; Green, P.; Shabon, U.; Bao, W.; Aiyar, N.; Yue, T. L.; Brown, A. J.; Morisson, A. D.; Douglas, S. A. The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 825 - 831.

⁴⁴ Felder, C. C.; Joyce, K. E.; Briley, E. M.; Mansouri, J.; Mackie, K.; Blond, O.; Lai, Y.; Ma, A. L.; Mitchell, R. L. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 443 - 450.

⁴⁵ Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C.; Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **1990**, *346*, 561 - 564.

ii. Distribution

Le récepteur CB₁ se situe principalement au niveau du système nerveux central où il est l'un des récepteurs les plus abondants.^{51,52} La localisation centrale du récepteur CB₁ est remarquablement corrélée avec les effets comportementaux des cannabinoïdes sur la mémoire, la cognition et les fonctions motrices. Il se retrouve notamment dans l'hippocampe, le cervelet et le striatum.⁵³ Mais le récepteur CB₁ a également été mis en évidence dans les tissus périphériques, notamment au niveau de l'appareil génito-urinaire (reins, placenta, prostate, testicules, utérus), du tractus gastro-intestinal (iléum, foie, pancréas, estomac), du tissu adipeux et dans les muscles squelettiques.^{54,55,56} Enfin, ce récepteur est aussi présent à de très faibles concentrations dans le système immunitaire.⁵⁷ On remarque également une quasi-absence de ce récepteur au niveau des centres de contrôle cardiovasculaire et respiratoire, ce qui explique l'absence de toxicité aiguë du cannabis envers les fonctions vitales.

iii. Les agonistes du récepteur CB₁

Actuellement, la recherche sur la conception d'agonistes du récepteur CB₁ est encore assez limitée. En effet, le Δ^9 -THC et d'autres agonistes du récepteur CB₁ passant la barrière hémato-encéphalique (BHE) possèdent des effets centraux inacceptables pour une commercialisation future, comme des effets psychotropes, des effets sédatifs et cataleptiques.

⁵¹ Breivogel, C. S.; Childers, S. R. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptor. *Neurobiol. Dis.*, **1998**, *5*, 417 - 431.

⁵² Zimmer, A.; Zimmer, A. M.; Hohmann, A. G.; Herkenham, M.; Bonner, T. I. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB₁ receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 5780 - 5785.

⁵³ Galiègue, S.; Mary, S.; Marchand, J.; Dussossoy, D.; Carrière, D.; Carayon, P.; Bouaboula, M.; Shire, D.; Le Fur, G.; Casellas, P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *232*, 54 - 61.

⁵⁴ Wagner, J. A.; Jarai, Z.; Batkai, S.; Kunos, G. Hemodynamic effects of cannabinoids : coronary and cerebral vasodilatation mediated by CB₁ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *423*, 203 - 210.

⁵⁵ Pertwee, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *74*, 129 - 180.

⁵⁶ Di Marzo, V.; Bifulco, M.; De Petrocellis, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 771 - 784.

⁵⁷ Pacher, P.; Batkai, S.; Kunos, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 389 - 462.

Parmi les agonistes de synthèse du récepteur CB₁, nous retrouvons des analogues du Δ⁹-THC, comme l'AM411,⁵⁸ l'AM4030⁵⁹ et l'HU-210 (cf. figure 8).⁶⁰ Ensuite, des analogues de l'anandamide ou *N*-arachidonoyléthanolamide (AEA), ligand endogène du récepteur, ont été synthétisés. L'un de ces analogues de l'AEA, le plus rapporté, est l'arachidonylcyclopropylamide (ACPA, cf. figure 8).⁶¹

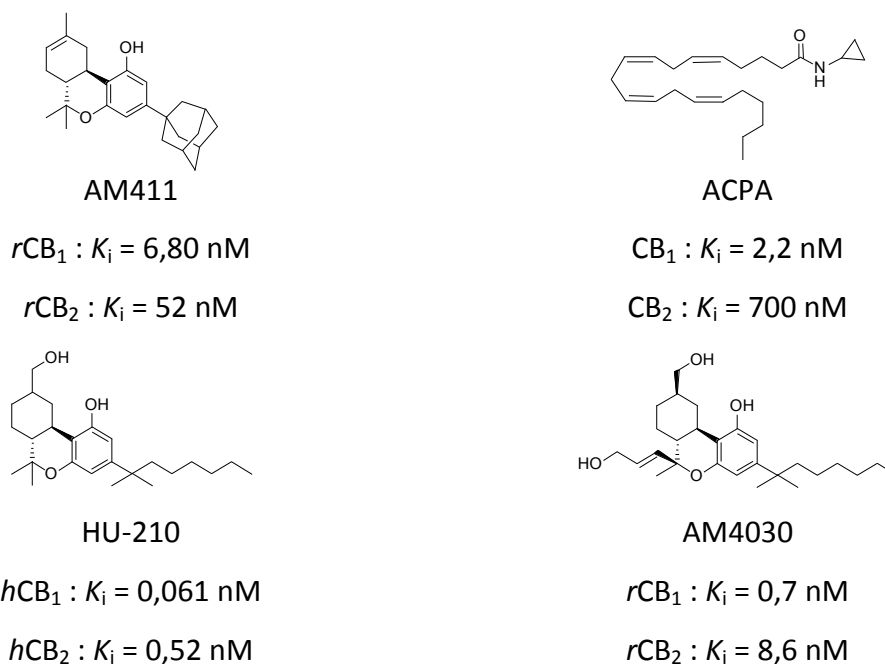


Figure 8. Structures de la première génération d'agonistes du récepteur CB₁

L'ACPA a une sélectivité marquée pour le récepteur CB₁ par rapport au récepteur CB₂, contrairement à l'AM411, l'AM4030 et l'HU-210 qui possèdent une affinité de l'ordre du nanomolaire pour le récepteur CB₂.

Récemment, plusieurs brevets ont été déposés par des firmes pharmaceutiques (cf. figure 9) comme Solvay Pharmaceuticals,⁶² Astra-Zeneca⁶³ ou Pfizer.⁶⁴

⁵⁸ Lu, D.; Meng, Z.; Thakur, G. A.; Fan, P.; Steed, J.; Tartal, C. L.; Hurst, D. P.; Reggio, P. H.; Deschamps, J. R.; Parrish, D. A.; George, C.; Järbe, T. U.; Lamb, R. J.; Makriyannis, A. Adamantyl cannabinoids: a novel class of cannabinergic ligands. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4576 - 4585.

⁵⁹ Tius, M. A.; Hill, W. A.; Zou, X. L.; Busch-Petersen, J.; Kawakami, J. K.; Fernandez-Garcia, M. C.; Drake, D. J.; Abadji, V.; Makriyannis, A. Classical/non-classical cannabinoid hybrids; stereochemical requirements for the southern hydroxyalkyl chain. *Life Sciences* **1995**, *56*, 2007 - 2012.

⁶⁰ Mechoulam, R.; Feigenbaum, J. J.; Lander, N.; Segal, M.; Järbe, T. U.; Hiltunen, A. J.; Consroe, P. Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity. *Experientia* **1988**, *44*, 762 - 764.

⁶¹ Hillard, C. J.; Manna, S.; Greenberg, M. J.; DiCamelli, R.; Ross, R. A.; Stevenson, L. A.; Murphy, V.; Pertwee, R. G.; Campbell, W. B. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 1427 - 1433.

⁶² Lange, J. H. M.; Zilaout, H.; Van Vliet, B. J. Preparation of 4,5-dihydro-1H-pyrazoles as cannabinoid CB1 receptor agonists. **2009**, WO2009037244.

Les applications majeures visées par ces brevets sont la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer, différents types de douleur (chronique, neuropathique,...) et l'ischémie cérébrale.

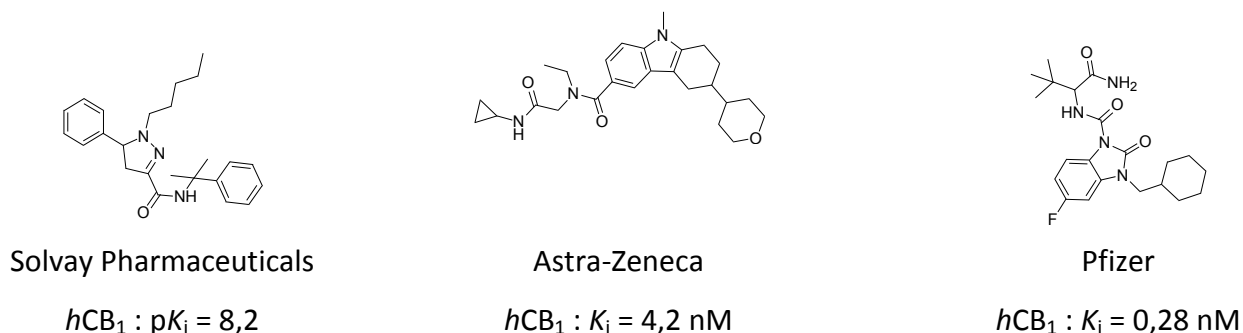


Figure 9. Structures d'agonistes CB_1 récemment brevetés

iv. Les antagonistes / agonistes inverses du récepteur CB_1

Dans le langage courant, un « agoniste inverse » est décrit comme un composé capable de se lier au site de liaison d'un agoniste du récepteur et d'exercer les effets intracellulaires directement opposés à ceux de l'agoniste. Ceci s'expliquerait par la coexistence, à l'état d'équilibre, de différentes formes du récepteur, soit « pré-couplé » soit « non-couplé » à la protéine G. Les agonistes inverses ont une préférence pour la forme « non-couplée » à la protéine G et déplacent donc l'équilibre loin de la conformation « active » du récepteur, ceci même en présence d'un agoniste du récepteur.

Un antagoniste « neutre », au contraire, ne montrerait aucune préférence pour l'une ou l'autre conformation. Il empêche tout simplement la liaison de l'agoniste et n'entraîne aucun effet biologique intracellulaire imputable au récepteur. Cependant, à fortes concentrations d'agonistes endogènes, des effets intracellulaires opposés à ceux des agonistes peuvent être observés.

⁶³ Beha, S.; Brown, W.; Johnstone, S.; Liu, Z.; Page, D.; Tomaszewski, M.; Wei, Z. Y.; Yue, S. Y. Preparation of substituted tetrahydrocarbazole for use as analgesics. **2009**, WO2009024819.

⁶⁴ Ando, K.; Buchler, I. P.; Hedge, S. G.; Kawai, M.; Masuda, T.; Omura, H. Benzimidazolone derivatives and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of CB_1 and CB_2 receptor mediated diseases. **2008**, WO2008032164.

Ainsi, dans le domaine des cannabinoïdes, il est très difficile de déterminer *in vivo* le caractère agoniste inverse ou antagoniste neutre d'un composé, étant donné que les taux d'endocannabinoïdes (ECs) peuvent fortement augmenter par la nature même du modèle animal.⁶⁵

Parmi les antagonistes / agonistes inverses⁶⁶ sélectifs du récepteur, se trouve le Rimonabant (Acomplia®) ou SR141716A,⁶⁷ l'AM251 (directement inspiré du SR141716A),⁶⁸ et le LY320135 (cf. figure 10),⁶⁹ pour les plus représentatifs. Ces composés conduisent logiquement à la production d'effets cannabinomimétiques inverses.

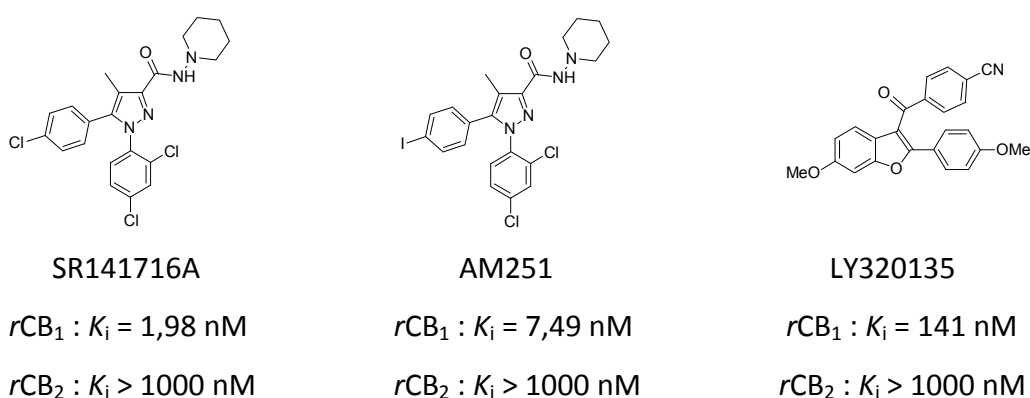


Figure 10. Structures chimiques d'antagonistes / agonistes inverses sélectifs du récepteur CB₁

Des antagonistes « neutres » ont également été décrits, parmi lesquels l'O-2050 (cf. figure 11)⁷⁰ et l'AM4113 (CB₁ : K_i = 0,8 nM ; CB₂ : K_i = 97 nM ; structure non dévoilée).⁷¹ Ces antagonistes « neutres » ont montré des effets anorexiques et « coupe-faim » sur modèles murins.⁶⁵

⁶⁵ Silvestri, C.; Di Marzo, V.; Second generation CB1 receptor blockers and other inhibitors of peripheral endocannabinoid overactivity and the rationale of their use against metabolic disorders. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21*, 1309 - 1322.

⁶⁶ Pertwee, R. G. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci.* **2005**, *76*, 1307 - 1324.

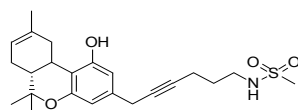
⁶⁷ Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Héaulme, M.; Shire, D.; Calandra, B.; Congy, C.; Martinez, S.; Maruani, J.; Néliat, G.; Caput, D. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* **1994**, *350*, 240 - 244.

⁶⁸ Gatley, S. J.; Gifford, A. N.; Volkow, N. D.; Lan, R.; Makriyannis, A. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol.* **1996**, *307*, 331 - 338.

⁶⁹ Felder, C. C.; Joyce, K. E.; Briley, E. M.; Glass, M.; Mackie, K. P.; Fahey, K. J.; Cullinan, G. J.; Hunden, D. C.; Johnson, D. W.; Chaney, M. O.; Koppel, G. A.; Brownstein, M. LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *284*, 291 - 297.

⁷⁰ Wiley, J. L.; Breivogel, C. S.; Mahadevan, A.; Pertwee, R. G.; Cascio, M. G.; Bolognini, D.; Huffman, J. W.; Walentiny, D. M.; Vann, R. E.; Razdan, R. K.; Martin, B. R. Structural and pharmacological analysis of O-2050, a putative neutral cannabinoid CB(1) receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *651*, 96 - 105.

⁷¹ Chambers, A. P.; Vemuri, V. K.; Peng, Y.; Wood, J. T.; Olszewska, T.; Pittman, Q. J.; Makriyannis, A.; Sharkey, K. A. A neutral CB1 receptor antagonist reduces weight gain in rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *293*, 2185 - 2193.



O-2050

$rCB_1 : K_i = 2,5 \text{ nM}$

$rCB_2 : K_i = 0,2 \text{ nM}$

Figure 11. Structure chimique de l'antagoniste neutre O-2050

b. Le récepteur CB₂

i. Structure

Deuxième récepteur aux cannabinoïdes, le récepteur CB₂ a été isolé en 1993 à partir de cellules leucémiques humaines HL-60.³⁴ Comme le récepteur CB₁, le récepteur CB₂ appartient à la famille des RCPG à sept domaines transmembranaires (*cf.* figure 12). Il possède 360 acides aminés chez l'Homme, est encodé par le gène *CNR2*⁷² et présente 44 % d'homologie avec le récepteur CB₁ au niveau de la séquence totale d'acides aminés. Ce pourcentage passe à 68 % lorsque l'on compare les régions transmembranaires.⁷³

Contrairement au récepteur CB₁, le récepteur CB₂ n'est pas très bien conservé entre les espèces. Le récepteur CB₂ de souris est constitué de 347 acides aminés et présente 82 % d'homologie avec le récepteur humain.

Comme pour le récepteur CB₁, la représentation tridimensionnelle du récepteur CB₂ humain est principalement basée sur des comparaisons avec la structure de la rhodopsine bovine. Un model théorique du récepteur humain CB₂ basé sur les coordonnées du récepteur β_2 adrénergique a également été décrit.⁷⁴

⁷² Howlett, A. C. In: Cannabinoids. Handbook of Experimental Pharmacology; Pertwee, Ed., Springer-Verlag: Heidelberg, Germany, **2005**, 168, 53 - 79.

⁷³ Howlett, A. C.; Barth, F.; Bonner, T. I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W. A.; Felder, C. C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B. R.; Mechoulam, R.; Pertwee, R. G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* **2002**, 54, 161 - 202.

⁷⁴ Cichero, E.; Ligresti, A.; Allarà, M.; di Marzo, V.; Lazzati, Z.; D'Ursi, P.; Marabotti, A.; Milanesi, L.; Spallarossa, A.; Ranise, A.; Fossa, P. Homology modeling in tandem with 3D-QSAR analyses: A computational approach to depict the agonist binding site of the human CB₂ receptor. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 4489 - 4505.

De plus, la spectroscopie RMN 3D hétéro-nucléaire, ainsi que des analyses de dichroïsme circulaire et dynamique moléculaire, ont été récemment utilisées pour déterminer expérimentalement la structure de fragments du récepteur CB₂.^{75,76,77,78}

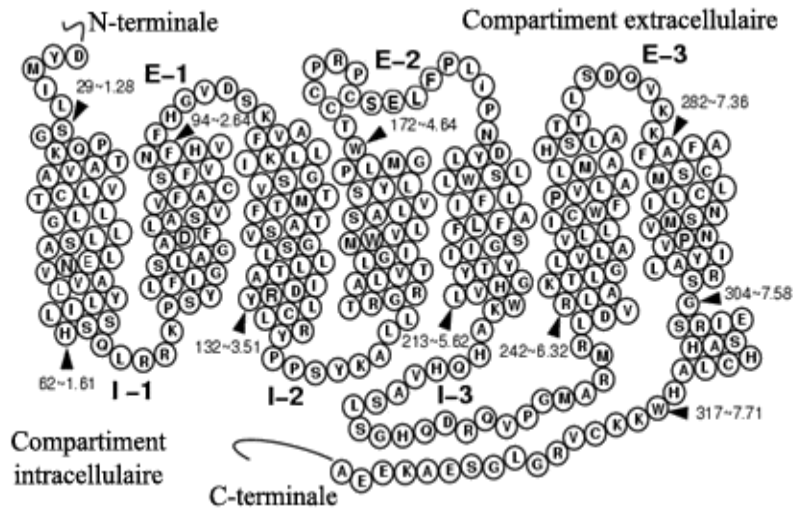


Figure 12. Structure 2D du récepteur CB₂

Des études de docking comparant les récepteurs aux cannabinoïdes à d'autres RCPG ont montré que CB₁ et CB₂ présentaient des différences vis-à-vis des autres RCPG au niveau de l'hélice 5 (absence d'une proline conservée par la totalité des RCPG, présence de ponts disulfures).⁷⁹ Ces mêmes études ont également montré que le récepteur CB₂ différait de son homologue CB₁ par une partie N-terminale plus courte, sa deuxième boucle extracellulaire et sa partie C-terminale.

Une étude de mutagenèse dirigée a permis d'expliquer la sélectivité d'un ligand vis-à-vis de l'un ou l'autre des récepteurs.⁸⁰

⁷⁵ Zhao, J.; Zheng, H.; Xie, X. Q. NMR characterization of recombinant transmembrane protein CB2 fragment CB2(180-233). *Protein Pept. Lett.* **2006**, *13*, 335 - 342

⁷⁶ Zhang, Y.; Xie, X. Q. Biosynthesis, purification, and characterization of a cannabinoid receptor 2 fragment (CB2(271-326)). *Protein Expr. Purif.* **2008**, *59*, 249 - 257.

⁷⁷ Choi, G.; Landin, J.; Xie, X. Q. The cytoplasmic helix of cannabinoid receptor CB2, a conformational study by circular dichroism and (1)H NMR spectroscopy in aqueous and membrane-like environments. *J. Pept. Res.* **2002**, *60*, 169 - 177.

⁷⁸ Zheng, H.; Zhao, J.; Sheng, W.; Xie, X. Q. A transmembrane helix-bundle from G-protein coupled receptor CB2: biosynthesis, purification, and NMR characterization. *Biopolymers* **2006**, *83*, 46 - 61.

⁷⁹ Montero, C.; Campillo, N. E.; Goya, P.; Paez, J. A. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 75 - 83.

⁸⁰ Song, Z. H.; Slowey, C. A.; Hurst, D. P.; Reggio, P. H. The difference between CB1 and CB2 cannabinoid receptors at position 5.46 is crucial for the selectivity of WIN55212-2 for CB2. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 834 - 840.

Ainsi les interactions des ligands avec les résidus, sérine 3.31 et phénylalanine 5.46, du récepteur CB₂ semblent déterminer les différences de sélectivité entre CB₁ et CB₂.⁸¹ Les groupes lipophiles interagissent avec le résidu phénylalanine 5.46, leur permettant de former une liaison hydrogène avec la sérine 3.31. Ces interactions induisent un changement conformationnel de la structure du récepteur CB₂, activant par la suite plusieurs cascades biologiques intracellulaires. Cependant, d'autres recherches sont encore nécessaires pour déterminer le mécanisme moléculaire exact de la voie de signalisation intracellulaire.

ii. Distribution

Les récepteurs CB₂ se situent principalement dans les cellules associées au système immunitaire, comme les leucocytes, les lymphocytes B et T ou les macrophages, à bien plus grande concentration que les récepteurs CB₁,⁸² mais ils sont faiblement exprimés dans les cellules immunitaires non-activées. Leur localisation suggère leur implication dans les effets immunomodulateurs induits par les cannabinoïdes, comme la migration des cellules immunitaires et la modulation de la libération de cytokines.

Contrairement à ce qui avait été envisagé initialement soit l'absence du récepteur CB₂ au niveau du système nerveux central (SNC),⁸³ des études en 2006 ont mis en évidence la présence du récepteur CB₂ dans des cellules neuronales en culture ainsi qu'au sein du SNC humain, de rongeurs et de singes dans des conditions normales (microglies, astrocytes et vaisseaux sanguins).^{84,85,86} Par ailleurs, au début de l'inflammation, le récepteur CB₂ est surexprimé dans le SNC et les tissus périphériques.⁸⁷ Le gène *CNR2* a même été retrouvé dans des tissus tels que la rate, les amygdales, la prostate et le thymus.^{88,89}

⁸¹ Tuccinardi, T.; Ferrarini, P. L.; Manera, C.; Ortore, G.; Saccomanni, G.; Martinelli, A. Cannabinoid CB₂/CB₁ selectivity. Receptor modeling and automated docking analysis. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 984 - 994.

⁸² Klein, T. W.; Newton, C. A.; Friedman, H. Cannabinoids and the immune system. *Pain Res. Manag.* **2001**, *6*, 95 - 101.

⁸³ Lynn, A. B.; Herkenham, M. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *268*, 1612 - 1623.

⁸⁴ Ashton, J. C.; Friberg, D.; Darlington, C. L.; Smith, P. F. Expression of the cannabinoid CB₂ receptor in the rat cerebellum: An immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* **2006**, *396*, 113 - 116.

⁸⁵ Van Sickle, M. D.; Duncan, M.; Kingsley, P. J.; Mouihate, A.; Urbani, P.; Mackie, K.; Stella, N.; Makriyannis, A.; Piomelli, D.; Davison, J. S.; Marnett, L. J.; Di Marzo, V.; Pittman, Q. J.; Patel, K. D.; Sharkey, K. A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science* **2005**, *310*, 329 - 332.

⁸⁶ Gong, J. P.; Onaivi, E. S.; Ishiguro, H.; Liu, Q. R.; Tagliaferro, P. A.; Brusco, A.; Uhl, G. R. Cannabinoid CB₂ receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* **2006**, *1071*, 10 - 23.

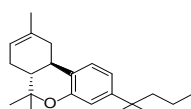
⁸⁷ Guindon, J.; Hohmann, A. G. Cannabinoid CB₂ receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 319 - 334.

⁸⁸ Berdyshev, E. V. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem. Phys. Lipids.* **2000**, *108*, 169 - 190.

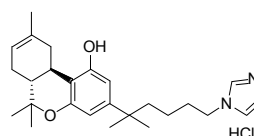
iii. Les agonistes du récepteur CB₂

Ces dernières années ont vu croître l'intérêt de développer des ligands sélectifs du récepteur CB₂, du fait du large spectre thérapeutique concerné par ces ligands (sclérose en plaques, douleurs, inflammation,...). D'un point de vue structural, les ligands les plus récents diffèrent énormément des agonistes du récepteurs CB₂ de première génération (cannabinoïdes classiques et non classiques analogues du Δ^9 -THC) et des endocannabinoïdes, rendant difficile la comparaison entre séries et la proposition d'un pharmacophore général de ligand sélectif CB₂. Aussi, compte-tenu du nombre important d'agonistes du récepteur CB₂ relatés dans la littérature, seuls les agonistes CB₂ de référence ainsi que quelques composés brevetés dernièrement seront répertoriés dans cette partie.

Certaines modifications structurales des ligands de première génération, comme l'HU-210 (cf. figure 8), ont permis d'obtenir des composés présentant une meilleure sélectivité pour le récepteur CB₂. Ainsi, la perte des hydroxyles phénoliques du HU-210 a conduit à la découverte de l'un des agonistes sélectifs les plus utilisés : le JWH133 (cf. figure 13).⁹⁰ Un autre analogue de l'HU-210, l'O-2545 (cf. figure 13), a été le premier cannabinoïde soluble dans l'eau avec une affinité de 0,32 nM pour le récepteur CB₂.⁹¹



JWH133

 $hCB_2 : K_i = 3,4 \text{ nM}$ $rCB_1 : K_i = 677 \text{ nM}$ 

O-2545

 $choCB_2 : K_i = 0,32 \text{ nM}$ $choCB_1 : K_i = 1,5 \text{ nM}$

Figure 13. Structures chimiques des agonistes sélectifs JWH133 et O-2545

La famille des aminoalkylindoles (AAI) regroupe les premiers agonistes CB₂ présentant des structures différentes de celles des cannabinoïdes classiques.

⁸⁹ Sarfaraz, S.; Afaq, F.; Adhami, V. M.; Mukthar, H. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1635 - 1641

⁹⁰ Huffman, J. W.; Liddle, J.; Yu, S.; Aung, M. M.; Abood, M. E.; Wiley, J. L.; Martin, B. R. 3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy-delta8-THC and related composés: synthesis of selective ligands for the CB2 receptor. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2905 - 2914.

⁹¹ Martin, B. R.; Wiley, J. L.; Beletskaya, I.; Sim-Selley, L. J.; Smith, F. L.; Dewey, W. L.; Cottney, J.; Adams, J.; Baker, J.; Hill, D.; Saha, B.; Zerkowski, J.; Mahadevan, A.; Razdan, R. K. Pharmacological characterization of novel water-soluble cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther.* **2006**, *318*, 1230 - 1239.

Ainsi, les premiers composés de cette famille étaient des dérivés de la pravadoline (*cf.* figure 14), un AINS, et présentaient des effets antinociceptifs liés à leur interaction avec les récepteurs aux cannabinoïdes.⁹² Le *R*-(+)-WIN-55-212,2 est de loin le plus étudié de cette famille (*cf.* figure 14).⁹³ Il présente une très bonne affinité pour le récepteur CB₂, mais également pour le récepteur CB₁. Des modifications du *R*-(+)-WIN-55-212,2 ont abouti à de nombreux dérivés, comme le JWH015 (*cf.* figure 14), un agoniste sélectif CB₂.^{94,95}

Des chercheurs de l'Université du Connecticut ont également synthétisé des dérivés indoliques comme l'AM1241 (*cf.* figure 14) qui est actuellement l'agoniste sélectif CB₂ de cette famille le plus utilisé en pharmacologie.⁹⁶

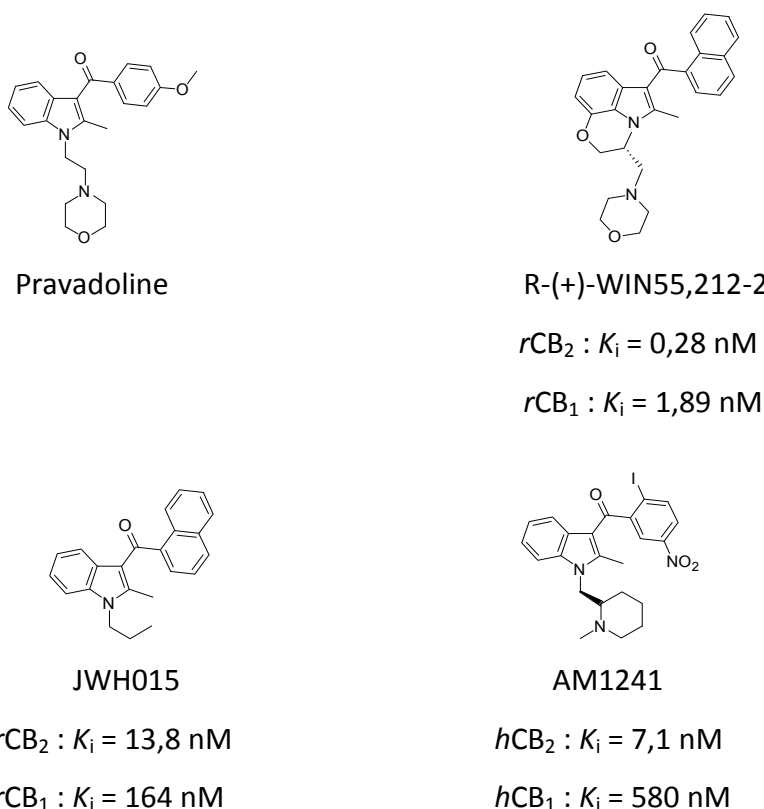


Figure 14. Structures chimiques d'aminoalkylindoles

⁹² D'Ambra, T. E.; Estep, K. G.; Bell, M. R.; Eissenstat, M. A.; Josef, K. A.; Ward, S. J.; Haycock, D. A.; Baizman, E. R.; Casiano, F. M.; Beglin, N. C.; Chippari, S. M.; Grego, J. D.; Kullnig, R. K.; Daley, G. T. Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 124 - 135.

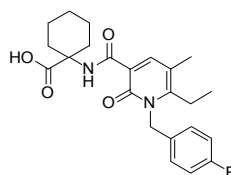
⁹³ Showalter, V. M.; Compton, D. R.; Martin, B. R.; Abood, M. E. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB₂): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *278*, 989 - 999.

⁹⁴ Huffman, J. W.; Dai, D.; Martin, B. R.; Compton, D. R. Design, Synthesis and Pharmacology of Cannabimimetic Indoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 563 - 566.

⁹⁵ Wiley, J. L.; Compton, D. R.; Dai, D.; Lainton, J. A.; Phillips, M.; Huffman, J. W.; Martin, B. R. Structure-activity relationships of indole- and pyrrole-derived cannabinoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *285*, 995 - 1004.

⁹⁶ Yao, B. B.; Mukherjee, S.; Fan, Y.; Garrison, T. R.; Daza, A. V.; Grayson, G. K.; Hooker, B. A.; Dart, M. J.; Sullivan, J. P.; Meyer, M. D. In vitro pharmacological characterization of AM1241: a protean agonist at the cannabinoid CB₂ receptor? *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149*, 145 - 154.

L'entreprise japonaise Shionogi a déposé plusieurs brevets décrivant des ligands sélectifs du récepteur CB₂ basés autour du motif 2-pyridone. Un de ces ligands, le S-777469 (cf. figure 15) est notamment en phase II des essais cliniques dans le traitement de la dermatite atopique et le prurit.⁹⁷



S-777469

$hCB_2 : K_i = 36 \text{ nM}$

$hCB_1 : K_i = 4607 \text{ nM}$

Figure 15. Structure chimique du S-777469⁹⁸

Des chercheurs de GlaxoSmithKline se sont également lancés dans le développement d'agonistes sélectifs CB₂.⁹⁹ Ainsi, le GW-842166X a montré une affinité modérée de 63 nM⁹⁹ à 2000 nM¹⁰⁰ pour le récepteur hCB_2 et aucune affinité pour le récepteur hCB_1 n'a été décelée. Le GW-842166X est actuellement en essais cliniques dans différents modèles de douleurs.¹⁰¹ Parallèlement, le GRC-10693 (Glenmark)¹⁰² a été développé dans le traitement de la douleur inflammatoire (phase II) et le KN-38-7271 (KeyNeurotek)¹⁰³ dans le traitement des traumatismes cérébraux et de l'AVC (cf. figure 16).

⁹⁷ Karsak, M.; Gaffal, E.; Date, R.; Wang-Eckhardt, L.; Rehnelt, J.; Petrosino, S.; Starowicz, K.; Steuder, R.; Schlicker, E.; Cravatt, B.; Mechoulam, R.; Buettner, R.; Werner, S.; Di Marzo, V.; Tüting, T.; Zimmer, A. Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science* **2007**, *316*, 1494 - 1497.

⁹⁸ Odan, M.; Ishizuka, N.; Hiramatsu, Y.; Inagaki, M.; Hashizume, H.; Fujii, Y.; Mitsumori, S.; Morioka, Y.; Soga, M.; Deguchi, M.; Yasui, K.; Arimura, A. Discovery of S-777469: an orally available CB₂ agonist as an antipruritic agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2803 - 2806.

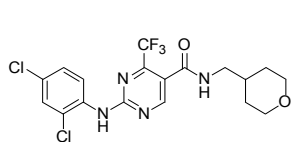
⁹⁹ Giblin, G. M.; O'Shaughnessy, C. T.; Naylor, A.; Mitchell, W. L.; Eatherton, A. J.; Slingsby, B. P.; Rawlings, D. A.; Goldsmith, P.; Brown, A. J.; Haslam, C. P.; Clayton, N. M.; Wilson, A. W.; Chessell, I. P.; Wittington, A. R.; Green, R. Discovery of 2-[(2,4-dichlorophenyl)amino]-N-[(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)methyl]-4-(trifluoromethyl)-5-pyrimidinecarboxamide, a selective CB₂ receptor agonist for the treatment of inflammatory pain. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2597 - 2600.

¹⁰⁰ Yao, B. B.; Hsieh, G. C.; Frost, J. M.; Fan, Y.; Garrison, T. R.; Daza, A. V.; Grayson, G. K.; Zhu, C. Z.; Pai, M.; Chandran, P.; Salyers, A. K.; Wensink, E. J.; Honore, P.; Sullivan, J. P.; Dart, M. J.; Meyer, M. D. In vitro and in vivo characterization of A-796260: a selective cannabinoid CB₂ receptor agonist exhibiting analgesic activity in rodent pain models. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 390 - 401.

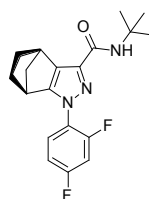
¹⁰¹ Clinicaltrials.gov. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=GW-842166X&Search=Search>. Accédé le 29 avril 2013.

¹⁰² PBRHome. Glenmark completes Phase I inflammatory pain trial. http://drugdiscovery.pharmaceutical-business-review.com/news/glenmark_completes_phase_i_inflammatory_pain_trial_140409. Accédé le 03 juillet 2013.

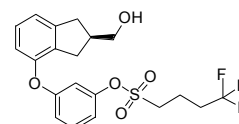
¹⁰³ Drugs.com. KeyNeurotek Pharmaceuticals Reports Positive Phase I Data of Its Cannabinoid Receptor-Agonist. http://www.drugs.com/clinical_trials/keyneurotek-pharmaceuticals-reports-positive-phase-data-cannabinoid-receptor-agonist-4212.html. Accédé le 3 juillet 2013.



GW-842166X

 $hCB_2 : K_i = 63 \text{ nM}$ 

GRC-10693

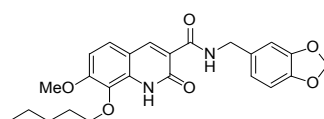


KN-38-7271

Figure 16. Structures chimiques du GW-842166X, du GRC-10693 et du KN-38-7271

iv. Les antagonistes / agonistes inverses du récepteur CB_2

Très peu de composés sont décrits comme antagonistes ou agonistes inverses du récepteur CB_2 . Parmi eux, le JTE-907 est l'agoniste inverse sélectif du récepteur CB_2 le plus décrit (cf. figure 17).¹⁰⁴ Il se lie avec une forte affinité au récepteur CB_2 de rat, de souris et humain. Les K_i ont pour valeur 0,38, 1,55 et 35,9 nM, respectivement.¹⁰⁵ Le JTE-907 a montré de forts effets anti-inflammatoires dans des modèles murins de dermatite atopique.^{106,107}



JTE-907

 $hCB_2 : K_i = 35,9 \text{ nM}$

Figure 17. Structure chimique du JTE-907

La famille des 1,5-diarlylpyrazoles a été développée par Sanofi suite à une campagne de criblage à haut débit réalisée sur les récepteurs aux cannabinoïdes. Son principal représentant est le SR141716A antagoniste / agoniste inverse CB_1 . Les différentes modulations structurales envisagées sur cette série ont alors permis la découverte du premier antagoniste sélectif du récepteur CB_2 , le SR144528 (cf. figure 18).¹⁰⁸

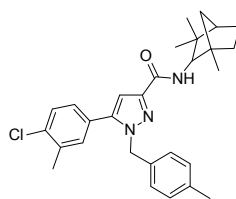
¹⁰⁴ Inaba, T.; Kaya, T.; Iwamura, H. 2-Oxoquinoline composés and medicinal uses thereof. **2000**, WO 20000040562.

¹⁰⁵ Iwamura, H.; Suzuki, H.; Ueda, Y.; Kaya, T.; Inaba, T. In vitro and in vivo pharmacological characterization of JTE-907, a novel selective ligand for cannabinoid CB_2 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 296, 420 - 425.

¹⁰⁶ Ueda, Y.; Miyagawa, N.; Matsui, T.; Kaya, T.; Iwamura, H. Involvement of cannabinoid CB_2 receptor-mediated response and efficacy of cannabinoid CB_2 receptor inverse agonist, JTE-907, in cutaneous inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, 520, 164 - 171.

¹⁰⁷ Maekawa, T.; Nojima, H.; Kuraishi, Y.; Aisaka, K. The cannabinoid CB_2 receptor inverse agonist JTE-907 suppresses spontaneous itch-associated responses of NC mice, a model of atopic dermatitis. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, 542, 179 - 183.

¹⁰⁸ Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Millan, J.; Derocq, J. M.; Casellas, P.; Congy, C.; Oustric, D.; Sarran, M.; Bouaboula, M.; Calandra, B.; Portier, M.; Shire, D.; Brelière, J. C.; Le Fur, G. L. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB_2 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, 284, 644 - 650.

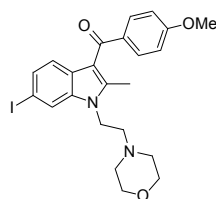


SR144528

 $hCB_2 : K_i = 0,60 \text{ nM}$
 $hCB_1 : K_i = 400 \text{ nM}$

Figure 18. Structure chimique du SR144528

L'AM630 est un antagoniste sélectif du récepteur CB_2 , apparenté à la pravadoline, avec un K_i de l'ordre de 31,2 nM et une sélectivité 165 fois plus importante pour le récepteur CB_2 comparée au récepteur CB_1 (cf. figure 19).^{109,110,111} L'AM630 a également montré des propriétés agonistes inverses sur cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) exprimant le récepteur CB_2 .^{112,113} Dernièrement, l'AM630 s'est révélé être aussi un antagoniste du récepteur CB_1 , à des fortes concentrations.¹¹⁴



AM630

 $choCB_2 : K_i = 31,2 \text{ nM}$
 $choCB_1 : K_i = 5152 \text{ nM}$

Figure 19. Structure chimique de l'AM630

¹⁰⁹ Pertwee, R.; Griffin, G.; Fernando, S.; Li, X.; Hill, A.; Makriyannis, A. AM630, a competitive cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci.* **1995**, *56*, 1949 - 1955.

¹¹⁰ Hosohata, K.; Quock, R. M.; Hosohata, Y.; Burkey, T. H.; Makriyannis, A.; Consroe, P.; Roeske, W. R.; Yamamura, H. I. AM630 is a competitive cannabinoid receptor antagonist in the guinea pig brain. *Life Sci.* **1997**, *61*, 115 - 118.

¹¹¹ Hosohata, Y.; Quock, R. M.; Hosohata, K.; Makriyannis, A.; Consroe, P.; Roeske, W. R.; Yamamura, H. I. AM630 antagonism of cannabinoid-stimulated [35S]GTP gamma S binding in the mouse brain. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *321*, 1 - 3.

¹¹² Landsman, R. S.; Makriyannis, A.; Deng, H.; Consroe, P.; Roeske, W. R.; Yamamura, H. I. AM630 is an inverse agonist at the human cannabinoid CB_1 receptor. *Life Sci.* **1998**, *62*, 109 - 113.

¹¹³ Ross, R. A.; Brockie, H. C.; Stevenson, L. A.; Murphy, V. L.; Templeton, F.; Makriyannis, A.; Pertwee, R. G. Agonist-inverse agonist characterization at CB_1 and CB_2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 665 - 672.

¹¹⁴ Murataeva, N.; Mackie, K.; Straiker, A. The CB_2 -preferring agonist JWH015 also potently and efficaciously activates CB_1 in autaptic hippocampal neurons. *Pharmacol. Res.* **2012**, *66*, 437 - 442.

2. Les endocannabinoïdes

a. L'anandamide

Des recherches sur les récepteurs aux cannabinoïdes ont permis assez rapidement de mettre en évidence l'existence de ligands endogènes de ces récepteurs, appelés endocannabinoïdes.

C'est en 1992, que Mechoulam et son équipe ont réalisé des recherches sur des extraits de cerveau de porc qui ont abouti à l'identification du premier ligand endogène des récepteurs CB₁ et CB₂ : l'anandamide ou *N*-arachidonoyléthanolamide (AEA), l'éthanolamide de l'acide arachidonique.¹¹⁵ Aujourd'hui, 8 composés ont été caractérisés comme appartenant à la famille des endocannabinoïdes.¹¹⁶ Ces composés sont tous des dérivés d'acides gras, parmi lesquels l'anandamide et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG) sont les plus étudiés.

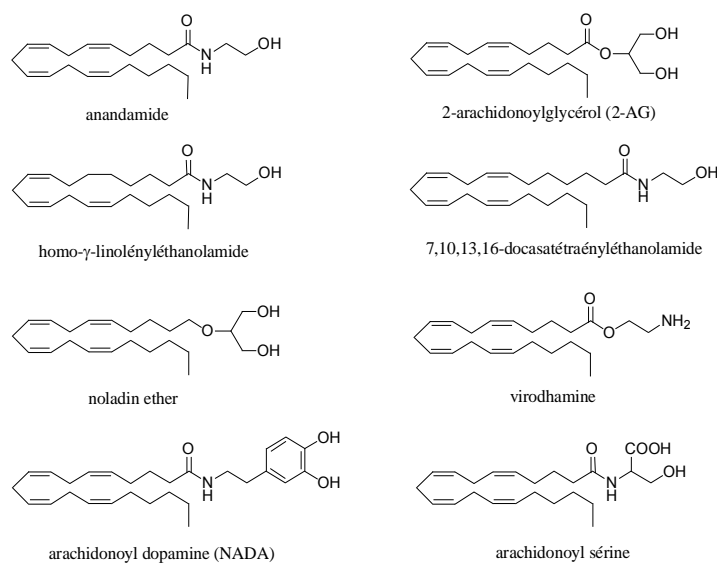


Figure 20. Structures des principaux endocannabinoïdes

L'AEA fait partie d'un large groupe de lipides bioactifs, les *N*-acyléthanolamines (NAEs), et se comporte comme un agoniste partiel des récepteurs CB₁ et CB₂ avec des K_i respectifs de 72 nM et de 370 nM.¹¹⁷ L'AEA possède un profil pharmacologique proche du Δ^9 -THC, mais n'engendre pas ses effets psychotropes.

¹¹⁵ Devane, W. A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **1992**, *258*, 1946 - 1949.

¹¹⁶ Hanus, L. O. Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 213 - 271.

¹¹⁷ Vogel, Z.; Barg, J.; Levy, R.; Saya, D.; Heldman, E.; Mechoulam, R. Anandamide, a brain endogenous composé, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 352 - 355.

Présent en différentes concentrations, l'AEA est localisé dans la rate et le cœur,¹¹⁸ mais également dans l'intestin, les testicules et l'utérus de rat à des concentrations beaucoup plus importantes que dans le cerveau. L'affinité préférentielle de l'AEA pour CB₁ est notamment responsable de ses effets anticonvulsivants, analgésiques¹¹⁹ et antiprolifératifs observés sur des lignées de cellules cancéreuses en culture.¹²⁰ De plus, il a été montré que l'AEA se liait au transient receptor potential vanilloïde 1 (TRPV1), récepteurs ionotropiques intervenant dans les mécanismes nociceptifs, ce qui concourt à son effet antalgique,¹²¹ ainsi qu'aux récepteurs activant la prolifération des péroxizomes (PPARs) α et γ , à fortes concentrations.¹²²

La présence de l'anandamide dans les diverses zones du cerveau est fortement corrélée avec l'affluence ou non du récepteur CB₁. Ainsi, l'AEA se retrouve dans l'hippocampe, le thalamus, le cervelet et le cortex.¹²³ De faibles concentrations d'AEA ont été mesurées dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien et le sérum, suggérant que l'AEA n'est pas de nature hormonale mais qu'il est synthétisé à proximité des sites d'action. Ainsi, l'AEA semble se comporter comme un neurotransmetteur classique. Cependant, l'AEA est formé directement *via* la N-acylphosphatidyléthanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) dans les neurones et les astrocytes après stimulation de différents récepteurs, induisant l'hydrolyse de précurseurs lipidiques membranaires. L'AEA peut également être synthétisé par actions successives de lipases : la phospholipase C puis une autre phosphatase, A2 par exemple, et enfin la lysophospholipase D.

Contrairement à un neurotransmetteur classique, l'AEA n'est pas stocké dans des vésicules mais diffuse librement à travers la membrane cellulaire.¹²⁴

¹¹⁸ Schmid, P. C.; Paria, B. C.; Krebsbach, R. J.; Schmid, H. H.; Dey, S. K. Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 4188 - 4192.

¹¹⁹ Rice, A. S.; Farquhar-Smith, W. P.; Nagy, I. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **2002**, *66*, 243 - 256.

¹²⁰ Parolaro, D.; Massi, P.; Rubino, T.; Monti, E. Endocannabinoids in the immune system and cancer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **2002**, *66*, 319 - 332.

¹²¹ Ross, R. A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 790 - 801.

¹²² O'Sullivan, S. E. Cannabinoids go nuclear : evidence for activation of peroxizome proliferator-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 576 - 582.

¹²³ Di Marzo, V.; Fontana, A.; Cadas, H.; Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J. C.; Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **1994**, *372*, 686 - 691.

¹²⁴ Giuffrida, A.; Beltramo, M.; Piomelli, D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *298*, 7 - 14.

L'AEA libre interagit avec les récepteurs aux cannabinoïdes ou est hydrolysé par la fatty acid amide hydrolase (FAAH), une amidase à sérine, ou par la *N*-acyléthanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA), une amidase à cystéine.

b. Le 2-arachidonoylglycérol

Le 2-arachidonoylglycérol (2-AG), un autre endocannabinoïde, ester de l'acide arachidonique, a été isolé en 1995 dans l'intestin canin,¹²⁵ et a été mis en évidence dans la rate et le cerveau où sa concentration peut atteindre 170 fois celle de l'AEA.^{126,127} Contrairement à l'AEA, le 2-AG se comporte comme un agoniste entier de CB₁ et CB₂ avec des affinités, respectivement, de 58 nM et 145 nM.¹²⁸

La biosynthèse du 2-AG s'effectue au niveau post-synaptique sous l'influence d'une activité neuronale particulière ou d'une activation par d'autres récepteurs comme ceux à l'acétylcholine. Le 2-AG est alors produit par les sn-1 diacylglycérol lipases α et β (DAGL) à partir de diacylglycérols dérivés de phospholipides.¹²⁹

Le 2-AG, comme l'AEA, n'est pas stocké dans des vésicules, contrairement aux neurotransmetteurs, mais est produit « à la demande » au sein des cellules neuronales. Ces deux endocannabinoïdes possèdent un mécanisme d'action rétrograde, « à contre-courant » de la transmission synaptique, qui module la libération de neurotransmetteurs et ce, de façon transitoire ou durable.¹³⁰ Le 2-AG libre interagit avec les récepteurs aux cannabinoïdes ou est hydrolysé par la monoacylglycérol lipase (MAGL) et les α/β -hydrolases domain 6 et 12 (ABHD6 et ABHD12), trois amidases à sérine. Le 2-AG peut aussi être hydrolysé par la FAAH mais dans une moindre mesure par rapport à la MAGL.

¹²⁵ Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N. E.; Schatz, A. R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B. R.; Compton, D. R.; Pertwee, R. G.; Griffin, G.; Bayewitch, M.; Barg, J.; Vogel, A. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 83 - 90.

¹²⁶ Stella, N.; Schweitzer, P.; Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **1997**, *388*, 773 - 778.

¹²⁷ Di Marzo, V. 2-Arachidonyl-glycerol as an endocannabinoid: lime-light for a formerly neglected metabolite. *Biochemistry* **1998**, *63*, 13 - 21.

¹²⁸ Ben-Shabat, S.; Frider, E.; Sheskin, T.; Tamiri, T.; Rhee, M. H.; Vogel, Z.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V.; Mechoulam, R. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *353*, 23 - 31.

¹²⁹ Alhouayek, M.; Muccioli, G. G. The endocannabinoid system in inflammatory bowel diseases : from pathophysiology to therapeutic opportunity. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 615 - 25.

¹³⁰ Wilson, R. I.; Nicoll, R. A. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* **2002**, *296*, 678 - 682.

L'AEA et le 2-AG agissent soit dans la cellule où ils sont produits, soit dans les cellules voisines avec un temps de demi-vie très court.^{131,132}

3. Les *N*-acyléthanolamides associés aux endocannabinoïdes

a. Le palmitoléthanolamide

Le palmitoléthanolamide (PEA), amide de l'acide palmitique et de l'éthanolamine (cf. figure 21), a été isolé par Bachur *et al* en 1965 à partir du cerveau de rat et de cochon d'inde. Le PEA se retrouve dans le cerveau à des concentrations supérieures à celle de l'AEA.¹³³

Le PEA se lie à plusieurs récepteurs, comme les récepteurs aux cannabinoïdes CB₁ et CB₂ mais également le récepteur nucléaire PPAR- α et le récepteur orphelin GPR55 (EC₅₀ = 3,2 nM). Ce qui pourrait expliquer les effets anti-inflammatoires, analgésiques, neuroprotecteurs et antiprolifératifs associés au PEA.^{134,135,136} Le PEA active également faiblement le récepteur aux vanilloïdes TRPV1.¹³⁷

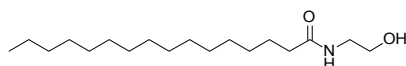


Figure 21. Structure chimique du palmitoléthanolamide

b. L'oléoléthanolamide

L'oléoléthanolamide (OEA), amide de l'acide oléique et de l'éthanolamide (cf. figure 22), est un *N*-acyléthanolamide qui régule la prise alimentaire. Une injection d'OEA chez le rat a notamment conduit à une réduction de la prise alimentaire, ainsi qu'à une diminution de la prise de poids.

¹³¹ Di Marzo, V.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L.; Melck, D.; Martin, B. R. Cannabimimetic fatty acid derivatives: the anandamide family and other endocannabinoids. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 721 - 744.

¹³² Piomelli, D.; Beltramo, M.; Glasnapp, S.; Lin, S. Y.; Goutopoulos, A.; Xie, X. Q.; Makriyannis, A. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 5802 - 5807.

¹³³ Schmid, P. C.; Krebsbach, R. J.; Perry, S. R.; Dettmer, T. M.; Maasson, J. L.; Schmid, H. H. Occurrence and postmortem generation of anandamide and other long-chain *N*-acyléthanolamines in mammalian brain. *FEBS Lett.* **1995**, *375*, 117 - 120.

¹³⁴ Conti, S.; Costa, B.; Colleoni, M.; Parolaro, D.; Giagnoni, G. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *135*, 181 - 187.

¹³⁵ Lambert, D. M.; Vandevoorde, S.; Jonsson, K. O.; Fowler, C. J. The palmitoylethanolamide family: a new class of antiinflammatory agents? *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 663 - 674.

¹³⁶ Di Marzo, V.; Melck, D.; Orlando, P.; Bisogno, T.; Zagoory, O.; Bifulco, M.; Vogel, Z.; De Petrocellis, L. Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem. J.* **2001**, *358*, 249 - 255.

¹³⁷ De Petrocellis, L.; Bisogno, T.; Ligresti, A.; Bifulco, M.; Melck, D.; Di Marzo, V. Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2002**, *16*, 297 - 302.

Les effets anorexigènes centraux et périphériques de l'OEA sont dus à sa bonne affinité pour PPAR- α .¹³⁸

L'OEA active également dans une moindre mesure le récepteur aux vanilloïdes TRPV1,¹³⁹ le récepteur orphelin GPR119¹⁴⁰ et le récepteur nucléaire PPAR- γ .¹⁴¹ Parallèlement, il a été reporté que l'OEA inhibe modérément les canaux potassiques voltage-dépendant kv1.5,¹⁴² impliqués dans l'activation des cellules microgliales,¹⁴³ et kv4.3,¹⁴⁴ impliqués dans la plasticité synaptique.¹⁴⁵

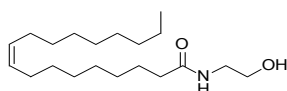


Figure 22. Structure chimique de l'oléoyléthanolamide

c. Le stéaroyléthanolamide

Ethanolamide saturé, comme le PEA, le stéaroyléthanolamide (SEA) est un éthanolamide qui induit un effet anorexigène de manière dose-dépendante (*cf.* figure 23).¹⁴⁶

D'après Maccarrone *et al*, le SEA n'interagirait ni avec les récepteurs aux cannabinoïdes ni avec ceux aux vanilloïdes. Le SEA posséderait son propre site d'action non couplé aux protéines G.¹⁴⁷

¹³⁸ Rodriguez de Fonseca, F.; Navarro, M.; Gomez, R.; Escuredo, L.; Nava, F.; Fu, J.; Murillo-Rodriguez, E.; Giuffrida, A.; Lo Verme, J.; Gaetani, S.; Kathuria, S.; Gall, C.; Piomelli, D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* **2001**, *414*, 209 - 212.

¹³⁹ Movahed, P.; Jönsson, B. A. G.; Birnir, B.; Wingstrand, J. A.; Jorgensen, T. D.; Ermund, A.; Sterner, O.; Zygmunt, P. M.; Högestätt, E. D. Endogenous unsaturated C18 *N*-acylethanolamines are vanilloid receptor (TRPV1) agonists. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 38496 - 38504.

¹⁴⁰ Overton, H. A.; Babbs, A. J.; Doel, S. M.; Fyfe, M. C.; Gardner, L. S.; Griffin, G.; Jackson, H. C.; Procter, M. J.; Rasamison, C. M.; Tang-Christensen, M.; Widdowson, P. S.; Williams, G. M.; Reynet, C. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 167 - 175.

¹⁴¹ Fu, J.; Gaetani, S.; Oveisi, F.; LoVerme, J.; Serrano, A.; Rodriguez de Fonseca, F.; Rosengarh, A.; Luecke, H.; Di Giacomo, B.; Tarzia, G.; Piomelli, D. Oleoylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR α . *Nature*. **2003**, *425*, 90 - 93.

¹⁴² Barana, A.; Amoros, I.; Caballero, R.; Gomez, R.; Osuna, L.; Lillo, M. P.; Blazquez, C.; Guzman, M.; Delpon, E.; Tamargo, J. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block cardiac hKv1.5 channels in a cannabinoid receptor-independent manner. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *85*, 56 - 67.

¹⁴³ Mullen, K. M.; Rozycka, M.; Rus, H.; Hu, L.; Cudrici, C.; Zafranskaia, E.; Pennington, M. W.; Johns, D. C.; Judge, S. I.; Calabresi, P. A. Potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 are expressed on blood-derived dendritic cells in the central nervous system. *Ann. Neurol.* **2006**, *60*, 118 - 127.

¹⁴⁴ Amoros, I.; Barana, A.; Caballero, R.; Gomez, R.; Osuna, L.; Lillo, M. P.; Tamargo, J.; Delpon, E. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block human cardiac Kv4.3 channels in a receptor-independent manner. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2010**, *48*, 201 - 210.

¹⁴⁵ Burkhalter, A.; Gonchar, Y.; Mellor, R. L.; Nerbonne, J. M. Differential expression of I (A) channel subunits Kv4.2 and Kv4.3 in mouse visual cortical neurons and synapses. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 12274 - 12282.

¹⁴⁶ Terrazzino, S.; Berto, F.; Carbonare, M. D.; Fabris, M.; Guitto, A.; Bernardini, D.; Leon, A. Stearoyléthanolamide exerts anorexic effects in mice via downregulation of liver stearoyl-coenzyme A desaturase-1 mRNA expression. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1580 - 1582.

¹⁴⁷ Maccarrone, M.; Pauselli, R.; Di Rienzo, M.; Finazzi-Agro, A. Binding, degradation and apoptotic activity of stearoyléthanolamide in rat C6 glioma cells. *Biochem. J.* **2002**, *366*, 137 - 144.

Une faible inhibition des canaux potassiques (Kv) 1.5 et 4.3 a notamment été reportée pour le SEA.¹⁴⁴

De plus, il a été observé une forte diminution de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) en présence de SEA dans des tranches corticales de souris stimulées par de l'AEA, ceci par un effet potentialisateur du SEA. Ainsi, le SEA potentialiserait la capacité de l'AEA à diminuer le taux d'AMPC intracellulaire.¹⁴⁸

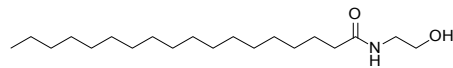


Figure 23. Structure chimique du stéaroyléthanolamide

4. Les voies de biosynthèse des endocannabinoïdes

a. Biosynthèse de l'anandamide

Les mécanismes de biosynthèse de l'AEA au niveau du SNC ne sont pas encore complètement définis. Il est généralement accepté que l'AEA est généré par un transfert enzymatique calcium-dépendant d'une phosphatidylcholine (PC) à l'amine primaire d'une phosphatidyléthanolamine (PE) pour former une *N*-arachidonoyl phosphatidyléthanolamine (NArPE ; étape 1 figure 24), qui est ensuite hydrolysée en AEA (étapes 2 à 8, figure 24).^{123,149}

¹⁴⁸ Maccarrone, M.; Cartoni, A.; Parolaro, D.; Margonelli, A.; Massi, P.; Bari, M.; Battista, N.; Finazzi-Agr, A. Cannabimimetic activity, binding, and degradation of stearoylethanolamide within the mouse central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* **2002**, *21*, 126 - 140.

¹⁴⁹ Cadas, H.; Gaillet, S.; Beltramo, M.; Venance, L.; Piomelli, D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 3934 - 3942.

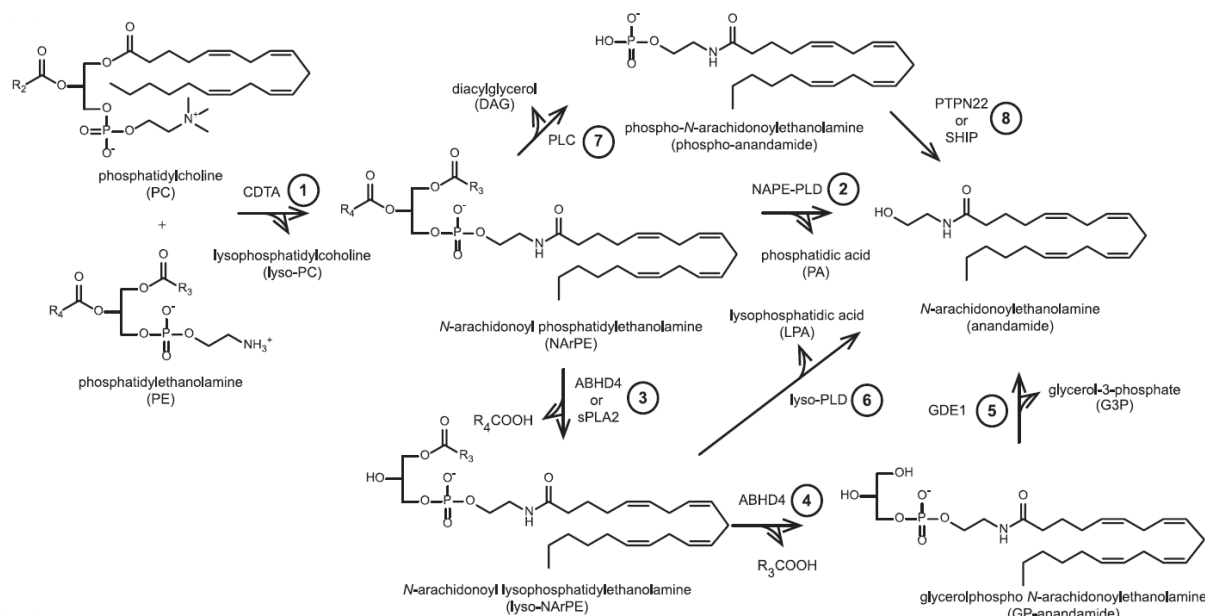


Figure 24. Voies de biosynthèse de l'anandamide¹⁵⁰

Cependant, la structure de la transacylase calcium-dépendante (CDTA), de la famille des *N*-acyltransférases (NAT), qui forme la NArPE n'a toujours pas été identifiée (étape 1, figure 24), et la réaction, par laquelle la NArPE est convertie en AEA, reste partiellement comprise. Plusieurs mécanismes et enzymes de biosynthèse de l'AEA ont cependant été suggérés, notamment la libération directe de l'AEA par la *N*-acylphosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD, étape 2, figure 24).¹⁵¹

La deuxième voie de biosynthèse envisagée provient de désacylations successives de la NArPE par la lyso(NAPE)-lipase α/β -hydrolase 4, aussi nommée α/β -hydrolase domain 4 (ABHD4 ; étapes 3 et 4, figure 24),¹⁵² et d'un clivage de la liaison phosphodiester par la glycérophosphodiesterase GDE1 (étape 5, figure 24).¹⁵³

¹⁵⁰ Blankman, J. L.; Cravatt, B. F. Chemicals probes of endocannabinoid metabolism. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 849 - 871.

¹⁵¹ Okamoto, Y.; Morishita, J.; Tsuboi, K.; Tonai, T.; Ueda, N. Molecular characterisation of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 5298 - 5305.

¹⁵² Simon, G. M.; Cravatt, B. F. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-*N*-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26465 - 26472.

¹⁵³ Simon, G. M.; Cravatt, B. F. Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-*N*-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 9341 - 9349.

La troisième voie de biosynthèse consiste en la *O*-désacylation de la NArPE par la phospholipase A2 (étape 3, figure 24), suivie cette fois-ci par l'hydrolyse de la liaison phosphodiester par une lysophospholipase D (étape 6, figure 24).¹⁵⁴

Enfin, la quatrième voie propose une conversion de la NArPE en phospho-anandamide par une phospholipase C (étape 7, figure 24), suivie d'une déphosphorylation par la tyrosine phosphatase PTPN22 ou l'inositol 5'-phosphatase SHIP1 (étape 8, figure 24).¹⁵⁵

Cependant, dans le cerveau de souris génétiquement invalidé pour le gène de la NAPE-PLD,¹⁵⁶ GED1¹⁵⁷ et PTPN22,¹⁵⁵ le taux basal d'AEA reste inchangé. Ces études suggèrent alors deux possibilités : soit ces enzymes ne contrôlent pas la biosynthèse de l'AEA dans le SNC dans des conditions normales ; soit la suppression de ces enzymes entraîne la surexpression de voies compensatoires de la biosynthèse de l'AEA.

b. Biosynthèse du 2-arachidonoylglycérol

Comme pour l'AEA, plusieurs voies de biosynthèse du 2-AG, différentes selon la nature du stimulus, ont été suggérées.¹⁵⁸ Ainsi, si la stimulation provient des récepteurs couplés aux protéines G_{q/11}, alors la synthèse se déroulera en 2 étapes à partir du phosphatidylinositol 3-phosphate (PI). Dans un premier temps, la phospholipase C (PLC β) hydrolyse le PI pour donner le diacylglycérol (DAG, étape 1, figure 25), puis dans un second temps, le DAG subit l'action de *sn*-1-spécifique diacylglycérol lipases α et β (DAGL α et DAGL β) pour libérer le 2-AG (étape 2, figure 25).^{159,160,161,162}

¹⁵⁴ Sun, Y.; Tsuboi, K.; Okamoto, Y.; Tonai, T.; Murakami, M.; Kudo, I.; Ueda, N. Biosynthesis of anandamide and *N*-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J.* **2004**, *380*, 749 - 756.

¹⁵⁵ Liu, J.; Wang, L.; Harvey-White, J.; Huang, B. X.; Kim, H. Y.; Luquet, S.; Palmiter, R. D.; Krystal, G.; Rai, R.; Mahadevan, A.; Razdan, R. K.; Kunos, G. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* **2008**, *54*, 1 - 7.

¹⁵⁶ Leung, D.; Saghatelian, A.; Simon, G. M.; Cravatt, B. F. Inactivation of *N*-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry* **2006**, *45*, 4720 - 4726.

¹⁵⁷ Simon, G. M.; Cravatt, B. F. Characterization of mice lacking candidate *N*-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 1411 - 1418.

¹⁵⁸ Kano, M.; Ohno-Shosaku, T.; Hashimoto-dani, Y.; Uchigashima, M.; Watanabe, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 309 - 380.

¹⁵⁹ Stella, N.; Schweitzer, P.; Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature.* **1997**, *388*, 773 - 778.

¹⁶⁰ Kondo, S.; Kondo, H.; Nakane, S.; Kodaka, T.; Tokumura, A.; Waku, K.; Sugiura, T. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett.* **1998**, *429*, 152 - 156.

¹⁶¹ Hashimoto-dani, Y.; Ohno-Shosaku, T.; Tsubokawa, H.; Ogata, H.; Emoto, K.; Maejima, T.; Araishi, K.; Shin, H. S.; Kano, M. Phospholipase C β serves as a coincidence detector through its Ca2+ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron.* **2005**, *45*, 257 - 268.

Des souris Knockout-DAGL (KO-DAGL) ont confirmé le rôle de la DAGL α dans la formation du 2-AG dans le cerveau, et celui de la DAGL β au niveau périphérique, notamment le foie.^{163,164}

Cependant, le DAG peut provenir également de l'hydrolyse de l'acide phosphatidique (AP) par une phosphatidic acid hydrolase (PA-hydrolase, étape 3, figure 25).¹⁶⁵

Une dernière voie de synthèse pour le 2-AG a été envisagée mais le stimulus de départ reste encore inconnu. Ainsi sous l'action de la phosphatidylinositol-phospholipase A1 (PLA1), le PI est hydrolysé en 2-arachidonoyl-lysophosphatidylinositol (Lyso-PI, étape 4, figure 25). Ensuite, le Lyso-PI subit l'action de la lysophospholipase C (Lyso-PLC) générant alors le 2-AG (étape 5, figure 25).¹⁶⁶

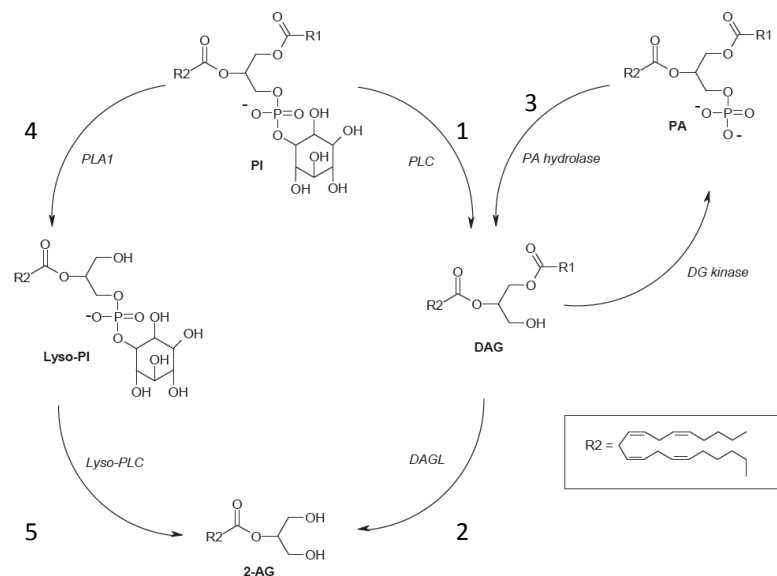


Figure 25. Voies de biosynthèse du 2-AG¹⁶⁷

¹⁶² Bisogno, T.; Howell, F.; Williams, G.; Minassi, A.; Cascio, M. G.; Ligresti, A.; Matias, I.; Schiano-Moriello, A.; Paul, P.; Williams, E. J.; Gangadharan, U.; Hobbs, C.; Di Marzo, V.; Doherty, P. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol.* **2003**, *163*, 463 - 468.

¹⁶³ Gao, Y.; Vasilyev, D. V.; Goncalves, M. B.; Howell, F. V.; Hobbs, C.; Reisenberg, M.; Shen, R.; Zhang, M. Y.; Strassle, B. W.; Lu, P.; Mark, L.; Piesla, M. J.; Deng, K.; Kouranova, E. V.; Ring, R. H.; Whiteside, G. T.; Bates, B.; Walsh, F. S.; Williams, G.; Pangalos, M. N.; Samad, T. A.; Doherty, P. Loss of retrograde endocanna-binoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 2017 - 2024.

¹⁶⁴ Tanimura, A.; Yamazaki, M.; Hashimoto, Y.; Uchigashima, M.; Kawata, S.; Abe, M.; Kita, Y.; Hashimoto, K.; Shimizu, T.; Watanabe, M.; Sakimura, K.; Kano, M. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase a mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron.* **2010**, *65*, 320 - 327.

¹⁶⁵ Bisogno, T.; Melck, D.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 2113 - 2119.

¹⁶⁶ Ueda, H.; Kobayashi, T.; Kishimoto, M.; Tsutsumi, T.; Okuyama, H. A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain. *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 1874 - 1881.

¹⁶⁷ Muccioli, G. G. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discovery Today.* **2010**, *15*, 474 - 483.

5. Les voies de signalisation intracellulaire des récepteurs aux cannabinoïdes

a. Voies de transduction du récepteur CB₁

La stimulation des récepteurs aux cannabinoïdes module un certain nombre de voies de transduction (*via* des protéines G) aussi bien dans les neurones que dans les tissus périphériques. Le couplage du récepteur CB₁ aux protéines G a été démontré sur des membranes cerebelleuses de rat, ceci puisque l'activation du récepteur induit une augmentation de la liaison du GTP radiomarqué ([³⁵S]GTPγS).¹⁶⁸ Les tests [³⁵S]GTPγS ont montré que l'AEA agissait comme agoniste partiel du récepteur CB₁. L'anandamide a présenté les mêmes propriétés lors des tests AMPc, où l'anandamide se couplait à une protéine G_{i/o} ou G_s.^{169,170}

Au niveau neuronal, du fait de sa localisation présynaptique, l'activation du récepteur CB₁ induit une inhibition de la neurotransmission dans plusieurs aires du cerveau comme l'hippocampe, l'hypothalamus, le cervelet, le noyau accumbens et le cortex.¹⁷¹ En effet, l'activation du récepteur CB₁ inhibe la libération de certains neurotransmetteurs comme l'acide γ-aminobutyrique (GABA) dans la substance noire, l'acétylcholine et le glutamate dans l'hippocampe.

Au niveau de la synapse glutamatergique, par exemple, un stimulus présynaptique crée une dépolarisation et une entrée de calcium dans la cellule (étape 1, figure 26), suivie de la libération des neurotransmetteurs (étape 2, figure 26). Ceux-ci activent leurs récepteurs post-synaptiques et provoquent une dépolarisation conduisant à une entrée de calcium (étape 3, figure 26). Cette augmentation de la concentration calcique va alors générer la synthèse d'endocannabinoïdes à partir de précurseurs lipidiques membranaires (étape 4, figure 26). Ces endocannabinoïdes vont ensuite quitter la cellule post-synaptique pour aller activer les récepteurs CB₁ présynaptiques.

¹⁶⁸ Selley, D. E.; Stark, S.; Sim, L. J.; Childers, S. R. Cannabinoid receptor stimulation of guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate binding in rat brain membranes. *Life Sci.* **1996**, *59*, 659 - 668.

¹⁶⁹ Childers, S. R.; Sexton, T.; Roy, M. B. Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 711 - 715.

¹⁷⁰ Hillard, C. J.; Manna, S.; Greenberg, M. J.; DiCamelli, R.; Ross, R. A.; Stevenson, L. A.; Murphy, V.; Pertwee, R. G.; Campbell, W. B. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB₁). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 1427 - 1433.

¹⁷¹ Kawamura, Y.; Fukaya, M.; Maejima, T.; Yoshida, T.; Miura, E.; Watanabe, M.; Ohno-Shosaku, T.; Kano, M. The CB₁ cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 2991 - 3001.

Cette activation des récepteurs présynaptiques va ensuite entraîner l'inhibition directe (via les sous-unités β et γ de la protéine G) des canaux calciques voltage-dépendants de type T (étape 5, figure 26),¹⁷² et ainsi diminuer le taux de calcium intracellulaire qui par conséquent inhibera la libération des neurotransmetteurs.¹⁷³ La stimulation des récepteurs CB₁ entraîne également l'activation des canaux potassiques de la rectification entrante (K_{ir}) ce qui tend à diminuer l'excitabilité neuronale.¹⁷⁴

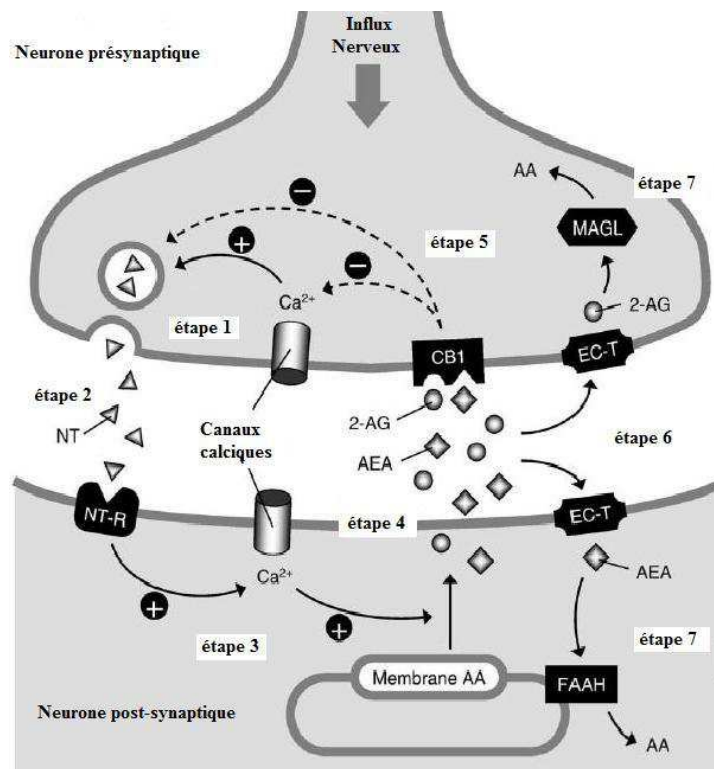


Figure 26. Action rétrograde des endocannabinoïdes

Dans les tissus périphériques et les neurones, l'activation du récepteur CB₁ via les protéines G_{i/o} joue principalement sur trois voies de signalisation intracellulaire que sont : l'adénylate cyclase (AC), certains canaux ioniques et la voie des protéines kinases activées par des agents mitogènes Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK). Cependant, dans certains systèmes et sous certaines conditions, le récepteur CB₁ peut être couplé à des protéines de type G_s et/ou G_{q/11} en plus des G_{i/o}.¹⁷⁵

¹⁷² Chemin, J.; Monteil, A.; Perez-Reyes, E.; Nargeot, J.; Lory, P. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J.* **2001**, *20*, 7033 - 7040.

¹⁷³ Wilson, R. I.; Nicoll, R. A. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* **2002**, *296*, 678 - 682.

¹⁷⁴ McAllister, S. D.; Griffin, G.; Satin, L. S.; Abood, M. E. Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a *Xenopus* oocyte expression system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *291*, 618 - 626.

¹⁷⁵ Demuth, D. G.; Molleman, A. Cannabinoid signalling. *Life Sci.* **2006**, *78*, 549 - 563.

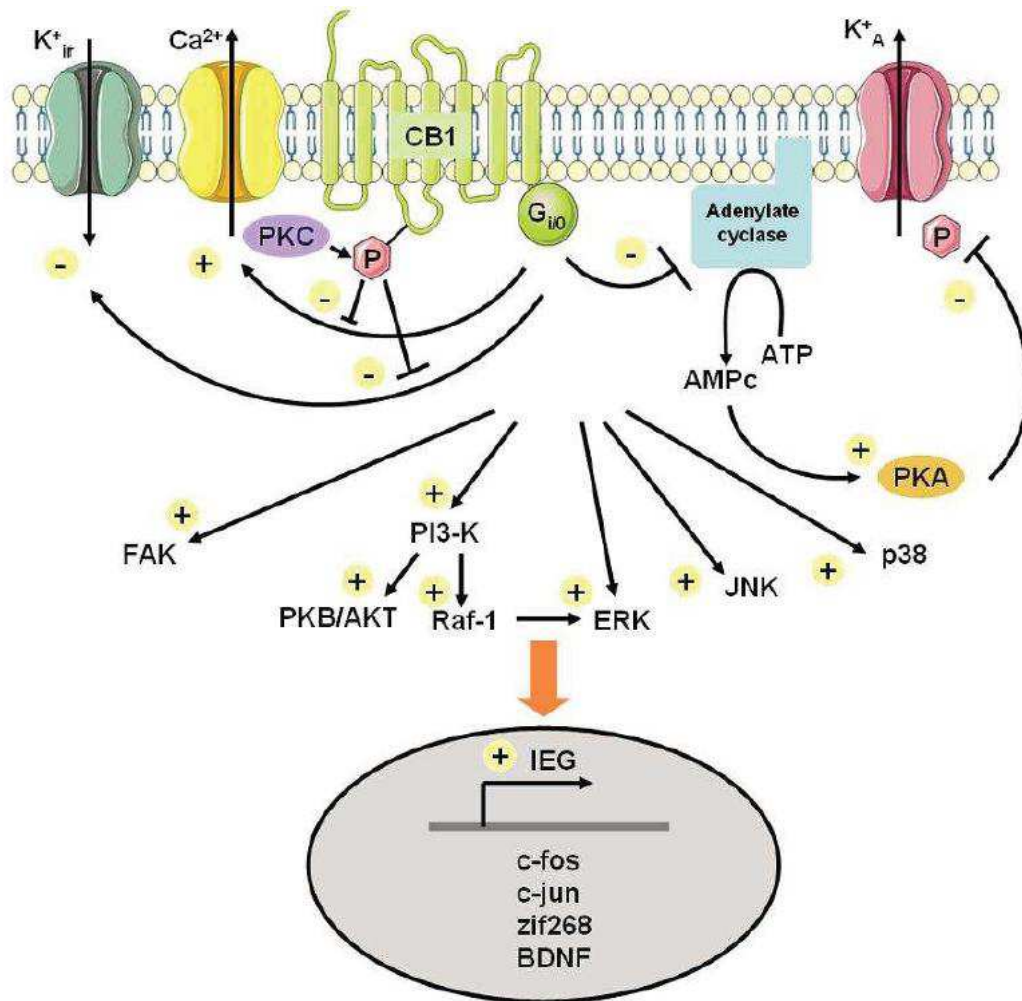


Figure 27. Principales voies de transduction associées au récepteur CB₁¹⁷⁶

Lors de l'activation du récepteur CB₁, la sous-unité G_{oi} de la protéine G_i inhibe l'AC aboutissant à une diminution de la production d'AMPc intracellulaire. Cependant, si la toxine pertussique bloque l'inhibition de l'AC en neutralisant les G_{i/o}, une réponse stimulatrice de l'AC par la protéine G_s est détectée (cf. figure 27).¹⁷⁷ En aval de l'AC, la production d'AMPc régule l'activité de la protéine kinase A (PKA). Cette dernière module entre autres la phosphorylation des canaux ioniques au potassium, provoquant l'activation de courants potassiques de type A.¹⁷⁸

¹⁷⁶ Thèse du Dr. Virginie Lucas-Andrzejak, soutenue le 9 décembre 2010, 39.

¹⁷⁷ Bonhaus, D. W.; Chang, L. K.; Kwan, J.; Martin, G. R. Dual activation and inhibition of adenylate cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *287*, 884 - 888.

¹⁷⁸ Deadwyler, S. A.; Hampson, R. E.; Mu, J.; Whyte, A.; Childers, S. Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *273*, 734 - 743.

Cependant, Evans *et al.* ont montré que les métabolites de l'AEA pouvaient également avoir leurs propres effets sur les courants potassiques, indépendamment du récepteur CB₁.¹⁷⁹

Outre les canaux calciques de type T, l'activation du récepteur CB₁ entraîne un blocage des canaux calciques de type L,¹⁸⁰ N,¹⁸¹ et P/Q¹⁸² par le biais d'une protéine de type G_{i/o} indépendante de l'activité cyclasique.¹⁸³ Cette inhibition est levée par l'action de l'antagoniste SR141716A ou de la toxine pertussique, c'est pourquoi elle est qualifiée d'indirecte.¹⁸⁰

L'activation du récepteur CB₁ module également l'activité de plusieurs kinases intracellulaires. Il a été montré que les agonistes des récepteurs aux cannabinoïdes stimulent la phosphorylation de la Focal Adhesion Kinase (FAK) dans les tranches hippocampales (*cf.* figure 27).¹⁸⁴ Cette phosphorylation dépendante de la PKA, est bloquée par le SR141716A et la toxine pertussique. La stimulation du récepteur CB₁ exerce également un contrôle sur la voie des MAPK telles que les Extracellular signal-Related protein Kinases (ERKs) qui sont impliquées dans la régulation de l'expression de gènes (Krox-24) et la synthèse protéique (*cf.* figure 27).^{185,186}

D'autres MAPK sont activées par la stimulation des récepteurs CB₁, il s'agit de p38 et p42/44 MAPK ainsi que c-Jun N-terminal-Kinase (JNK).¹⁸⁷ Ces différentes MAPK jouent un rôle clé dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que la différenciation, la prolifération et l'apoptose.

¹⁷⁹ Evans, R. M.; Wease, K. N.; MacDonald, C. J.; Khairy, H. A.; Ross, R. A.; Scott, R. H. Modulation of sensory neuron potassium conductances by anandamide indicates roles for metabolites. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *154*, 480 - 492.

¹⁸⁰ Gebremedhin, D.; Lange, A. R.; Campbell, W. B.; Hillard, C. J.; Harder, D. R. Cannabinoid CB₁ receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am. J. Physiol.* **1999**, *276*, 2085 - 2093.

¹⁸¹ Brown, S. P.; Safo, P. K.; Regehr, W. G. Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 5623 - 5631.

¹⁸² Hampson, A. J.; Bornheim, L. M.; Scanziani, M.; Yost, C. S.; Gray, A. T.; Hansen, B. M.; Leonoudakis, D. J.; Bickler, P. E. Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 671 - 676.

¹⁸³ Mackie K, Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 3825 - 3829.

¹⁸⁴ Derkinderen, P.; Toutant, M.; Burgaya, F.; Le Bert, M.; Siciliano, J. C.; De Franciscis, V.; Gelman, M.; Girault, J. A. Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science* **1996**, *273*, 1719 - 1722.

¹⁸⁵ Bouaboula, M.; Poinot-Chazel, C.; Bourrié, B.; Canat, X.; Calandra, B.; Rinaldi-Carmona, M.; Le Fur, G.; Casellas, P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB₁. *Biochem. J.* **1995**, *312*, 637 - 641.

¹⁸⁶ Graham, E. S.; Ball, N.; Scotter, E. L.; Narayan, P.; Dragunow, M.; Glass, M. Induction of Krox-24 by endogenous cannabinoid type 1 receptors in Neuro2A cells is mediated by the MEK-ERK MAPK pathway and is suppressed by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29085 - 29095.

¹⁸⁷ Liu, J.; Gao, B.; Mirshahi, F.; Sanyal, A. J.; Khanolkar, A. D.; Makriyannis, A.; Kunos, G. Functional CB₁ cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem. J.* **2000**, *346*, 835 - 840.

En effet, l'activation de p38, et dans une moindre mesure de p42/44, par la stimulation des récepteurs CB₁ par l'AEA, est responsable d'une réduction de la transcription et de la différenciation des kératinocytes.¹⁸⁸

Les mécanismes permettant l'induction des MAPK ne sont pas encore clairement élucidés. Actuellement, deux voies de signalisation ont été proposées. La première implique l'activation de la phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI₃K) par les sous-unités G_{βγ} de la protéine G_{i/o}. Cette activation serait à l'origine de la stimulation de Raf-1, laquelle induirait la phosphorylation des MAPK.¹⁴⁴

La seconde impliquerait, quant à elle, l'intervention de la protéine cytoplasmique Factor Associated with Neutral sphingomyelinase activation (FAN)¹⁸⁹ qui, couplée à une sphingomyélinase, permet la dégradation de la sphingomyéline en céramide, un agent mitogène de la famille des sphingolipides impliqué dans le cycle et la prolifération cellulaire. Aussi, le céramide est un second messenger important puisque *via* sa synthèse *de novo*, il inhibe la voie de survie tumorale PI₃K/Akt ou PI₃K/Protéine kinase B (PKB) par l'activation de la sérine palmitoyltransférase. En effet, l'activation de la sérine palmitoyltransférase, *via* la stimulation du récepteur CB₁, dégrade les acides gras en céramide inhibant ainsi la protéine Akt, une protéine kinase sérine/thréonine-spécifique.¹⁹⁰

En aval de l'activation des MAPK, l'activité du récepteur CB₁ provoque l'expression de gènes précoces tels que Krox-24, BDNF (impliqués notamment dans la plasticité synaptique), c-Fos et c-Jun (*cf.* figure 27) qui contrôlent un certain nombre de processus cellulaires (la différenciation, la prolifération et l'apoptose).^{191,192}

¹⁸⁸ Paradisi, A.; Pasquariello, N.; Barcaroli, D.; Maccarrone, M. Anandamide regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB1 receptor-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6005 - 6012.

¹⁸⁹ Sánchez, C.; Galve-Roperh, I.; Rueda, D.; Guzmán, M. Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 834 - 843.

¹⁹⁰ Radin, N. S. Killing tumours by ceramide-induced apoptosis : a critique of available drugs. *Biochem. J.* **2003**, *15*, 243 - 256.

¹⁹¹ Derkinderen, P.; Valjent, E.; Toutant, M.; Corvol, J. C.; Enslen, H.; Ledent, C.; Trzaskos, J.; Caboche, J.; Girault, J. A. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 2371 - 2382.

¹⁹² Patel, N. A.; Moldow, R. L.; Patel, J. A.; Wu, G.; Chang, S. L. Arachidonylethanolamide (AEA) activation of FOS proto-oncogene protein immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.* **1998**, *797*, 225 - 233.

Dans la lignée cellulaire cancéreuse MCF-7 (cancer du sein), la stimulation des MAPK induite par l'AEA provoque une diminution de l'expression des récepteurs à la prolactine et des récepteurs aux neurotrophines à activité tyrosine kinase (Trk) par le biais d'une voie qui fait intervenir la PKA, entraînant finalement un effet antiprolifératif.¹⁹³

b. Voies de transduction du récepteur CB₂

Le récepteur CB₂, comme le récepteur CB₁, se couple avec une protéine G_{i/o} quand le récepteur est stimulé par l'AEA, induisant alors l'inhibition de l'AC de manière dose-dépendante et une réduction du taux d'AMPc dans les cellules transfectées CHO et les glandes salivaires de rat.^{194,195,196} Cependant, contrairement au récepteur CB₁, le récepteur CB₂ n'interagit pas directement avec les canaux ioniques.¹⁹⁷ Toutefois, aucune stimulation de l'AC n'a été observée après le traitement par la toxine pertussique, par opposition à ce qui avait été constaté pour le récepteur CB₁, indiquant que le récepteur CB₂ n'est pas couplé à une protéine de type G_s.^{198,199}

¹⁹³ Melck, D.; Rueda, D.; Galve-Roperh, I.; De Petrocellis, L.; Guzmán, M.; Di Marzo, V. Involvement of the cAMP/protein kinase A pathway and of mitogen-activated protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett.* **1999**, *463*, 235 - 240.

¹⁹⁴ Prestifilippo, J. P.; Fernandez-Solari, J.; De la Cal, C.; Iribarne, M.; Suburo, A. M.; Rettori, V.; McCann, S. M.; Elverdin, J. C. Inhibition of salivary secretion by activation of cannabinoid receptors. *Exp. Biol. Med.* **2006**, *231*, 1421 - 1429.

¹⁹⁵ Slipetz, D. M.; O'Neill, G. P.; Favreau, L.; Dufresne, C.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Guay, D.; Labelle, M.; Metters, K. M. Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 352 - 361.

¹⁹⁶ Gonsiorek, W.; Lunn, C.; Fan, X.; Narula, S.; Lundell, D.; Hipkin, R. W. Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: Antagonism by anandamide. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 1045 - 1050.

¹⁹⁷ Felder, C. C.; Joyce, K. E.; Briley, E. M.; Mansouri, J.; Mackie, K.; Blond, O.; Lai, Y.; Ma, A. L.; Mitchell, R. L. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 443 - 450.

¹⁹⁸ Glass, M.; Felder, C. C. Concurrent stimulation of cannabinoid CB₁ and dopamine D₂ receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a G_s linkage to the CB₁ receptor. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 5327 - 5333.

¹⁹⁹ Calandra, B.; Portier, M.; Kerneis, A.; Delpech, M.; Carillon, C.; Le Fur, G.; Ferrara, P.; Shire, D. Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB₁ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *374*, 445 - 455.

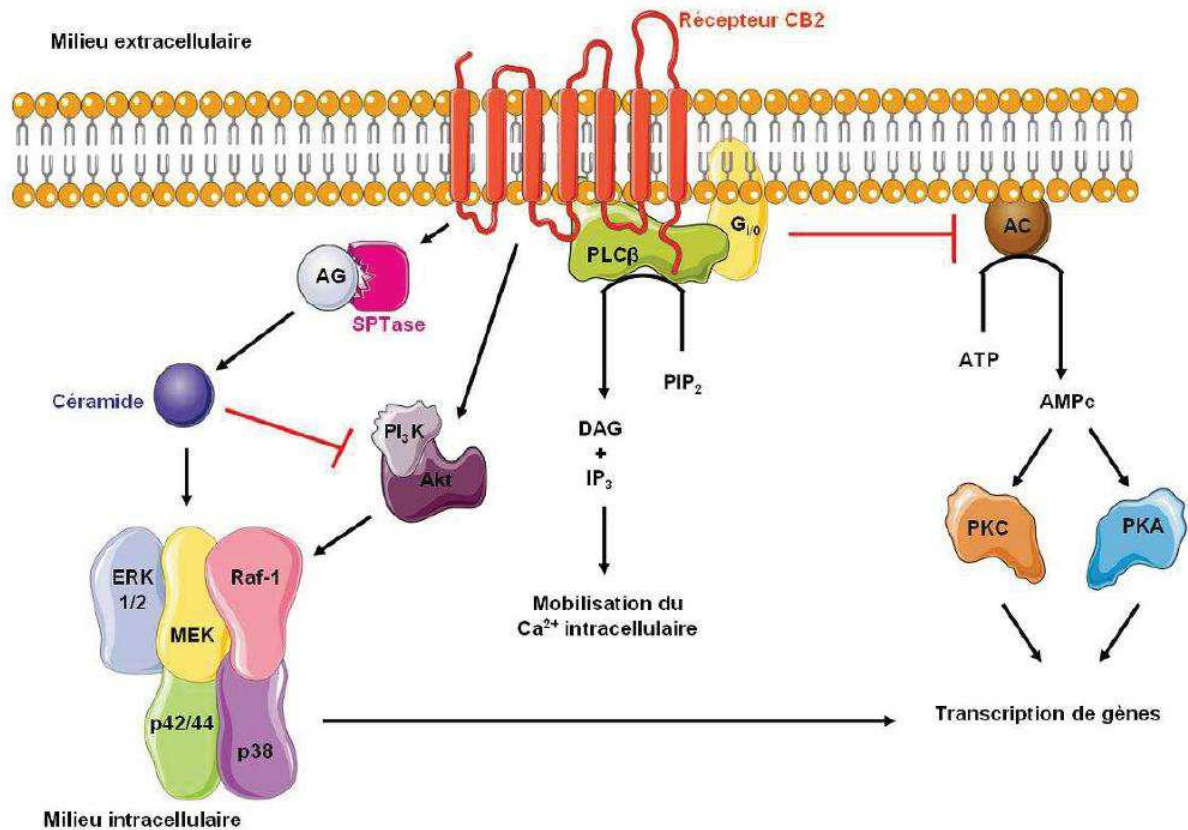


Figure 28. Voies de transduction associées au récepteur CB₂¹⁷⁶

Aussi la modulation des fonctions immunitaires exercées par les cannabinoïdes pourrait être expliquée par l'inhibition de la production d'AMPc induite par l'activation du récepteur CB₂²⁰⁰ ceci puisque la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 2 est contrôlée par plusieurs protéines kinases (PKA et PKC) et régulatrices (AP-1, NF-AT et NF-κB, cf. figure 28). Ainsi, la diminution intracellulaire du taux d'AMPc entraînerait une baisse de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

La stimulation du récepteur CB₂ exerce, comme le récepteur CB₁, un contrôle sur les MAPK. Il a notamment été montré que les cannabinoïdes stimulaient la p42/44 MAPK dans différentes lignées cellulaires (CHO et HL-60), et activaient le gène KROX-24 *via* la PKC.²⁰¹

²⁰⁰ Kaminski, N. E. Immune regulation by cannabinoid composés through the inhibition of the cyclic AMP signaling cascade and altered gene expression. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 1133 - 1140.

²⁰¹ Bouaboula, M.; Poinot-Chazel, C.; Marchand, J.; Canat, X.; Bourrie, B.; Rinaldi-Carmona, M.; Calandra, B.; Fur, G.; Casellas, P. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Euro. J. Biochem.* **1996**, *237*, 704 - 711.

Le WIN-55,212-2, un agoniste des récepteurs aux cannabinoïdes, a également été décrit comme un inhibiteur dose-dépendant de la phosphorylation de la p42/44 MAPK dans les cellules de rate de souris.²⁰²

Récemment, Bisicchia *et al* ont montré que la capacité des endocannabinoïdes et des glucocorticoïdes, utilisés indépendamment, à inhiber la production des cytokines pro-inflammatoire TNF α et immunorégulatrice IFN γ à partir des lymphocytes T humains activés, était perdue quand le récepteur CB₂ et le récepteur α aux glucocorticoïdes (GR α) étaient activés simultanément.²⁰³ Dans cette même étude, la double activation de CB₂ et GR α augmente le taux de JNK et réduit celui de la protéine du gène STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6), p-STAT6, contrôlant la régulation d'IL-4. Ces effets ont été inversés par un antagoniste CB₂, et non par un antagoniste GR α .

Le récepteur CB₂ est aussi impliqué dans la synthèse *de novo* de céramide, par l'activation de la sérine palmitoyltransférase (*cf.* figure 28).²⁰⁴ Une augmentation du taux de céramide intracellulaire permet d'inhiber la voie de survie tumorale PI₃K/Akt, ainsi que d'agir sur la voie des MAPK, notamment sur la protéine ERK, protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire.

Enfin, il a été montré dans des cellules endothéliales pulmonaires de veau que l'AEA induit un efflux d'ions Ca²⁺ (*cf.* figure 28). Cet effet résulte de l'activation de la PLC- β *via* la stimulation du récepteur CB₂, suivie de la libération des ions Ca²⁺ sous l'action de l'IP₃.²⁰⁵ Cependant, cet effet n'est pas retrouvé dans les cellules AtT20 (cellules murines de tumeurs hypophysaires corticotropes) transfectées par le récepteur CB₂ humain.¹⁹⁷

²⁰² Kaplan, F. B. L.; Kaminski, N. E. Cannabinoids inhibit the activation of ERK MAPK in PMA/IO-stimulated mouse splenocytes. *Int. Immunopharmacol.* **2003**, *3*, 1503 - 1510.

²⁰³ Bisicchia, E.; Chiurchiù, V.; Viscomi, M. T.; Latini, L.; Fezza, F.; Battistini, L.; Maccarrone, M.; Molinari, M. Activation of type-2 cannabinoid receptor inhibits neuroprotective and antiinflammatory actions of glucocorticoid receptor α : when one is better than two. *Cell Mol Life Sci.* **2013**, *70*, 2191 - 2204.

²⁰⁴ Mackie, K.; Hille, B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 3825 - 3829.

²⁰⁵ Zoratti, C.; Kipmen-Korgun, D.; Osibow, K.; Malli, R.; Graier, W. F. Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB₂ receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 1351 - 1362.

6. Les voies de biodégradation des endocannabinoïdes

a. La fatty acid amide hydrolase

i. Structure et distribution

La Fatty Acid Amid Hydrolase (FAAH) est une hydrolase de 63 kDa. Elle a été isolée et caractérisée en 1985,²⁰⁶ puis purifiée et séquencée en 1996 par Cravatt *et al.*²⁰⁷ Elle appartient à la famille des amidases à sérine et se compose de 579 acides aminés conservés à 73 % chez l'Homme, le rat, la souris et le porc, où elle a été clonée. Cependant, le pourcentage d'homologie inter-espèce atteint 90 % pour le domaine caractéristique des amidases situé entre les acides aminés 215 et 257.^{208,209}

La FAAH, chez l'Homme, est présente à la fois au niveau central et au niveau périphérique. On la localise essentiellement au niveau du foie, du rein, du poumon, de la prostate, du petit intestin et des testicules.²¹⁰ Au niveau central, la distribution de la protéine est remarquablement corrélée avec la présence du récepteur CB₁. Toutefois, il y a des régions riches en récepteurs où l'expression de l'enzyme est rare voire absente, comme dans le *globus pallidus*.²⁰⁷

La FAAH est une enzyme spécifique des dérivés d'acides gras à longues chaînes.²¹¹ Elle dégrade préférentiellement l'AEA, le PEA et l'OEA. Cependant, après invalidation génétique de la FAAH, les taux de PEA étaient 1000 fois supérieurs dans le cerveau et seulement 150 fois supérieurs dans le rein, ce qui permet d'affirmer que la FAAH n'est pas la seule enzyme qui puisse dégrader le PEA au niveau du rein.²¹²

En ce qui concerne le 2-AG, il est maintenant établi que sa biodégradation était prise en charge par une autre enzyme que la FAAH, la MAGL.

²⁰⁶ Schmid, P. C.; Zuzarte-Augustin, M. L.; Schmid, H. H. Properties of rat liver N-acyl ethanolamine amidohydrolase. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14145 - 14149.

²⁰⁷ Cravatt, B. F.; Giang, D. K.; Mayfield, S. P.; Boger, D. L.; Lerner, R. A.; Gilula, N. B. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* **1996**, *384*, 83 - 87.

²⁰⁸ Egertová, M.; Giang, D. K.; Cravatt, B. F.; Elphick, M. R. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc. Biol. Sci.* **1998**, *265*, 2081 - 2085.

²⁰⁹ McKinney, M. K.; Cravatt, B. F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 411 - 432.

²¹⁰ Labar, G.; Michaux, C. Fatty acid amide hydrolase: from characterization to therapeutics. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 1882 - 1902.

²¹¹ Deutsch, D. G.; Ueda, N.; Yamamoto, S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **2002**, *66*, 201 - 210.

²¹² Cravatt, B. F.; Saghatelian, A.; Hawkins, E. G.; Clement, A. B.; Bracey, M. H.; Lichtman, A. H. Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 10821 - 10826.

En 2006, Wei *et al.* ont identifié la FAAH-2 comme une seconde enzyme capable d'hydrolyser les NAEs *in vitro*. La FAAH-2 est exprimée chez les primates, les humains et bien d'autres espèces, mais la FAAH-2 est absente des génomes murins. Comme la FAAH, la FAAH-2 est une amidase à sérine d'environ 60 kDa qui hydrolyse préférentiellement l'OEA par rapport au PEA et à l'AEA. La FAAH-2 se retrouve dans le rein, le foie, les poumons et la prostate. Mais contrairement à la FAAH, la FAAH-2 n'est pas exprimée dans le cœur et les ovaires, ce qui suggère que chacune de ces enzymes pourrait contrôler des « réservoirs » de NAEs différents.^{213,214}

La FAAH ne circule pas librement dans le cytosol contrairement aux autres amidases à sérine. Elle est fortement liée à la membrane du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.²¹⁵ La FAAH est un dimère, avec des plateaux hydrophobes des deux monomères positionnés sur le même côté du dimère (*cf.* figure 29).²¹⁶ Cet agencement unilatéral renforcerait l'ancrage de l'enzyme et permettrait à chaque sous-unité de recruter de manière compétitive des substrats à partir de la membrane.

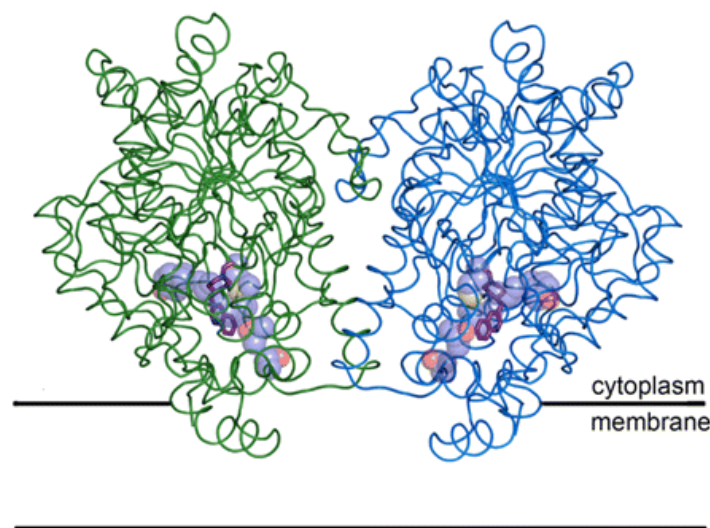


Figure 29. Structure de la FAAH liée à l'inhibiteur PF-750 (en mauve)²¹⁷

²¹³ Wei, B. Q.; Mikkelsen, T. S.; McKinney, M. K.; Lander, E. S.; Cravatt, B. F. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36569 - 36578.

²¹⁴ Kaczocha, M.; Glaser, S. T.; Chae, J.; Brown, D. A.; Deutsch, D. G. Lipid droplets are novel sites of *N*-acylethanolamine inactivation by fatty acid amide hydrolase-2. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 2796 - 2806.

²¹⁵ Egertova, M.; Cravatt, B. F.; Elphick, M. R. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and CB(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience.* **2003**, *119*, 481 - 496.

²¹⁶ Goparaju, S. K.; Ueda, N.; Taniguchi, K.; Yamamoto, S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 417 - 423.

²¹⁷ Mileni, M.; Johnson, D. S.; Wang, Z.; Everdeen, D. S.; Liimatta, M.; Pabst, B.; Bhattacharya, K.; Nugent, R. A.; Kamtekar, S.; Cravatt, B. F.; Ahn, K.; Stevens, R. C. Structure-guided inhibitor design for human FAAH by interspecies active site conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 12820 - 12824.

Cette enzyme possède 3 zones distinctes caractéristiques avec chacune un rôle important (cf. figure 30). Tout d'abord, les acides aminés 9 à 29 du domaine *N*-terminal forment une ouverture localisée à proximité de la région de fixation de l'enzyme à la membrane. Cette ouverture, appelée la « membrane access channel » (MAC), serait le chemin d'entrée des substrats ou inhibiteurs vers le site catalytique.²¹⁸ La FAAH possède aussi une autre ouverture étroite de nature hydrophile, appelée port cytosolique, qui se compose essentiellement de résidus polaires comme la sérine 217, la lysine 142 et la thréonine 236. Elle permet la libération des groupes partants polaires vers le cytosol, comme l'éthanolamine pour les *N*-acyléthanolamides, ainsi que l'apport de molécules d'eau au site catalytique.^{219,220} Il semblerait en effet que des molécules d'eau permettent une liaison hydrogène indirecte entre la Thr236 et la lys142.²²¹ Ensuite, une poche étroite, longue et bien plus hydrophobe que le port cytosolique accueille les longues chaînes grasses présentes sur les substrats de l'enzyme et constitue « l'acyl binding pocket » (ABP).²²²

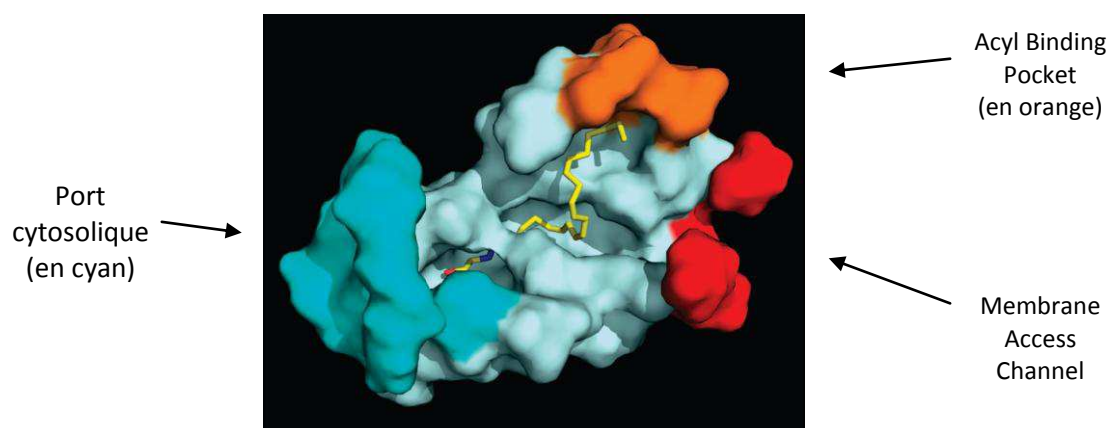


Figure 30. Modélisation moléculaire de la FAAH et de l'anandamide (en jaune)²¹⁸

²¹⁸ Seierstad, M.; Breitenbucher, J. G. Discovery and development of fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7327 - 7343.

²¹⁹ Chebrou, H.; Bigey, F.; Arnaud, A.; Galzy, P. Study of the Amidase Signature Group. *Biochem. Biophys. Acta.* **1996**, *1298*, 285 - 293.

²²⁰ Mileni, M.; Garfinkle, J.; Ezzili, C.; Cravatt, B. F.; Stevens, R. C.; Boger, D. L. Fluoride-mediated capture of a noncovalent bound state of a reversible covalent enzyme inhibitor: X-ray crystallographic analysis of an exceptionally potent α -keto-heterocycle inhibitor of fatty acid amide hydrolase. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4092 - 4100.

²²¹ Mileni, M.; Garfinkle, J.; DeMartino, J. K.; Cravatt, B. F.; Boger, D. L.; Stevens, R. C. Binding and inactivation mechanism of a humanized fatty acid amide hydrolase by α -keto-heterocycle inhibitors revealed from cocrystal structures. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10497 - 10506.

²²² McKinney, M. K.; Cravatt, B. F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 411 - 432.

ii. Propriétés catalytiques

Des études de mutagenèse dirigée ont révélé une caractéristique propre à la FAAH. En effet, la FAAH n'hydrolyse pas ses substrats par le biais d'une triade catalytique classique de type sérine-histidine-acide aspartique, mais par une triade composée des sérines 217 et 241 et de la lysine 142.²²³

Son mécanisme hydrolytique a été décrit pour l'AEA (cf. figure 31). Celui-ci débute par la déprotonation de la sérine 217 par la lysine 142 ; puis la sérine 217 déprotonne à son tour la sérine 241 qui vient s'additionner sur le carbonyle de la fonction amide de l'AEA, produisant un intermédiaire tétraédrique. L'intermédiaire chargé récupère alors un proton de la sérine 217 permettant la formation d'un autre zwitterion et l'acylation de la sérine 241. Enfin, l'alcoolate de la sérine 217 arrache un proton à l'ammonium de la lysine 142, ce qui provoque le retour de la FAAH sous sa forme non chargée.²¹⁸

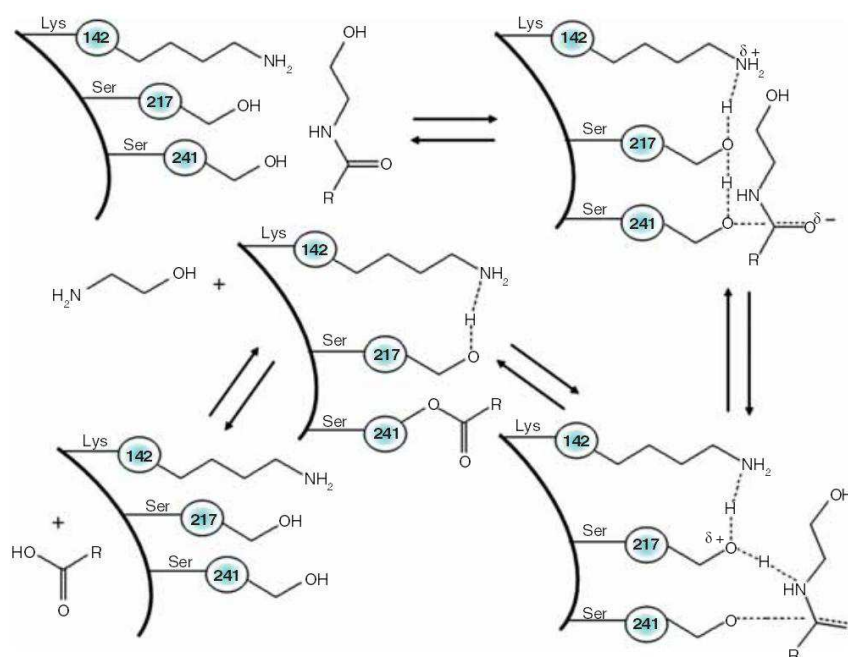


Figure 31. Mécanisme de l'hydrolyse de l'anandamide par la FAAH²²⁴

²²³ Patricelli, M. P.; Cravatt, B. F. Fatty acid amide hydrolase competitively degrades bioactive amides and esters through a nonconventional catalytic mechanism. *Biochemistry* **1999**, *38*, 14125 - 14130.

²²⁴ Bisogno, T.; Maccarrone, M. Latest advances in the discovery of fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Expert Opin. Drug Discov.* **2013**, *8*, 509 - 522.

Cette hydrolyse se situe au centre d'une « sphère » de 4 liaisons amide N-H, comprenant l'isoleucine 238, la glycine 239, la glycine 240 et la serine 241. Cette « sphère », appelée plus communément « la poche à oxyanion », stabilise le mécanisme hydrolytique de l'enzyme avec l'aide d'interactions secondaires fournies par l'acide aspartique 237, l'arginine 243 et l'asparagine 498.²¹⁸

iii. Les inhibiteurs de la FAAH

Depuis l'identification de la FAAH, de nombreux inhibiteurs et de nombreuses relations structure-activité ont été décrits dans la littérature, ce qui confirme l'intérêt thérapeutique de cette enzyme. Ces inhibiteurs ont été classés en plusieurs familles. Au début, ce furent des dérivés de l'acide arachidonique puis petit à petit, les chercheurs se sont affranchis des dérivés d'acides gras, peu sélectifs, pour concevoir des inhibiteurs de type α -kétohétérocyle, β -lactame, thiohydantoïne, sulfonyle, acide boronique, organophosphate, 1,3,4-oxadiazole-2(3H)-one, carbamate ou urée.

Plusieurs dérivés d'acides gras, analogues du fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), un des premiers inhibiteurs de la FAAH, ont été décrits ces derniers temps, comme l'AM374²²⁵ ou encore l'AM3506 (cf. figure 32).^{226,227} L'AM3506 bloque notamment la FAAH *in vivo* conduisant à une perte d'activité de la FAAH presque complète dans le cerveau.

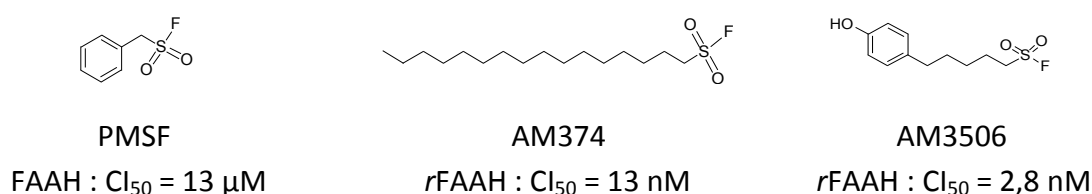


Figure 32. Structure chimique du PMSF, de l'AM374 et de l'AM3506

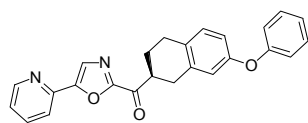
La famille des α -kétohétérocyles, avec comme chef de file l'OL-135 (cf. figure 33), a été l'une des premières classes d'inhibiteurs sélectifs de la FAAH.

²²⁵ Deutsch, D. G.; Lin, S.; Hill, W. A.; Morse, K. L.; Salehani, D.; Arreaza, G.; Omeir, R. L.; Makriyannis, A. Fatty acid sulfonyl fluorides inhibit anandamide metabolism and bind to the cannabinoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *231*, 217 - 221.

²²⁶ Godlewski, G.; Alapafuja, S. O.; Bátkai, S.; Nikas, S. P.; Cinar, R.; Offertáler, L.; Osei-Hyiaman, D.; Liu, J.; Mukhopadhyay, B.; Harvey-White, J.; Tam, J.; Pacak, K.; Blankman, J. L.; Cravatt, B. F.; Makriyannis, A.; Kunos, G. Inhibitor of fatty acid amide hydrolase normalizes cardiovascular function in hypertension without adverse metabolic effects. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1256 - 1266.

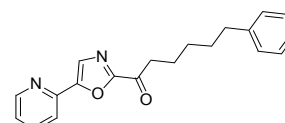
²²⁷ Alapafuja, S. O.; Nikas, S. P.; Bharathan, I. T.; Shukla, V. G.; Nasr, M. L.; Bowman, A. L.; Zvonok, N.; Li, J.; Shi, X.; Engen, J. R.; Makriyannis, A. Sulfonyl Fluoride Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10074 - 10089.

L'OL-135 inhibe de façon réversible la FAAH *in vivo*,²²⁸ multipliant par 3 le taux d'AEA cérébral et les effets anti-nociceptifs CB₁-dépendants.^{229,230}



Composé 12 (Ezzili *et al*)

*h*FAAH : Cl₅₀ = 5,8 nM



OL-135

*h*FAAH : Cl₅₀ = 4,7 nM

Figure 33. Structures chimiques de l'OL-135 et de l'un de ses dérivés

Bien que sélectif pour la FAAH au niveau du SNC, l'OL-135 ne montre qu'une faible durée d'action (4 heures). Aussi, de nombreux dérivés de l'OL-135 ont été synthétisés dans le but d'améliorer le temps de demi-vie.²³¹ Récemment, l'administration orale d'un dérivé de l'OL-135 (composé 12, Ezzili *et al*) a augmenté significativement le taux d'AEA cérébrale et a produit des effets anti-nociceptifs pendant plus de 9 heures.²³²

Le mécanisme d'inhibition de la FAAH par l'OL-135 débute par l'addition de la sérine 241 de l'enzyme sur la cétone de l'OL-135 générant un intermédiaire tétraédrique stabilisé par une liaison π s'établissant entre l'oxazole et le proton de la sérine 217 (*cf.* figure 34). La formation de cet intermédiaire est réversible, c'est pourquoi l'OL-135 est qualifié d'inhibiteur réversible et covalent.^{221,233}

²²⁸ Otrubova, K.; Boger, D. L. α -Ketoheterocycle-based inhibitors of fatty acid amide hydrolase (FAAH). *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 340 - 348.

²²⁹ Lichtman, A. H.; Leung, D.; Shelton, C. C.; Saghatelian, A.; Hardouin, C.; Boger, D. L.; Cravatt, B. F. Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *311*, 441 - 448.

²³⁰ Boger, D. L.; Miyauchi, H.; Du, W.; Hardouin, C.; Fecik, R. A.; Cheng, H.; Hwang, I.; Hedrick, M. P.; Leung, D.; Acevedo, O.; Guimarães, C. R.; Jorgensen, W. L.; Cravatt, B. F. Discovery of a potent, selective, and efficacious class of reversible α -ketoheterocycle inhibitors of fatty acid amide hydrolase effective as analgesics. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1849 - 1856.

²³¹ Otrubova, K.; Ezzili, C.; Boger, D. L. The discovery and development of inhibitors of fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Bioorg Med Chem Lett.* **2011**, *21*, 4674 - 4685.

²³² Ezzili, C.; Mileni, M.; McGlinchey, N.; Long, J. Z.; Kinsey, S. G.; Hochstatter, D. G.; Stevens, R. C.; Lichtman, A. H.; Cravatt, B. F.; Bilsky, E. J.; Boger, D. L. Reversible competitive α -ketoheterocycle inhibitors of fatty acid amide hydrolase containing additional conformational constraints in the acyl side chain: orally active, long-acting analgesics. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2805 - 2822.

²³³ Mileni, M.; Garfunkle, J.; Ezzili, C.; Kimball, F. S.; Cravatt, B. F.; Stevens, R. C.; Boger, D. L. X-ray crystallographic analysis of α -ketoheterocycle inhibitors bound to a humanized variant of fatty acid amide hydrolase. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 230 - 240.

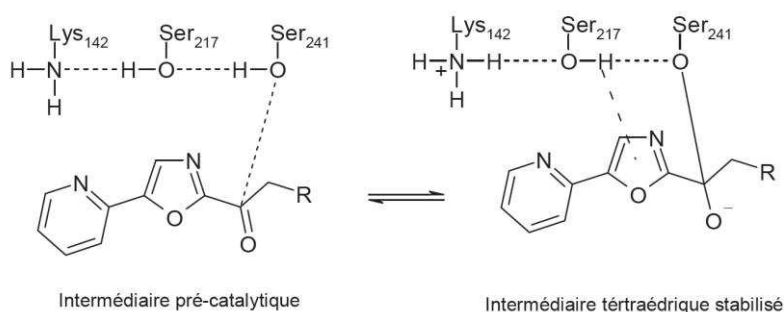


Figure 34. Formation de l'intermédiaire tétraédrique lors de l'inhibition de la FAAH par l'OL-135

La seconde grande famille d'inhibiteurs de la FAAH est celle des carbamates. Dans cette classe, nous retrouvons les *O*-aryl carbamates, avec l'URB597 comme inhibiteur référence, et les oxymes et énols carbamates, avec le BMS-469908 et le ST4070.

L'URB597 est l'un des plus puissants inhibiteurs de la FAAH connu à ce jour (*cf.* figure 35), il a été mis au point à partir de modifications effectuées sur des dérivés carbamiques, connus comme étant des inhibiteurs d'acétylcholinestérase (AChE).^{234,235}

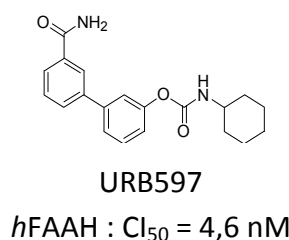


Figure 35. Structure chimique de l'URB597

L'URB597 et les autres carbamates inhibiteurs de la FAAH se lient de manière covalente au site catalytique de l'enzyme par carbamoylation de la sérine 241 et modifie de façon irréversible l'enzyme (*cf.* figure 36).²³⁶ Ainsi, les carbamates sont des inhibiteurs irréversibles de la FAAH.

²³⁴ Tarzia, G.; Duranti, A.; Tontini, A.; Piersanti, G.; Mor, M.; Rivara, S.; Plazzi, P. V.; Park, C.; Kathuria, S.; Piomelli, D. Design, synthesis, and structure-activity relationships of alkylcarbamic acid aryl esters, a new class of fatty acid amide hydrolase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2352 - 2360.

²³⁵ Mor, M.; Rivara, S.; Lodola, A.; Plazzi, P. V.; Tarzia, G.; Duranti, A.; Tontini, A.; Piersanti, G.; Kathuria, S.; Piomelli, D. Cyclohexylcarbamic acid 3'- or 4'-substituted biphenyl-3-yl esters as fatty acid amide hydrolase inhibitors: synthesis, quantitative structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4998 - 5008.

²³⁶ Alexander, J. P.; Cravatt, B. F. Mechanism of carbamate inactivation of FAAH: implications for the design of covalent inhibitors and in vivo functional probes for enzymes. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1179 - 1187.

De plus, des études de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse ont permis d'identifier le groupement *O*-biaryle de l'URB597 comme le groupe partant dans le mécanisme d'inhibition irréversible de la FAAH, et de localiser le groupement cyclohexyle au niveau de l'ABP.²³⁶

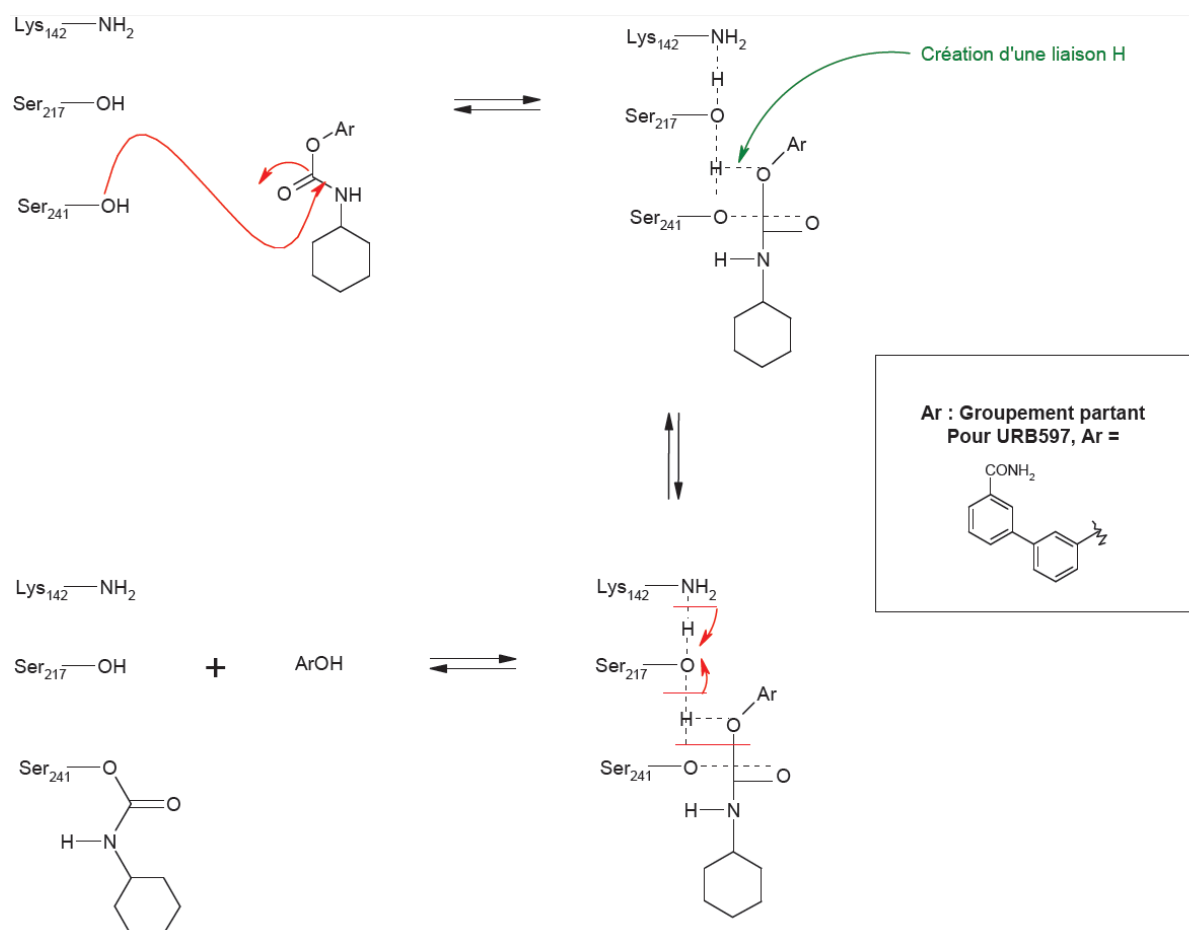


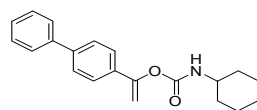
Figure 36. Mécanisme d'inhibition de la FAAH par l'URB597

L'URB597 est probablement le composé le plus documenté pharmacologiquement. Des études ont montré que ce produit a une grande sélectivité pour la FAAH par rapport à l'AChE, aux récepteurs aux cannabinoïdes CB₁ et CB₂ ou encore à la MAGL.²³⁷ Aussi, l'administration de l'URB597 chez le rat a permis d'augmenter significativement les niveaux d'AEA, sans toutefois induire d'effets cannabinoïdiques comme la catalepsie, l'hyperphagie ou l'hypothermie.²³⁸

²³⁷ Kathuria, S.; Gaetani, S.; Fegley, D.; Valino, F.; Duranti, A.; Tontini, A.; Mor, M.; Tarzia, G.; La Rana, G.; Calignano, A.; Giustino, A.; Tattoli, M.; Palmery, M.; Cuomo, V.; Piomelli, D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 76 - 81.

²³⁸ Cravatt, B. F.; Saghatelian, A.; Hawkins, E. G.; Clement, A. B.; Bracey, M. H.; Lichtman, A. H. Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 10821 - 10826.

Son administration *in vivo* a mis en évidence des effets anxiolitiques chez la souris ainsi que des effets analgésiques dans plusieurs modèles murins de douleur neuropathique.²⁴⁶

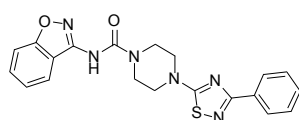


ST4070

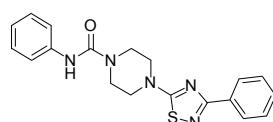
hFAAH : $CI_{50} = 33$ nM

Figure 38. Structure chimique du ST4070

Afin d'apporter de l'originalité aux structures, d'autres firmes pharmaceutiques comme Takeda, Janssen ou Pfizer ont remplacé le groupement carbamate par un motif urée, ce qui a été l'origine des inhibiteurs de type pipérazine et pipéridine arylurée (cf. figure 39). Comme les carbamates, les urées inhibent l'enzyme de manière covalente²⁴⁷ et présente des propriétés thérapeutiques intéressantes.²⁴⁸

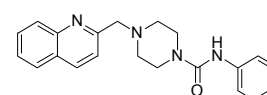


WO2006054652



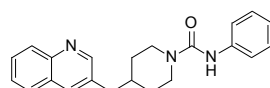
JNJ-1661010

FAAH : $CI_{50} = 12$ nM



PF-622

FAAH : $CI_{50} = 19$ nM



PF-750

FAAH : $CI_{50} = 16$ nM

Figure 39. Structures chimiques de différentes urées, inhibiteurs de la FAAH

²⁴⁶ Caprioli, A.; Coccorello, R.; Rapino, C.; Di Serio, S.; Di Tommaso, M.; Vertechy, M.; Vacca, V.; Battista, N.; Pavone, F.; Maccarrone, M.; Borsini, F. The novel reversible fatty acid amide hydrolase inhibitor ST4070 increases endocannabinoid brain levels and counteracts neuropathic pain in different animal models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *342*, 188 - 195.

²⁴⁷ Ahn, K.; Johnson, D. S.; Fitzgerald, L. R.; Liimatta, M.; Arendse, A.; Stevenson, T.; Lund, E. T.; Nugent, R. A.; Nomanbhoy, T. K.; Alexander, J. P.; Cravatt, B. F. Novel mechanistic class of fatty acid amide hydrolase inhibitors with remarkable selectivity. *Biochemistry* **2007**, *46*, 13019 - 13030.

²⁴⁸ Breitenbucher, J. G. Inhibitors of fatty acid amide hydrolase. In *nociception: taking the pain out of drug discovery*, SCI: London, U. K., **2006**.

Dernièrement, les études de chimie médicinale sur le composé PF-3845 ont mené à la découverte du composé PF-04457845, un inhibiteur irréversible de la FAAH puissant, sélectif et actif par voie orale sur des modèles murins de douleurs inflammatoires et non-inflammatoires (cf. figure 40).^{249,250} Aussi, le PF-04457845 a montré de bons résultats en phase 1 d'essais cliniques en multipliant par 3,5 fois voire 10 fois les taux de NAE.²⁵¹ Cependant, il n'a pas montré d'action analgésique en phase 2 d'essais cliniques chez les patients atteints d'arthrite du genou.²⁵²



Figure 40. Structures chimiques

Enfin, à côté de ces principales familles d'inhibiteurs de la FAAH, de nombreuses autres molécules inhibitrices de la FAAH aux structures originales ont été décrites dans la littérature (cf. figure 41).

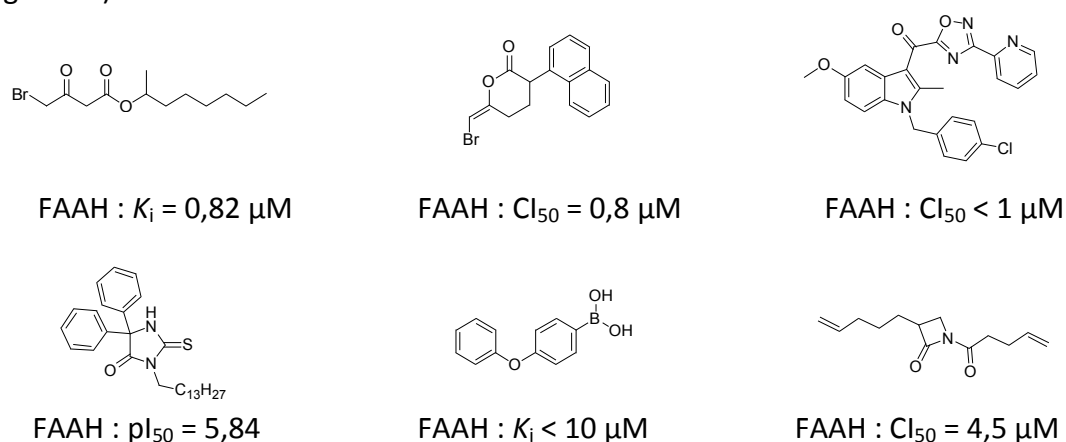


Figure 41. Diverses structures chimiques d'inhibiteurs de la FAAH

²⁴⁹ Ahn, K.; Smith, S. E.; Liimatta, M. B.; Beidler, D.; Sadagopan, N.; Dudley, D. T.; Young, T.; Wren, P.; Zhang, Y.; Swaney, S.; Van Becelaere, K.; Blankman, J. L.; Nomura, D. K.; Bhattachar, S. N.; Stiff, C.; Nomanbhoy, T. K.; Weerapana, E.; Johnson, D. S.; Cravatt, B. F. Mechanistic and pharmacological characterization of PF-04457845: a highly potent and selective fatty acid amide hydrolase inhibitor that reduces inflammatory and noninflammatory pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *338*, 114 - 124.

²⁵⁰ Johnson, D. S.; Stiff, C.; Lazerwith, S. E.; Kesten, S. R.; Fay, L. K.; Morris, M.; Beidler, D.; Liimatta, M. B.; Smith, S. E.; Dudley, D. T.; Sadagopan, N.; Bhattachar, S. N.; Kesten, S. J.; Nomanbhoy, T. K.; Cravatt, B. F.; Ahn, K. Discovery of PF-04457845: A highly potent, orally bioavailable, and selective urea FAAH inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 91 - 96.

²⁵¹ Li, G. L.; Winter, H.; Arends, R.; Jay, G. W.; Le, V.; Young, T.; Huggins, J. P. Assessment of the pharmacology and tolerability of PF-04457845, an irreversible inhibitor of fatty acid amide hydrolase-1, in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *73*, 706 - 716.

²⁵² Huggins, J. P.; Smart, T. S.; Langman, S.; Taylor, L.; Young, T. An efficient randomised, placebo-controlled clinical trial with the irreversible fatty acid amide hydrolase-1 inhibitor PF-04457845, which modulates endocannabinoids but fails to induce effective analgesia in patients with pain due to osteoarthritis of the knee. *Pain* **2012**, *153*, 1837 - 1846.

b. *La monoacylglycerol lipase*

i. *Structure et distribution*

La MAGL est une enzyme ubiquitaire de 33k Da de la famille des α/β -hydrolases et isolée en 1976 par Tornqvist *et al.*^{253,254,255} La MAGL est bien conservée entre les espèces avec une homologie entre l'ADN murin et l'ADN humain de 85 %. Chez l'Homme, la souris et le rat où elle a été clonée, cette enzyme est constituée de 303 acides aminés.²⁵⁶

La MAGL possède une distribution proche de celle de la FAAH, à la fois centrale et périphérique. Elle a été retrouvée notamment dans le foie, le tractus gastro-intestinal ou encore le tissu adipeux.^{257,258} Aussi, il a été remarqué une certaine corrélation au niveau central entre la présence de la MAGL et celle du récepteur CB₁, comme dans l'hippocampe, le cortex et le cerebellum.²⁵⁹

Les ligands endogènes de cette enzyme sont principalement des dérivés d'acides gras à longue et moyenne chaîne comme l'acide myristique, palmitique, oléique, stéarique ou arachidonique. Toutefois, la MAGL hydrolyse préférentiellement l'acide oléique et l'acide arachidonique.²⁶⁰

Bien que cela ne soit pas encore prouvé, il semble que le site actif de la MAGL soit orienté face à la membrane afin de recruter directement ses substrats lipidiques (*cf.* figure 42). Par ailleurs, le mode de recrutement des ligands pour le récepteur CB₁, soit par voie extracellulaire ou latéralement *via* la membrane lipidique, n'est pas totalement connu.

²⁵³ Tornqvist, H.; Belfrage, P. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 813 - 819.

²⁵⁴ Basavarajappa, B. S. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein. Pept. Lett.* **2007**, *14*, 237 - 246.

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

²⁵⁶ Hogestatt, E. D.; Jonsson, B. A.; Ermund, A.; Andersson, D. A.; Bjork, H.; Alexander, J. P.; Cravatt, B. F.; Basbaum, A.; I.; Zygmunt, P. M. Conversion of acetaminophen to the bioactive *N*-acetylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31405 - 31412.

²⁵⁷ Long, J. Z.; Nomura, D. K.; Cravatt, B. F. Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 744 - 753.

²⁵⁸ Duncan, M.; Thomas, A. D.; Cluny, N. L.; Patel, A.; Patel, K. D.; Lutz, B.; Piomelli, D.; Alexander, S. P.; Sharkey, K. A. Distribution and function of monoacylglycerol lipase in the gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2008**, *295*, 1255 - 1265.

²⁵⁹ Dinh, T. P.; Carpenter, D.; Leslie, F. M.; Freund, T. F.; Katona, I.; Sensi, S. L.; Kathuria, S.; Piomelli, D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 10819 - 10824.

²⁶⁰ Saario, S. M.; Laitinen, J. T. Monoglyceride lipase as an enzyme hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biodivers.*, **2007**, *4*, 1903 - 1913.

Ainsi, la MAGL pourrait contrôler en partie l'activité du récepteur CB₁, dans le cas d'un recrutement de ligands *via* la membrane.²⁶¹

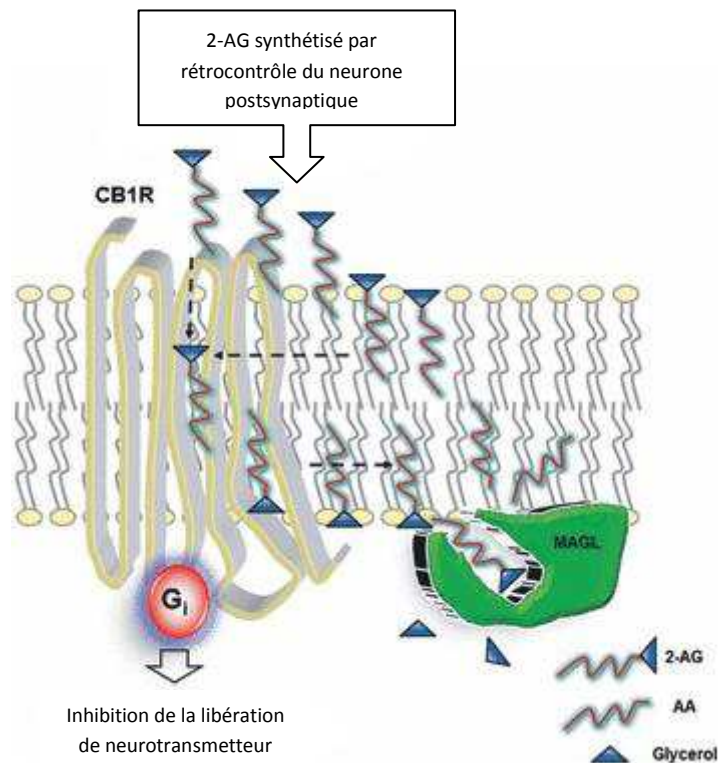


Figure 42. Représentation hypothétique du mécanisme d'action de la MAGL²⁶¹

Grâce à la diffraction aux rayons X du cristal de la MAGL humaine, nous pouvons remarquer que l'enzyme est constituée de deux monomères reliés entre eux par une surface de 884 Å², soit 7 % du monomère.^{262,263} D'un point de vue structural, la MAGL s'articule autour d'un feuillet central constitué de sept brins β parallèles et d'un brin β antiparallèle, encerclé par six hélices α (*cf.* figure 43). Un domaine couronne, variable selon les membres de la famille des α/β hydrolases, surmonte le feuillet central ainsi que le site actif et cache la triade catalytique composée de la sérine 132, de l'acide aspartique 249 et de l'histidine 279.²⁵⁵ La sérine 132 s'insère dans la séquence consensus GX SXG entre l'hélice α3 et le brin β5, au niveau de la partie appelée « coude nucléophile ».

²⁶¹ Savinainen, J. R.; Saario, S. M.; Laitinen, J. T. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol.* **2012**, *204*, 267 - 276.

²⁶² Labar, G.; Bauvois, C.; Borel, F.; Ferrer, J. L.; Wouters, J.; Lambert, D. M. Crystal structure of the human monoacylglycerol lipase, a key actor in endocannabinoid signaling. *Chembiochem.* **2010**, *11*, 218 - 227.

²⁶³ Bertrand, T.; Augé, F.; Houtmann, J.; Rak, A.; Vallée, F.; Mikol, V.; Berne, P. F.; Michot, N.; Cheuret, D.; Hoornaert, C.; Mathieu, M. Structural basis for human monoglyceride lipase inhibition. *J. Mol. Biol.* **2010**, *396*, 663 - 673.

Enfin, la poche à oxanion stabilisant l'intermédiaire anionique lors de l'hydrolyse, est constituée de l'extrémité -NH de l'alanine 61 et de la méthionine 133. Quatre cystéines, dont la cystéine 208 et la cystéine 242, ont également été localisées à une courte distance du site actif, et ont servi de cibles dans la conception d'inhibiteurs de la MAGL.^{264,265,266}

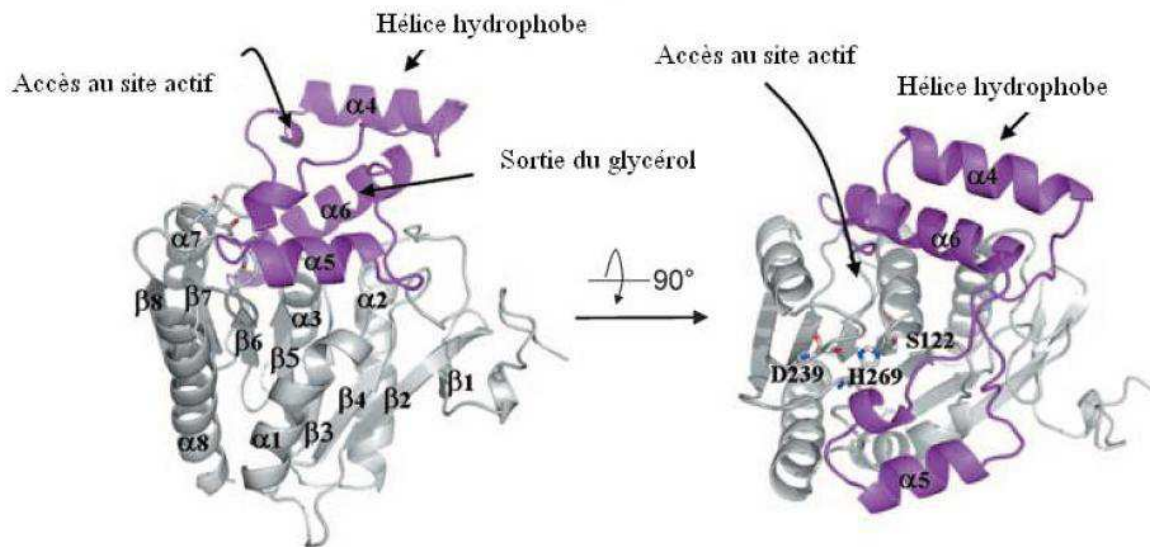


Figure 43. Illustration d'un monomère de la MAGL avec le domaine couronne en violet

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

²⁶⁴ Saario, S. M. Characterization of the sulfhydryl-sensitive site in the enzyme responsible for hydrolysis of 2-arachidonoyl-glycerol in rat cerebellar membranes. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 649 - 656.

²⁶⁵ King, A. R.; Lodola, A.; Carmi, C.; Fu, J.; Mor, M.; Piomelli, D. A critical cysteine residue in monoacylglycerol lipase is targeted by a new class of isothiazolinone-based enzyme inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 974 - 983.

²⁶⁶ Kapanda, C. N.; Muccioli, G. G.; Labar, G.; Poupaert, J. H.; Lambert, D. M. Bis-(dialkylaminethiocarbonyl) - disulfides as Potent and Selective Monoglyceride Lipase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7310 - 7314.

Dans la partie supérieure du domaine de la MAGL, la première hélice ($\alpha 4$) a été déplacée de 15 Å vers l'extérieur tandis que la seconde hélice a été remplacée par une longue boucle connectant l'hélice $\alpha 4$ à l'hélice $\alpha 5$. De manière similaire, dans la partie inférieure du domaine, une longue boucle comprenant dix résidus (de 197 à 206) connecte l'hélice $\alpha 5$ à l'hélice $\alpha 6$. Ainsi, du fait de ces modifications structurales, la structure en forme de V retrouvée chez les halopéroxydases et les estérases est remplacée par une structure évasée en forme de U offrant à la MAGL un accès plus large pour ses substrats.

ii. Propriétés catalytiques

L'hydrolyse des substrats de la MAGL s'effectue par le biais d'une triade catalytique caractéristique des hydrolases à sérines faisant intervenir un résidu sérine dont la nucléophilie est augmentée par la présence d'un acide aspartique et d'une histidine. Cette triade catalytique se compose de la sérine 132, de l'acide aspartique 249 et de l'histidine 279 (cf. figure 44).²⁵⁵

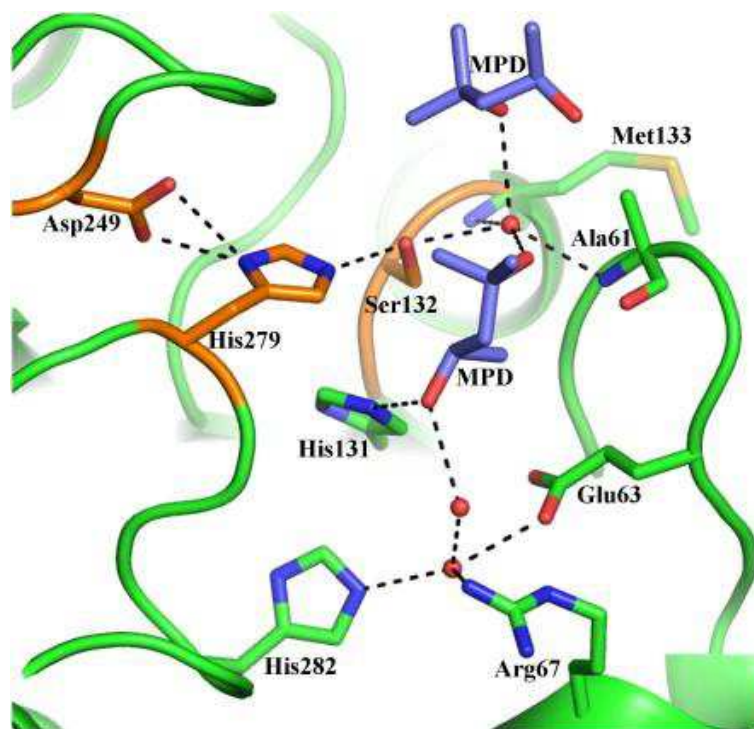


Figure 44. Co-cristallisation de la MAGL avec le 2-méthyl-2,4-pentanediole (MPD). En orange sont représentés les acides aminés formant la triade catalytique.²⁶³

Aussi, comme pour la FAAH, on peut supposer que l'acide aspartique 249 déprotonne l'histidine 279 qui, à son tour, arrache le proton de la sérine 132. Ensuite, l'alcoolate réalise une réaction d'addition-élimination sur le carbonyle de la fonction ester du 2-AG pour libérer le glycérol dans le milieu.

iii. Les inhibiteurs de la MAGL

L'inactivation de la MAGL *in vivo* a, depuis plusieurs années, montré de l'intérêt dans le traitement de la douleur, de l'anxiété ou encore de l'inflammation.^{267,268}

La MAGL est généralement inhibée par les inhibiteurs d'hydrolases à sérine comme le PMSF, qui inhibe également la FAAH.²⁵⁹ Cependant, contrairement aux autres hydrolases à sérine, la MAGL est aussi inhibée par des agents réactifs aux cystéines comme l'acide *p*-chloromercuribenzoïque ou la *N*-éthylmaléimide, ce qui confirme le rôle clé d'un résidu cystéine dans l'inhibition.^{253,269}

Dans la première génération d'inhibiteurs de la MAGL, nous retrouvons l'URB602, un carbamate avec une faible activité inhibitrice non-compétitive et partiellement réversible, pour la MAGL (*cf.* figure 45).²⁷⁰ Son administration a notamment révélé une action nociceptive dans des modèles de douleurs aiguë, inflammatoire et neuropathique.^{271,272,273}

²⁶⁷ Minkkilä, A.; Saario, S. M.; Nevalainen, T. Discovery and development of endocannabinoid-hydrolyzing enzyme inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 828 - 858.

²⁶⁸ Nomura, D. K.; Morrison, B. E.; Blankman, J. L.; Long, J. Z.; Kinsey, S. G.; Marcondes, M. C. G.; Ward, A. M.; Hahn, Y. K.; Lichtman, A. H.; Conti, B.; Cravatt, B. F. Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science*. **2011**, *334*, 809 - 813.

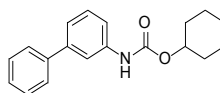
²⁶⁹ Sakurada, T.; Noma, A. Subcellular localization and some properties of monoacylglycerol lipase in rat adipocytes. *J. Biochem.* **1981**, *90*, 1413 - 1419.

²⁷⁰ Hohmann, A. G.; Suplita, R. L.; Bolton, N. M.; Neely, M. H.; Fegley, D.; Mangieri, R.; Krey, J. F.; Walker, J. M.; Holmes, P. V.; Crystal, J. D.; Duranti, A.; Tontini, A.; Mor, M.; Tarzia, G.; Piomelli, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* **2005**, *435*, 1108 - 1112.

²⁷¹ Comelli, F.; Giagnoni, G.; Bettoni, I.; Colleoni, M.; Costa, B. The inhibition of monoacylglycerol lipase by URB602 showed an anti-inflammatory and antinociceptive effect in a murine model of acute inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 787 - 794.

²⁷² Guindon, J.; Desroches, J.; Dani, M.; Beaulieu, P. Pre-emptive antinociceptive effects of a synthetic cannabinoid in a model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *568*, 173 - 176.

²⁷³ Desroches, J.; Guindon, J.; Lambert, C.; Beaulieu, P. Modulation of the antinociceptive effects of 2-arachidonoyl glycerol by peripherally administered FAAH and MGL inhibitors in a neuropathic pain model. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *155*, 913 - 924.

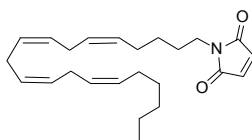


URB602

MAGL : $CI_{50} = 28 \mu\text{M}$

Figure 45. Structure chimique de l'URB602

Nous retrouvons également le *N*-arachidonoyl maleimide (NAM). Le NAM fait partie des agents cystéine-réactifs. Il s'agit d'un inhibiteur irréversible qui établit une liaison covalente avec la sérine 132 (cf. figure 46).^{274,275} Une série d'isothiazolinones a aussi été décrite comme inhibant la MAGL mais cette fois-ci de manière réversible *via* la cystéine 208.²⁷⁶

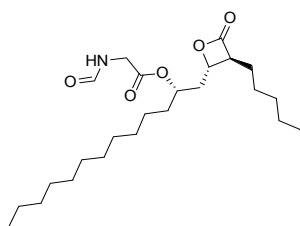


NAM

MAGL : $CI_{50} = 140 \text{ nM}$

Figure 46. Structure chimique du NAM

Parmi ces inhibiteurs de première génération, le dérivé tétrahydrolipostatine, l'OMDM169, a montré une inhibition sélective de la MAGL par rapport à la FAAH, ainsi qu'une inhibition de la lipase pancréatique et de la DAGL α (cf. figure 47). L'OMDM169 a révélé une diminution de la douleur sur modèle murin.²⁷⁷



OMDM169

MAGL : $CI_{50} = 0,89 \mu\text{M}$

Figure 47. Structure chimique de l'OMDM169

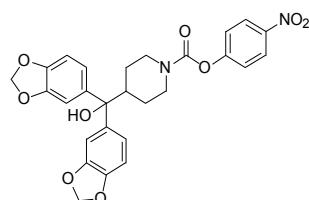
²⁷⁴ Saario, S. M.; Salo, O. M.; Nevalainen, T.; Poso, A.; Laitinen, J. T.; Jarvinen, T.; Niemi, R. Characterization of the sulfhydrylsensitive site in the enzyme responsible for hydrolysis of 2-arachidonoyl-glycerol in rat cerebellar membranes. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 649 - 656.

²⁷⁵ Maruszak, N.; Muccioli, G. G.; Labar, G.; Lambert, D. M. Synthesis and in vitro evaluation of N-substituted maleimide derivatives as selective monoglyceride lipase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7410 - 7420.

²⁷⁶ King, A. R.; Lodola, A.; Carmi, C.; Fu, J.; Mor, M.; Piomelli, D. A critical cysteine residue in monoacylglycerol lipase is targeted by a new class of isothiazolinone-based enzyme inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 974 - 983.

²⁷⁷ Bisogno, T.; Ortar, G.; Petrosino, S.; Morera, E.; Palazzo, E.; Nalli, M.; Maione, S.; Di Marzo, V.; Endocannabinoid Research Group. Development of a potent inhibitor of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis with antinociceptive activity in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, *1791*, 53 - 60.

La seconde génération d'inhibiteurs de la MAGL est représentée par le JZL184, appartenant à la famille des *O*-aryl carbamates (cf. figure 48). Le JZL184 inhibe la MAGL par réaction de carbamoylation irréversible de la sérine catalytique de l'enzyme.^{278,279} Le JZL184 a notamment servi à démontrer le rôle de la MAGL dans les voies de signalisation du 2-AG et l'intérêt de cibler la MAGL dans les troubles du SNC (douleur, anxiété, addiction et nausée).^{267,280}



JZL184

MAGL : $CI_{50} = 0,89 \mu M$

Figure 48. Structure chimique du JZL184

Enfin, les *O*-hexafluoroisopropyl carbamates ont été développés avec comme composé phare le KML29 (cf. figure 49). Bien que le JZL184 fût un outil puissant pour prouver les rôles de la MAGL *in vivo*, il a montré une certaine réactivité croisée avec la FAAH quand il est utilisé à fortes doses. De plus, au niveau périphérique, le JZL184 bloque également des carboxylestérases (CES). Très récemment, une nouvelle génération d'inhibiteurs de la MAGL basés sur le motif *O*-hexafluoroisopropyl carbamate a été développée et a révélé une sélectivité nettement supérieure pour les MAGL centrale et périphérique par rapport aux autres hydrolases à sérine (FAAH, CES).^{281,282}

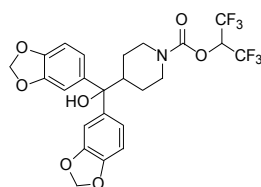
²⁷⁸ Long, J. Z.; Li, W.; Booker, L.; Burston, J. J.; Kinsey, S. G.; Schlosburg, J. E.; Pavon, F. J.; Serrano, A. M.; Selley, D. E.; Parsons, L. H.; Lichtman, A. H.; Cravatt, B. F. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 37 - 44.

²⁷⁹ Long, J. Z.; Nomura, D. K.; Cravatt, B. F. Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 744 - 753.

²⁸⁰ Petrosino, S.; Di Marzo, V. FAAH and MAGL inhibitors: therapeutic opportunities from regulating endocannabinoid levels. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **2010**, *11*, 51 - 62.

²⁸¹ Chang, J. W.; Niphakis, M. J.; Lum, K. M.; Cognetta, A. B. 3rd.; Wang, C.; Matthews, M. L.; Niessen, S.; Buczynski, M. W.; Parsons, L. H.; Cravatt, B. F. Highly selective inhibitors of monoacylglycerol lipase bearing a reactive group that is bioisosteric with endocannabinoid substrates. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 579 - 588.

²⁸² Bartsch, R.; Cheuret, D.; Even, L.; Hoornaert, C.; Jeunesse, J.; Marguet, F. Hexafluoroisopropyl carbamate derivatives, their preparation and their therapeutic application. **2011**. WO 2011151808.



KML29

MAGL : $CI_{50} = 2,5 \text{ nM}$

Figure 49. Structure chimique du KML29

Dernièrement, des modèles de souris KO-MAGL ont été décrits.^{283,284} Ces modèles ont montré de fortes réductions de l'hydrolyse du 2-AG et ont présenté des taux élevés de 2-AG et d'autres monoacylglycérols au niveau du SNC et au niveau périphérique. Cependant, les souris KO-MAGL ont révélé une intolérance aux cannabinoïdes exogènes, qui pourrait être expliquée par une sous-expression des récepteurs CB_1 dans certaines aires du cerveau.²⁸⁵

c. La *N*-acyléthanolamine-hydrolyzing acid amidase

i. Structure et distribution

La NAAA est une glycoprotéine de 359 acides aminés chez l'Homme qui appartient à la famille des hydrolases à cystéines. Mise en évidence par Ueda *et al* en 2001, elle possède un poids moléculaire de 31 kDa et le PEA est son principal substrat. La NAAA hydrolyse également d'autres *N*-acyléthanolamides comme le *N*-myristoyléthanolamide, le *N*-stéaroyléthanolamide, l'OEA, le *N*-linoléoyléthanolamide et l'AEA, ce dernier n'étant que très faiblement clivé par l'enzyme.^{286,287}

²⁸³ Chanda, P. K.; Gao, Y.; Mark, L.; Btsh, J.; Strassle, B. W.; Lu, P.; Piesla, M. J.; Zhang, M. Y.; Bingham, B.; Uveges, A.; Kowal, D.; Garbe, D.; Kouranova, E. V.; Ring, R. H.; Bates, B.; Pangalos, M. N.; Kennedy, J. D.; Whiteside, G. T.; Samad, T. A. Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *78*, 996 - 1003.

²⁸⁴ Taschler, U.; Radner, F. P.; Heier, C.; Schreiber, R.; Schweiger, M.; Schoiswohl, G.; Preiss-Landl, K.; Jaeger, D.; Reiter, B.; Koefeler, H. C.; Wojciechowski, J.; Theussl, C.; Penninger, J. M.; Lass, A.; Haemmerle, G.; Zechner, R.; Zimmermann, R. Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 17467 - 17477.

²⁸⁵ Schlosburg, J. E.; Blankman, J. L.; Long, J. Z.; Nomura, D. K.; Pan, B.; Kinsey, S. G.; Nguyen, P. T.; Ramesh, D.; Booker, L.; Burston, J. J.; Thomas, E. A.; Selley, D. E.; Sim-Selley, L. J.; Liu, Q. S.; Lichtman, A. H.; Cravatt, B. F. Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 1113 - 1119.

²⁸⁶ Ueda, N.; Kurahashi, Y.; Yamamoto, S.; Tokunaga, T. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23823 - 23827.

²⁸⁷ Ueda, N.; Yamanaka, K.; Yamamoto, S. Purification and characterization of an acid amidase selective for *N*-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35552 - 35557.

Chez l'Homme, l'ARNm de la NAAA a été décelé essentiellement au niveau périphérique : dans la rate, les leucocytes, le thymus, le foie, la prostate, le rein et le pancréas. Sa présence au niveau central est assez faible.²⁸⁸

Solarzano *et al*, ont dernièrement montré que la diminution du taux de PEA endogène dans les leucocytes carraghénane-stimulé et les macrophages lipopolysaccharides-traités RAW264.7, est inhibé par le (S)-OOPP, un inhibiteur de la NAAA (*cf.* figure 56). De plus, d'autres études ont montré l'intérêt mineur de la NAAA dans la dégradation des NAE au niveau du SNC.²⁸⁹ Ceci suggère que la NAAA aurait pour rôle de dégrader les NAE dans les macrophages et les tissus périphériques.²⁹⁰

Par ailleurs, étant donné que le PEA est le substrat principal de la NAAA, l'inhibition de la NAAA apparait comme une alternative crédible à l'inhibition de la FAAH dans l'induction d'effets anti-inflammatoires, analgésiques et neuroprotecteurs.

ii. Propriétés catalytiques

En ce qui concerne le mécanisme d'action de la NAAA, celui-ci n'a toujours pas été véritablement déterminé. Cependant, la cystéine 126 attaquerait le carbonyle du PEA, *via* la nucléophilie de sa fonction thiol, ce qui provoquerait la rupture de la liaison C-N permettant ainsi la libération d'éthanolamine dans le milieu (*cf.* figure 50).²⁹¹

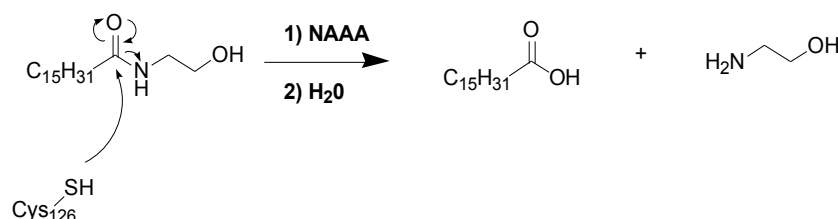


Figure 50. Hydrolyse du PEA par la NAAA

²⁸⁸ Wang, J.; Zhao, L. Y.; Uyama, T.; Tsuboi, K.; Wu, X. X.; Kakehi, Y.; Ueda, N. Expression and secretion of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase in human prostate cancer cells. *J. Biochem.* **2008**, *144*, 685 - 690.

²⁸⁹ Fegley, D.; Gaetani, S.; Duranti, A.; Tontini, A.; Mor, M.; Tarzia, G.; Piomelli, D. Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313*, 352 - 358.

²⁹⁰ Solorzano, C.; Zhu, C.; Battista, N.; Astarita, G.; Lodola, A.; Rivara, S.; Mor, M.; Russo, R.; Maccarrone, M.; Antonietti, F.; Duranti, A.; Tontini, A.; Cuzzocrea, S.; Tarzia, G.; Piomelli, D. Selective *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase inhibition reveals a key role for endogenous palmitoylethanolamide in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 20966 - 20971.

²⁹¹ Tsuboi, K.; Takezaki, N.; Ueda, N. The *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 1914 - 1925.

La NAAA n'a toujours pas pu être cristallisée, mais Solorzano *et al* ont pu établir récemment un modèle tri-dimensionnel théorique de l'enzyme en se basant sur les coordonnées cristallographiques de la « Conjugated Bile Acid Hydrolase » (CBAH), une enzyme appartenant au même groupe que la NAAA.²⁹⁰

Ce n'est qu'en 2008 que Wang *et al* ont pu identifier, dans la NAAA humaine, une triade catalytique formée par la cystéine 126, l'arginine 142 et l'acide aspartique 145 (*cf.* figure 52).²⁸⁸ L'acide glutamique 195 et l'asparagine 287 sont également apparus, respectivement comme des éléments clés dans le clivage acide des NAE et dans l'activation protéolytique de proenzymes.^{292,293} Parmi ces acides aminés, la cystéine 126 a été identifiée comme le résidu critique du site actif, susceptible de se lier de façon covalente avec des inhibiteurs de la NAAA.²⁹⁴ La figure 51 présente le mécanisme d'inhibition de l'enzyme par un de ses plus puissants inhibiteurs, l'AM6701.

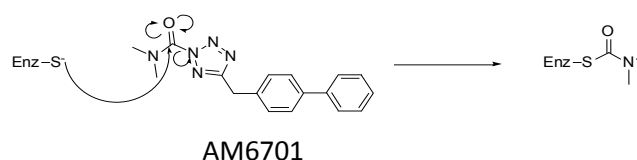


Figure 51. Mécanisme d'inhibition de la *h*NAAA par l'AM6701²⁹⁴

²⁹² Zhao, L. Y.; Tsuboi, K.; Okamoto, Y.; Nagahata, S.; Ueda, N. Proteolytic activation and glycosylation of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a lysosomal enzyme involved in the endocannabinoid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2007**, 1771, 1397 - 1405.

²⁹³ Wang, J.; Zhao, L. Y.; Uyama, T.; Tsuboi, K.; Tonai, T.; Ueda, N. Amino acid residues crucial in pH regulation and proteolytic activation of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2008**, 1781, 710 - 717.

²⁹⁴ West, J. M.; Zvonok, N.; Whitten, K. M.; Vadivel, S. K.; Bowman, A. L.; Makriyannis, A. Biochemical and Mass Spectrometric Characterization of Human *N*-Acylethanolamine-Hydrolyzing Acid Amidase Inhibition. *PLoS One* **2012**, 7, e43877.

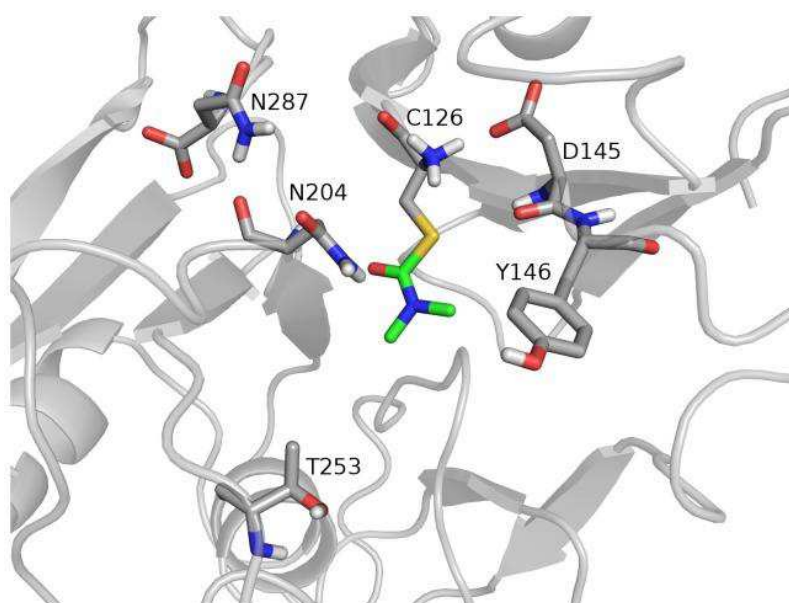
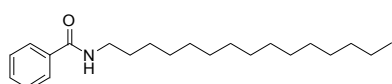


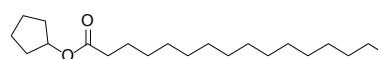
Figure 52. Représentation du site actif de la *hNAAA* avec l'AM6701, un inhibiteur de la *hNAAA*²⁹⁴

iii. Les inhibiteurs de la NAAA

Actuellement, peu d'inhibiteurs de la NAAA ont été décrits dans la littérature. Aussi, deux familles d'inhibiteurs de la NAAA se distinguent. Tout d'abord, il y a les inhibiteurs analogues du substrat, basés sur la structure chimique du PEA. Parmi eux, se retrouvent le *N*-pentadécylbenzamide et le cyclopentylhexadécanoate, avec des concentrations inhibitrices de la NAAA à 50 % de 8,3 μ M et 10 μ M, respectivement (cf. figure 53).^{295,296}



N-pentadécylbenzamide
NAAA : Cl_{50} = 8,3 μ M



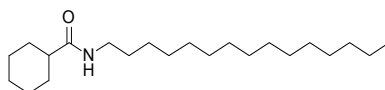
cyclopentylhexadécanoate
NAAA : Cl_{50} = 10 μ M

Figure 53. Structures chimiques du cyclopentylhexadécanoate et du *N*-pentadécylbenzamide

La cyclohexanecarbonylpentadécylamine est à ce jour, l'un des inhibiteurs de NAAA les plus puissants puisqu'elle inhibe l'enzyme avec une Cl_{50} de 4,5 μ M de façon réversible (cf. figure 54).²⁹⁵

²⁹⁵ Tsuboi, K.; Hilligsmann, C.; Vandevoorde, S.; Lambert, D. M.; Ueda, N. *N*-cyclohexanecarbonyl-pentadecylamine: a selective inhibitor of the acid amidase hydrolysing *N*-acylethanolamines, as a tool to distinguish acid amidase from fatty acid amide hydrolase. *Biochem. J.* **2004**, *379*, 99 - 106.

²⁹⁶ Saturnino, C.; Petrosino, S.; Ligresti, A.; Palladino, C.; Martino, G. D.; Bisogno, T.; Di Marzo, V. Synthesis and biological evaluation of new potential inhibitors of *N*-acylethanolamine hydrolyzing acid amidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1210 - 1213.

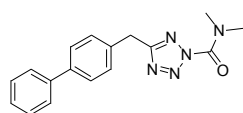


Cyclohexanecarbonylpentadecylamine (CCP)

NAAA : $Cl_{50} = 4,5 \mu M$

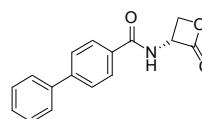
Figure 54 . Structure chimique de la cyclohexanecarbonylpentadecylamine

Enfin, des inhibiteurs de la NAAA basés sur le motif tétrazole-2-carboxamide et β -lactone ont également été développés. Ces nouvelles familles d'inhibiteurs se compose notamment de l'AM6701,²⁹⁴ de l'URB-894,²⁹⁷ et du (S)-OOPP,²⁹⁰ avec des concentrations inhibitrices de la NAAA à 50 % respectivement de 7,2 nM, 115 nM et 420 nM (cf. figure 55).



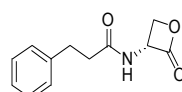
AM6701

NAAA : $Cl_{50} = 7,2 \text{ nM}$



URB-894

NAAA : $Cl_{50} = 115 \text{ nM}$



(S)-OOPP

NAAA : $Cl_{50} = 420 \text{ nM}$

Figure 55. Structures chimiques de l'AM6701, de l'URB-894 et du (S)-OOPP

La recherche d'inhibiteurs de la NAAA est en pleine progression et constitue une stratégie très prometteuse dans la recherche de traitements anti-inflammatoires et analgésiques.

²⁹⁷ Piomelli, D.; Tarzia, G.; Mor, M.; Duranti, A.; Tontini, A. Compositions and methods of inhibiting *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase. **2009**, WO2009049238.

d. Les α/β hydrolases domain 6 and 12

i. Structure et distribution

L'ABHD6 et l'ABHD12 sont deux hydrolases découvertes par Blankman *et al* en 2007 lors d'études protéomiques réalisées sur le cerveau de souris.²⁹⁸

L'ABHD6 est une protéine membranaire à sérine d'environ 30 kDa localisée sur les membranes post-synaptiques de neurones.²⁹⁸ L'ABHD6 murine est présente dans les tissus périphériques et le cerveau,²⁹⁹ notamment dans les aires corticales au niveau postsynaptique des dendrites, souvent en corrélation avec les récepteurs CB₁ présynaptiques (*cf.* figure 56).³⁰⁰

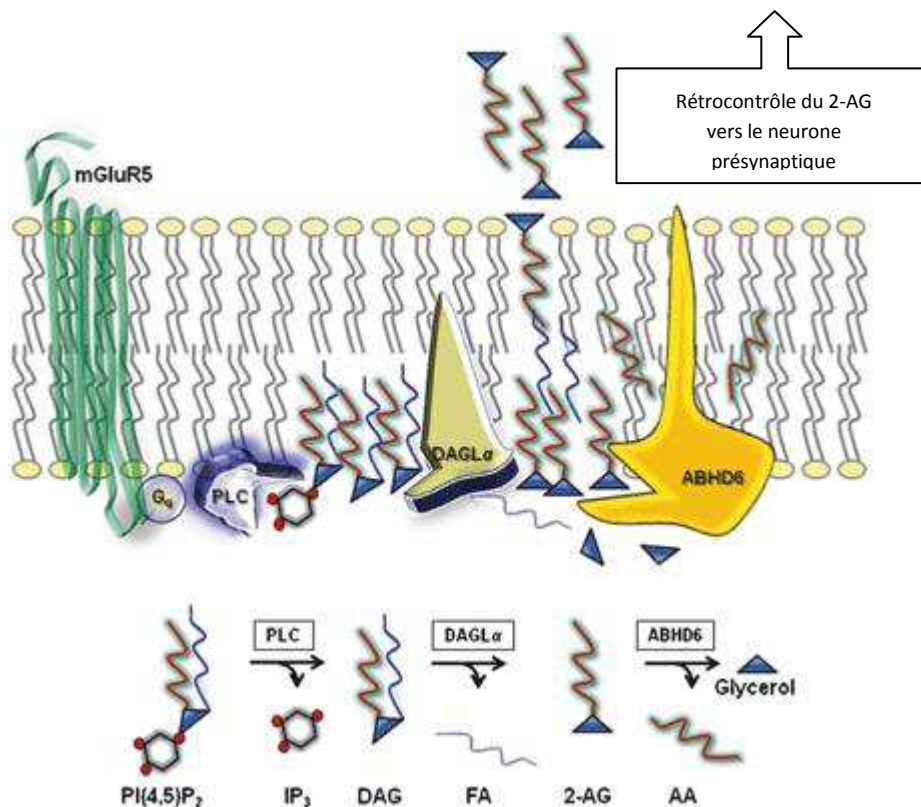


Figure 56. Représentation schématique du rôle de l'ABHD6³⁰¹

²⁹⁸ Blankman, J. L.; Simon, G. M.; Cravatt, B. F. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1347 - 1356.

²⁹⁹ Bachovchin, D. A.; Ji, T.; Li, W.; Simon, G. M.; Blankman, J. L.; Adibekian, A.; Hoover, H.; Niessen, S.; Cravatt, B. F. Superfamily-wide portrait of serine hydrolase inhibition achieved by library-versus-library screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 20941 - 20946.

³⁰⁰ Marrs, W. R.; Blankman, J. L.; Horne, E. A.; Thomazeau, A.; Lin, Y. H.; Coy, J.; Bodor, A. L.; Muccioli, G. G.; Hu, S. S. J.; Woodruff, G.; Fung, S.; Lafourcade, M.; Alexander, J. P.; Long, J. Z.; Li, W.; Xu, C.; Möller, T.; Mackie, K.; Manzoni, O. J.; Cravatt, B. F.; Stella, N. The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 951 - 957.

³⁰¹ Savinainen, J. R.; Saario, S. M.; Laitinen, J. T. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta. Physiol.* **2012**, *204*, 267 - 276.

L'ABHD12 est une glycoprotéine membranaire d'environ 45 kDa qui compte pour environ 9 % de l'hydrolyse totale du 2-AG.^{298,302} Des ARNm de l'ADH12 ont été détectés dans le cerveau de souris, la prostate, les macrophages, les cellules mycrogiales et la vessie.³⁰³ Une hypothèse a été évoquée sur le mécanisme d'ABHD12 selon laquelle, l'ABHD12 contrôlerait les taux extracellulaires de 2-AG et par conséquent, l'activité du récepteur CB₂ (cf. figure 57).

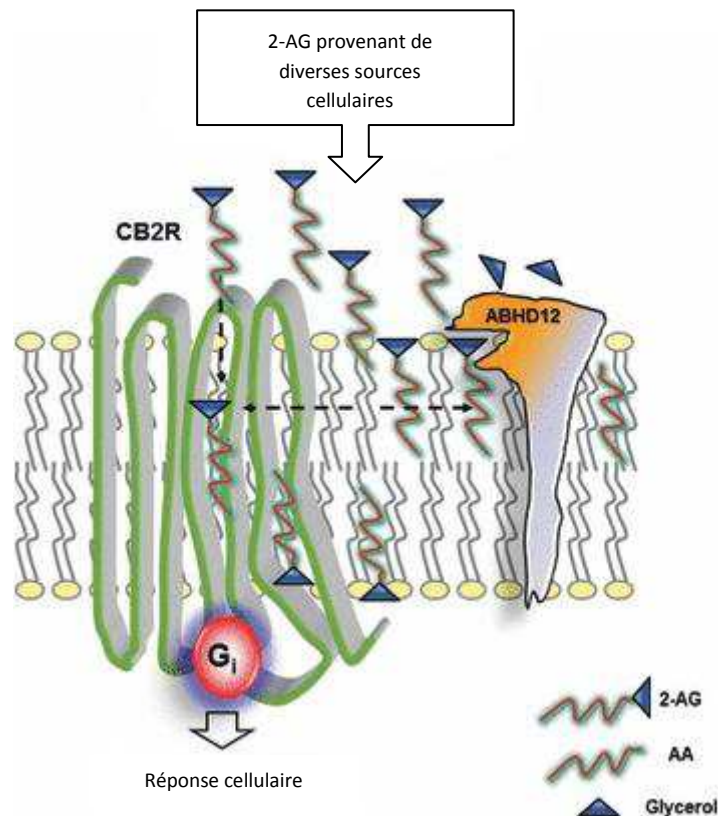


Figure 57. Représentation hypothétique du rôle de l'ABHD12³⁰¹

Par ailleurs, il a été montré que les maladies neurodégénératives, de type polyneuropathies, pertes de l'audition, ataxies, rétinites pigmentaires et cataractes (PHARC), sont sensiblement liées à des mutations génétiques de l'ABHD12.³⁰⁴

³⁰² Navia-Paldanius, D.; Savinainen, J. R.; Laitinen, J. T. Biochemical and pharmacological characterization of human α/β -hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). *J. Lipid. Res.* **2012**, *53*, 2413 - 2424.

³⁰³ Su, A. I.; Cooke, M. P.; Ching, K. A.; Hakak, Y.; Walker, J. R.; Wiltshire, T.; Orth, A. P.; Vega, R. G.; Sapinoso, L. M.; Moqrich, A.; Patapoutian, A.; Hampton, G. M.; Schultz, P. G.; Hogenesch, J. B. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 4465 - 4470.

³⁰⁴ Fiskerstrand, T.; H'mida-Ben Brahim, D.; Johansson, S.; M'zahem A.; Haukanes, B. I.; Drouot, N.; Zimmermann, J.; Cole, A. J.; Vedeler, C.; Bredrup, C.; Assoum, M.; Tazir, M.; Klockgether, T.; Hamri, A.; Steen, V. M.; Boman, H.; Bindoff, L. A.; Koenig, M.; Knappskog, P. M. Mutations in ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: An inborn error of endocannabinoid metabolism. *Am. J. Hum. Genet.* **2010**, *87*, 410 - 417.

Même si la MAGL est responsable d'environ 85 % de la dégradation totale du 2-AG au niveau central, l'ABHD6 et l'ABHD12 semblent contrôler l'hydrolyse du 2-AG dans des zones distinctes au niveau du SNC, différentes de celles de la MAGL.^{298,305} En effet, il a été récemment montré que l'ABHD6 régule la dégradation et la signalisation du 2-AG dans des neurones primaires murins³⁰⁰ et contrôle l'accumulation de 2-AG dans la lignée cellulaire Neuro2A, où la MAGL est sous-exprimée.³⁰⁶

ii. Propriétés catalytiques

Très peu d'informations sont disponibles sur les ABHD6 et ABHD12. Toutefois, il semblerait que le site actif de l'ABHD6 se situe à l'intérieur de la cellule et se compose, par comparaison avec d'autres α/β -hydrolases comme la MAGL, d'une triade catalytique formée de la sérine 148, de l'acide aspartique 278 et de l'histidine 306. En ce qui concerne l'ABHD12, son site actif est à l'extérieur de la cellule, et sa triade catalytique se composerait de la sérine 246, de l'acide aspartique 333 et de l'histidine 372.³⁰⁷

iii. Les inhibiteurs de l'ABHD6 et de l'ABHD12

Peu d'inhibiteurs sélectifs de l'ABHD6 ont été décrits à ce jour. Parmi eux se trouvent l'UCM710, le WWL123 et le WWL70 (cf. figure 58).

L'UCM710, de la famille des esters, inhibe l'hydrolyse de l'AEA par la FAAH et l'hydrolyse du 2-AG par l'ABHD6 de manière dose-dépendante (CI_{50} = 4,0 et 2,4 μ M, respectivement). Cependant, aucun effet n'a été mesuré sur l'hydrolyse du 2-AG par la MAGL.³⁰⁸

Le WWL70³⁰⁹ et le WWL123,³¹⁰ de la famille des carbamates, inhibent l'ABHD6 avec des CI_{50} de 70 nM et 0,43 μ M, respectivement.

³⁰⁵ Muccioli, G. G.; Xu, C.; Odah, E.; Cudaback, E.; Cisneros, J. A.; Lambert, D. M.; López Rodríguez, M. L.; Bajjalieh, S.; Stella, N. Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 2883 - 2889.

³⁰⁶ Hsu, K. L.; Tsuboi, K.; Adibekian, A.; Pugh, H.; Masuda, K.; Cravatt, B. F. DAGL β inhibition perturbs a lipid network involved in macrophage inflammatory responses. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 999 - 1007.

³⁰⁷ Savinainen, J. R.; Saario, S. M.; Laitinen, J. T. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta. Physiol.* **2012**, *204*, 267 - 276.

³⁰⁸ Marrs, W. R.; Horne, E. A.; Ortega-Gutierrez, S.; Cisneros, J. A.; Xu, C.; Lin, Y. H.; Muccioli, G. G.; Lopez-Rodriguez, M. L.; Stella, N. Dual Inhibition of α/β -Hydrolase Domain 6 and Fatty Acid Amide Hydrolase Increases Endocannabinoid Levels in Neurons. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 28723 - 28728.

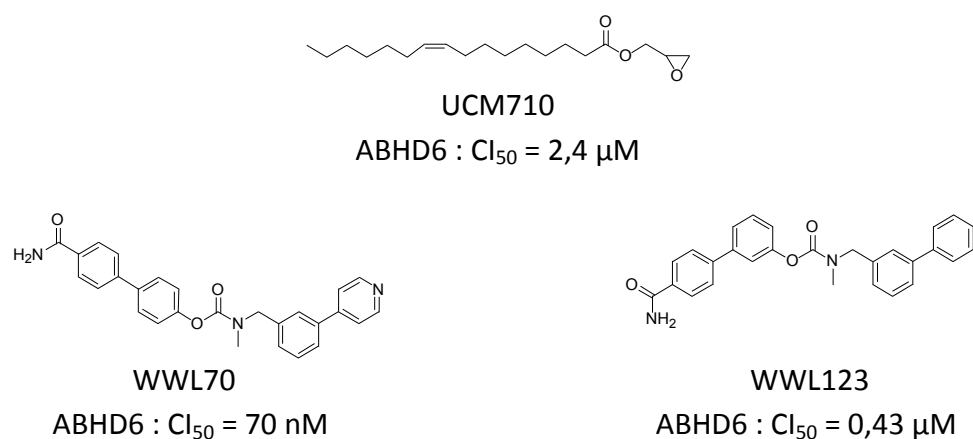


Figure 58. Structures chimiques de l'UCM710, du WWL70 et WWL123

A ce jour aucun inhibiteur de l'ABHD12 n'a été décrit.

Enfin, parmi les hydrolases, deux estérases non-spécifiques, les carboxylestérases humaines CES1 et CES2, reconnaissent le 2-AG comme substrat, sous certaines conditions.³¹¹

e. Les autres voies de dégradation

Bien que les EC soient principalement dégradés par hydrolyse, de plus en plus de publications indiquent que, dû à leur longue chaîne grasse, les EC sont sujets aux voies métaboliques oxydatives qui conduisent à la biosynthèse des eicosanoïdes.³¹²

Ainsi, les EC sont sensibles à une oxydation catalysée par les lipoxygénases (LOX), les cyclooxygénases (COX) mais également les cytochromes P450 (CYP450).^{313,314}

³⁰⁹ Li, W.; Blankman, J. L.; Cravatt, B. F. A functional proteomic strategy to discover inhibitors for uncharacterized hydrolases. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9594 - 9595.

³¹⁰ Bachovchin, D. A.; Ji, T.; Li, W.; Simon, G. M.; Blankman, J. L.; Adibekian, A.; Hoover, H.; Niessen, S.; Cravatt, B. F. Superfamily-wide portrait of serine hydrolase inhibition achieved by library-versus-library screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2010**, *107*, 20941 - 20946.

³¹¹ Xie, S.; Borazjani, A.; Hatfield, M. J.; Edwards, C. C.; Potter, P. M.; Ross, M. K. Inactivation of lipid glyceryl ester metabolism in human THP1 monocytes/macrophages by activated organophosphorus insecticides: role of carboxylesterases 1 and 2. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1890 - 1904.

³¹² Kozak, K. R.; Marnett, L. J. Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids.* **2002**, *66*, 211 - 220.

³¹³ Snider, N. T.; Walker, V. J.; Hollenberg, P. F. Oxidation of the endogenous cannabinoid arachidonoyl ethanolamide by the cytochrome P450 monooxygenases: physiological and pharmacological implications. *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 136 - 154.

³¹⁴ Rouzer, C. A.; Marnett, L. J. Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5899 - 5921.

Plus précisément, ce sont les LOX-12 et LOX-15, mais pas la LOX-5, qui oxydent l'AEA et le 2-AG en leurs dérivés hydroxylés correspondant. Le dérivé oxydé de l'AEA par la LOX-12 est toujours considéré comme un EC puisqu'il active les récepteurs aux cannabinoïdes.³¹⁵ Ces dérivés hydroxylés activent aussi le récepteur aux vanilloïdes TRPV1.³¹⁶

La COX-2, mais pas la COX-1, catalyse la dioxygénation de l'AEA et du 2-AG en leurs endopéroxydes correspondant. Ces endopéroxydes servent ensuite de précurseurs aux esters de prostaglandine-glycérols (PG-GE) et de prostaglandine éthanolamides (PG-EA). Les prostaglandines, PG-GE et PG-EA, ne semblent pas être des substrats de la FAAH ou de la MAGL, même si leur hydrolyse a été reportée. Elles sont incapables de se lier aux récepteurs aux cannabinoïdes ni aux récepteurs aux prostaglandines.^{317,318} Ceci laisse à penser que l'oxygénation des EC par les COX serait un mécanisme d'arrêt de la voie signalitique des EC.

Enfin, plusieurs études sur le métabolisme des EC par les CYP450 ont montré que, contrairement au 2-AG, l'AEA pouvait être converti en acide epoxyeicosatrienoïque-éthanolamides (EET-EA) par les cytochromes 4F2, 3A4 et 2D6.³¹⁴ Ces EET-EA peuvent ensuite se lier aux récepteurs aux cannabinoïdes mais également au récepteur aux vanilloïdes TRPV4.

³¹⁵ Van Der Stelt, M.; Van Kuik, J. A.; Bari, M.; Van Zadelhoff, G.; Leeflang, B. R.; Veldink, G. A.; Finazzi-Agrò, A.; Vliedenthart, J. F.; Maccarrone, M. Oxygenated metabolites of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: conformational analysis and interaction with cannabinoid receptors, membrane transporter, and fatty acid amide hydrolase. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3709 - 3720.

³¹⁶ Starowicz, K.; Makuch, W.; Korostynski, M.; Malek, N.; Slezak, M.; Zychowska, M.; Petrosino, S.; De Petrocellis, L.; Cristino, L.; Przewlocka, B.; Di Marzo, V. Full inhibition of spinal FAAH leads to TRPV1-mediated analgesic effects in neuropathic rats and possible lipoxygenase-mediated remodeling of anandamide metabolism. *PLoS One* **2013**, *8*, e60040.

³¹⁷ Matias, I.; Chen, J.; De Petrocellis, L.; Bisogno, T.; Ligresti, A.; Fezza, F.; Krauss, A. H.; Shi, L.; Protzman, C. E.; Li, C.; Liang, Y.; Nieves, A. L.; Kedzie, K. M.; Burk, R. M.; Di Marzo, V.; Woodward, D. F. Prostaglandin ethanolamides (prostamides): in vitro pharmacology and metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *309*, 745 - 757.

³¹⁸ Gatta, L.; Piscitelli, F.; Giordano, C.; Boccella, S.; Lichtman, A.; Maione, S.; Di Marzo, V. Discovery of prostamide F2a and its role in inflammatory pain and dorsal horn nociceptive neuron hyperexcitability. *PLoS. One* **2012**, *7*, e31111.

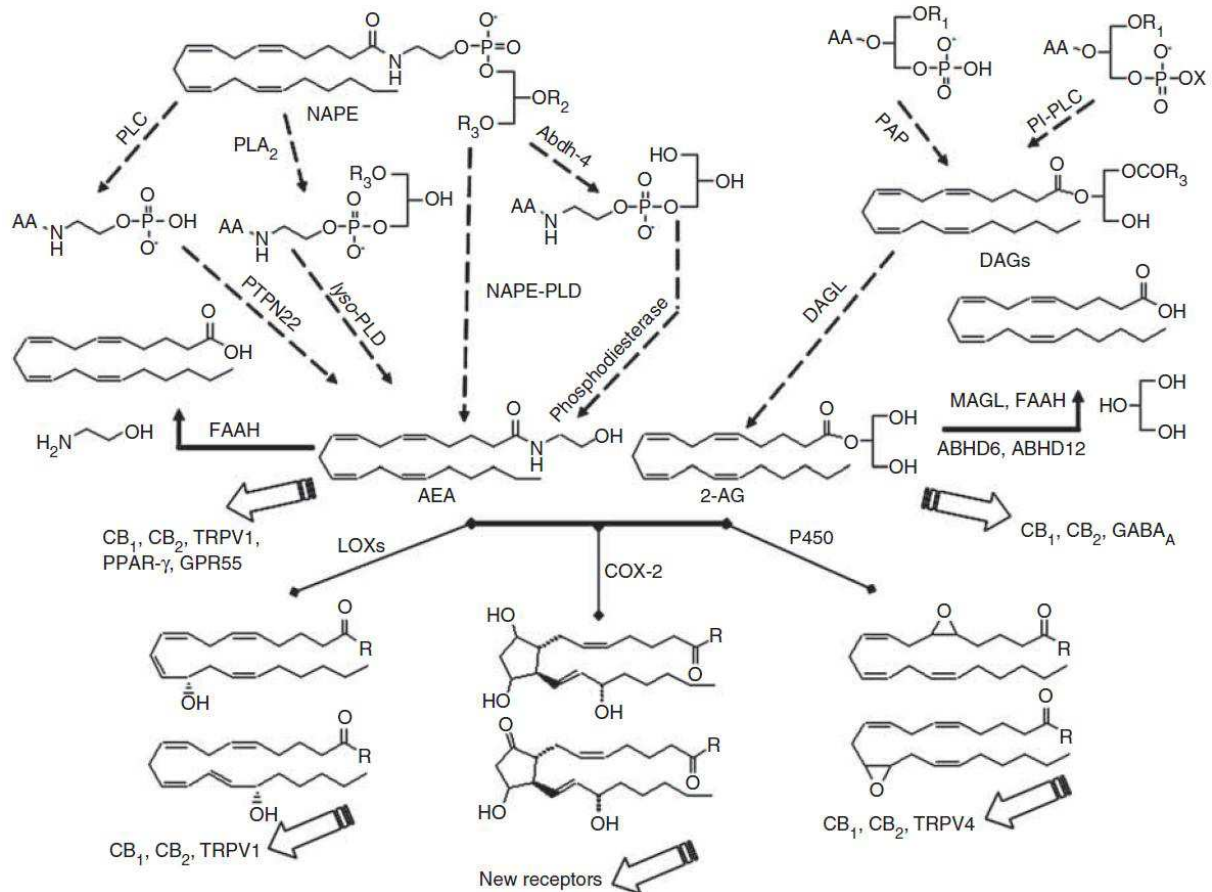


Figure 59. Représentation schématique de la biosynthèse et de la biodégradation des endocannabinoïdes²²³

7. Le transport des endocannabinoïdes

Bien que les enzymes responsables du métabolisme des EC soient connues et caractérisées à ce jour, les procédés impliqués dans l'internalisation des EC sont encore sujet à controverse.³¹⁹

La première hypothèse concernant le transport de l'AEA à travers la membrane cellulaire se base sur un phénomène de diffusion passive régulé par la FAAH, l'enzyme de dégradation de l'AEA.³²⁰

³¹⁹ Fowler, C. J. Anandamide uptake explained? *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 181 - 185.

³²⁰ Hillard, C. J.; Edgmond, W. S.; Jarrahian, A.; Campbell, W. B. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 631 - 638.

En effet, un gradient de concentration transmembranaire d'AEA serait entretenu par l'activité hydrolytique de l'enzyme.^{321,322} De plus, l'AEA extracellulaire se trouve sous deux formes, une forme libre et une forme liée réversiblement à l'albumine (ou une autre protéine plasmatique). Ainsi l'équilibre entre ces deux formes stabiliserait la concentration extracellulaire de l'AEA.³²³

Néanmoins, une quantité d'AEA internalisée a été mesurée dans des neurones de souris n'exprimant pas la FAAH.³²⁴ De plus, il a été mesuré que les taux d'AEA transporté vers des cellules RBL-2H3 (mastocytes), PC-3 (cellules cancéreuses de la prostate) et AT-1 (cellules d'adénocarcinome prostatique de rat) étaient similaires aussi bien en absence qu'en présence d'un inhibiteur de la FAAH.³²⁵ Ainsi, bien que la FAAH puisse contrôler la diffusion passive de l'AEA dans certains modèles, la FAAH n'est pas le seul régulateur de cette diffusion.

La deuxième hypothèse est une variante de la précédente. Elle se base sur la contribution d'une protéine de liaison intracellulaire qui se fixe à l'AEA après son entrée dans la cellule, *via* des protéines de transport membranaire des EC (EMT), pour ensuite « l'amener » à la FAAH.³²⁶ Aussi, l'AEA intracellulaire se trouverait sous deux formes, une forme libre et une forme liée à une protéine de liaison. Plusieurs de ces protéines ont été identifiées dernièrement (*cf.* figure 60), parmi lesquelles, les FAPB 5 et 7,³²⁷ la Hsp70³²⁸ et la FLAT (FAAH-Like Anandamide Transporter).³²⁹

³²¹ Day, T. A.; Rakhshan, F.; Deutsch, D. G.; Barker, E. L. Role of fatty acid amide hydrolase in the transport of the endogenous cannabinoid anandamide. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1369 - 1375.

³²² Kaczocha, M.; Hermann, A.; Glaser, S. T.; Bojesen, I. N.; Deutsch, D. G. Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 9066 - 9075.

³²³ Bojesen, I. N.; Hansen, H. S. Binding of anandamide to bovine serum albumin. *J. Lipid. Res.* **2003**, *44*, 1790 - 1794

³²⁴ Fegley, D.; Kathuria, S.; Mercier, R.; Li, C.; Goutopoulos, A.; Makriyannis, A.; Piomelli, D. Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 8756 - 8761.

³²⁵ Thors, L.; Eriksson, J.; Fowler, C. J. Inhibition of the cellular uptake of anandamide by genistein and its analogue daidzein in cells with different levels of fatty acid amide hydrolase-driven uptake. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 744 - 750.

³²⁶ Ortega-Gutierrez, S.; Hawkins, E. G.; Viso, A.; Lopez-Rodriguez, M. L.; Cravatt, B. F. Comparison of anandamide transport in FAAH wild-type and knockout neurons: evidence for contributions by both FAAH and the CB1 receptor to anandamide uptake. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8184 - 8190.

³²⁷ Kaczocha, M.; Glaser, S. T.; Deutsch, D. G. Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 6375 - 6380.

³²⁸ Oddi, S.; Fezza, F.; Pasquariello, N.; D'Agostino, A.; Catanzaro, G.; De Simone, C.; Rapino, C.; Finazzi-Agrò, A.; Maccarrone, M. Molecular identification of albumin and Hsp70 as cytosolic anandamide-binding proteins. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 624 - 632.

³²⁹ Fu, J.; Bottegoni, G.; Sasso, O.; Bertorelli, R.; Rocchia, W.; Masetti, M.; Guijarro, A.; Lodola, A.; Armirotti, A.; Garau, G.; Bandiera, T.; Reggiani, A.; Mor, M.; Cavalli, A.; Piomelli, D. A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat. Neurosci.* **2011**, *15*, 64 - 69.

Ces protéines joueraient ainsi le rôle de médiateur de la recapture ou de la libération de l'AEA et du 2-AG des neurones.³²⁰

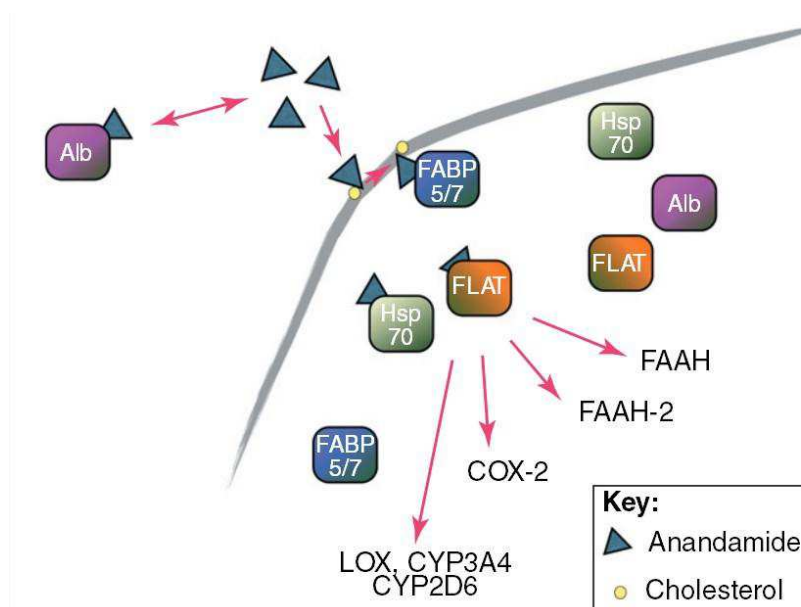


Figure 60. Voies de transport de l'anandamide³¹⁹

Cependant, plusieurs études ont démontré que la découverte de ces protéines n'expliquerait pas encore tous les mécanismes de transport de l'AEA et que d'autres recherches seront nécessaires pour les déterminer précisément.^{324,330}

Enfin, des travaux réalisés sur cellules RBL-2H3 ont suggéré un mécanisme de transport impliquant un processus d'endocytose (cf. figure 61). En effet, en présence d'inhibiteurs de l'endocytose, comme la nystatine ou la progestérone, le transport d'AEA a été réduit de moitié.^{331,332} Il n'y a pas encore de modèle validé concernant l'endocytose de l'AEA, mais il semblerait que des protéines de transport (EMT) aident à l'internalisation des EC.³³³

³³⁰ Chicca, A.; Marazzi, J.; Nicolussi, S.; Gertsch, J. Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 34660 - 34682.

³³¹ Deutsch, D. G.; Glaser, S. T.; Howell, J. M.; Kunz, J. S.; Puffenbarger, R. A.; Hillard, C. J.; Abumrad, N. The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6967 - 6973.

³³² McFarland, M. J.; Bardell, T. K.; Yates, M. L.; Placzek, E. A.; Barker, E. L. RNA interference-mediated knockdown of dynamin 2 reduces endocannabinoid uptake into neuronal dCAD cells. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 101 - 108.

³³³ Muccioli, G. G. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 474 - 483.

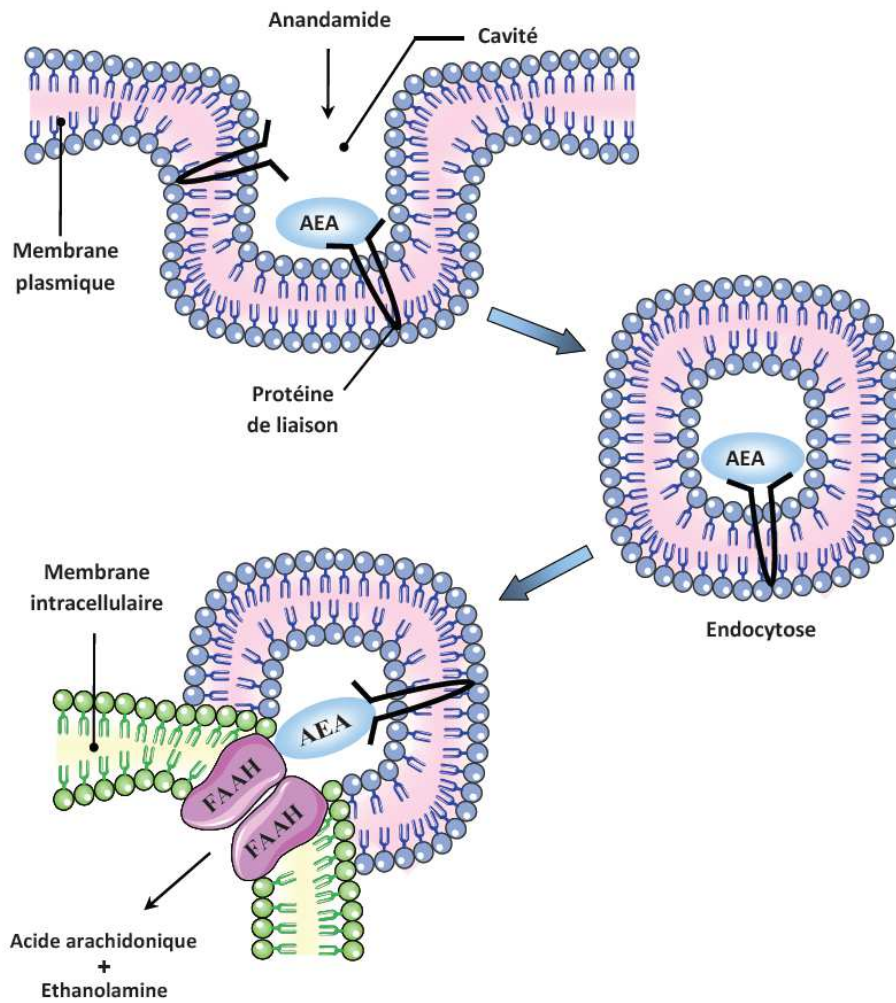


Figure 61. Transport de l'anandamide impliquant un processus d'endocytose³³⁴

Une fois les EC transportés vers l'intérieur de la cellule, ils seront alors pris en charge par différentes enzymes de dégradation.

³³⁴ Litwack, G. Anandamide. Ed. Academic press. 2009, Coll. Vitamins and Hormones, 81.

Pour récapituler ce paragraphe, nous pouvons représenter le parcours des endocannabinoïdes au niveau synaptique par la figure 62 suivante :

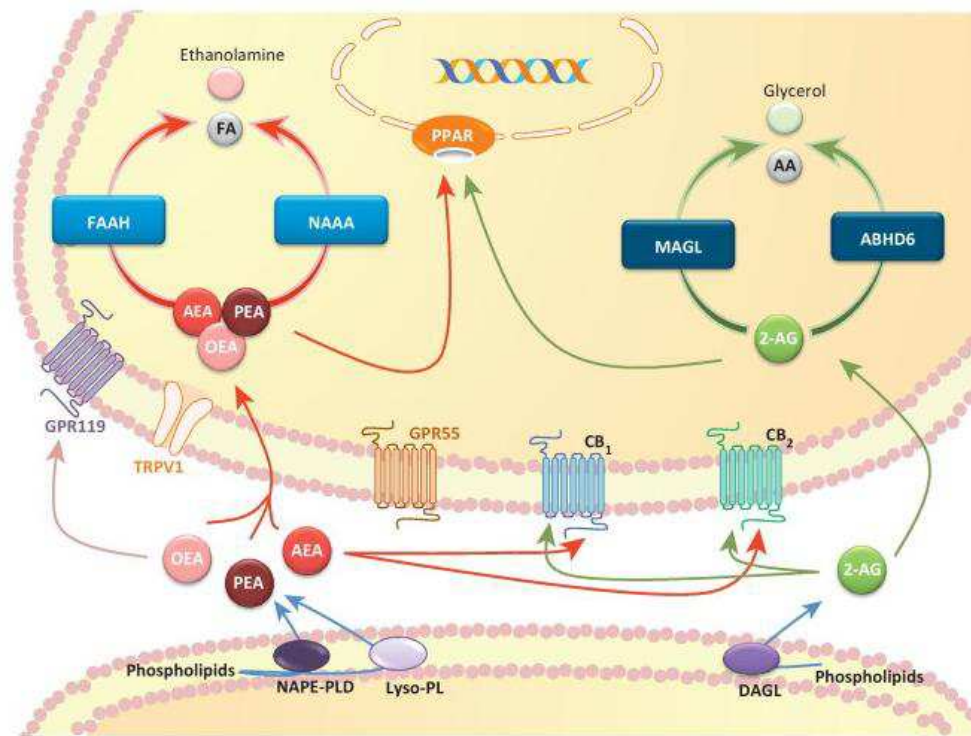


Figure 62. Représentation schématique du parcours des endocannabinoïdes au niveau synaptique³³⁵

³³⁵ Alhouayek, M.; Muccioli, G. G. The endocannabinoid system in inflammatory bowel diseases: from pathophysiology to therapeutic opportunity. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 615 - 625.

III. Intérêt du récepteur CB₂ et de la FAAH en tant que cibles thérapeutiques

Au cours de ces vingt dernières années, l'implication du système endocannabinoïde dans un grand nombre de fonctions physiologiques a été mise en évidence, tant au niveau central qu'au niveau périphérique. Ce système intervient notamment en maintenant l'homéostasie dans des conditions physiologiques normales mais aussi pathologiques. Aussi, le système endocannabinoïde a montré un rôle aggravant pour certaines pathologies, comme l'obésité, par l'augmentation de l'expression des récepteurs CB₁ et CB₂ et du taux d'EC. Il a également présenté un rôle protecteur dans certains cancers et dans un grand nombre de pathologies inflammatoires chroniques. Ainsi, moduler l'activité du système endocannabinoïde s'est révélé être une stratégie thérapeutique très prometteuse dans un large spectre de pathologies. Cependant, les effets psychotropes associés aux récepteurs CB₁ restent un frein sérieux au développement de ligands CB₁ en tant que médicaments. Le besoin fondamental de développer de nouveaux ligands directs ou indirects ne présentant pas d'effets secondaires centraux, associés au large potentiel thérapeutique du récepteur CB₂ et de la FAAH, font de ceux-ci des cibles de choix.

1. La douleur

La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel. Il existe 5 types de douleurs : nociceptive, viscérale, inflammatoire, neurogène et fonctionnelle.³³⁶ Il existe aussi des douleurs psychogènes, ne possédant aucune cause somatique et qui proviennent, dans la majorité des cas, d'un retentissement psychologique.

³³⁶ Pharmacologie de la douleur, Par Pierre Beaulieu Publié par PUM, 2005, ISBN 2760619516, 9782760619517.

Le cannabis est depuis bien longtemps utilisé comme remède contre certaines douleurs.³³⁷ En effet, le cannabis a l'avantage d'être efficace sur des douleurs réfractaires à d'autres analgésiques, et de présenter un effet analgésique synergique avec les opioïdes, qui pourrait permettre de diminuer les doses de ces derniers et ainsi le nombre d'effets secondaires.³³⁸ D'ailleurs, le Sativex[®], dont les principaux principes actifs sont le Δ^9 -THC et le cannabidiol, a reçu une autorisation de mise sur le marché au Canada en 2005 pour le traitement de la douleur neuropathique résistante dans la sclérose en plaques chez l'adulte.

a. Le récepteur CB₂ et la douleur

Il est bien établi aujourd'hui que les cannabinoïdes affectent la perception de la douleur au niveau périphérique, spinal et central. De nombreuses études suggèrent que certains agonistes des récepteurs CB₂ induisent des effets anti-hyperalgésiques dans un grand nombre de modèles expérimentaux animaux représentatifs des différents types de douleur.

En ce qui concerne la douleur neurogène, les traitements disponibles actuellement ne sont pas très efficaces et/ou présentent de nombreux effets secondaires. L'efficacité des agonistes des récepteurs CB₂ dans la suppression de la douleur neurogène a pour la première fois été mise en évidence dans un modèle de ligature du nerf spinal.³³⁹ Ainsi, il a été montré que l'administration intrapéritonéale de l'AM1241 (agoniste CB₂) inhibe de manière dose-dépendante l'hypersensibilité tactile et thermique induite par la ligature des nerfs spinaux, et que l'effet est contrecarré par l'administration de l'AM630 (agoniste inverse de CB₂). D'autre part, sur un autre modèle de la douleur neurogène induite par la ligature du nerf sciatique, une réduction de l'hyperalgésie mécanique chez le rat et la souris lors de l'administration du GW405833 (agoniste CB₂) a été montrée.^{340,341} Or, cet effet anti-hyperalgésique était absent des souris invalidées pour le récepteur CB₂.³⁴²

³³⁷ Lambert, D. M. Les vertus thérapeutiques du cannabis à travers les millénaires. *J. Pharm. Belg.* **2002**, *57*, 21 - 29.

³³⁸ Martin, B. R.; Lichtman, A. H. Cannabinoid transmission and pain perception. *Neurobiol. Dis.* **1998**, *5*, 447 - 461.

³³⁹ Ibrahim, M. M.; Deng, H.; Zvonok, A.; Cockayne, D. A.; Kwan, J.; Mata, H. P.; Vanderah, T. W.; Lai, J.; Porreca, F.; Makriyannis, A.; Malan, T. P. Jr. Activation of CB₂ cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 10529 - 10533.

³⁴⁰ Whiteside, G. T.; Gottshall, S. L.; Boulet, J. M.; Chaffer, S. M.; Harrison, J. E.; Pearson, M. S.; Turchin, P. I.; Mark, L.; Garrison, A. E.; Valenzano, K. J. A role for cannabinoid receptors, but not endogenous opioids, in the antinociceptive activity of the CB₂-selective agonist, GW405833. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *528*, 65 - 72.

³⁴¹ Valenzano, K. J.; Tafesse, L.; Lee, G.; Harrison, J. E.; Boulet, J. M.; Gottshall, S. L.; Mark, L.; Pearson, M. S.; Miller, W.; Shan, S.; Rabadi, L.; Rotshteyn, Y.; Chaffer, S. M.; Turchin, P. I.; Elmore, D. A.; Toth, M.; Koetzner, L.; Whiteside, G. T. Pharmacological and pharmacokinetic

En ce qui concerne la douleur inflammatoire, les agonistes des récepteurs CB₂ se sont montrés efficaces dans différents modèles tels que l'hyperalgésie induite par la carragénine, la capsaïcine, la formaline et l'adjuvant de Freund (mélange lipidique). Une étude a notamment présenté une suppression de l'hyperalgésie thermique et mécanique induite par l'injection de carragénine au niveau de la patte postérieure de rat, ceci par l'administration intrapéritonéale (systémique) et intraplantaire (locale) de l'AM1241 (agoniste CB₂).³⁴³ Aussi dans le modèle d'hyperalgésie induite par l'adjuvant de Freund chez le rat et la souris, une administration systémique du GW405833 (agoniste CB₂) supprime l'allodynie tactile et l'hyperalgésie mécanique de manière dose-dépendante. L'A796260 (agoniste CB₂), dans ce même modèle, a montré également un effet dépendant du récepteur CB₂.^{341,342} Cette même étude a démontré que l'effet anti-hyperalgésique de l'AM1241 était sensible au Naloxone (antagoniste du récepteur opioïde μ), venant confirmer une étude d'Ibrahim *et al* selon laquelle l'activation du récepteur CB₂ par l'AM1241 stimule la libération de β -endorphine qui, en agissant sur les neurones afférents primaires (par activation des récepteurs opioïdes μ) inhibent la nociception.³⁴⁴ Dernièrement, Kinsey *et al* ont, à leur tour, montré que l'agoniste sélectif du récepteur CB₂, l'O-3223, réduisait la douleur inflammatoire et neuropathique sans affecter la douleur basale ni modifier le comportement.³⁴⁵ Ainsi, il existe de nombreux arguments en faveur de l'action analgésique périphérique des agonistes des récepteurs CB₂ notamment au cours de l'inflammation.

characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. *Neuropharmacology* **2005**, *48*, 658 - 672.

³⁴² Yao, B. B.; Hsieh, G. C.; Frost, J. M.; Fan, Y.; Garrison, T. R.; Daza, A. V.; Grayson, G. K.; Zhu, C. Z.; Pai, M.; Chandran, P.; Salyers, A. K.; Wensink, E. J.; Honore, P.; Sullivan, J. P.; Dart, M. J.; Meyer, M. D. In vitro and in vivo characterization of A-796260: a selective cannabinoid CB₂ receptor agonist exhibiting analgesic activity in rodent pain models. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 390 - 401.

³⁴³ Nackley, A. G.; Makriyannis, A.; Hohmann, A. G. Selective activation of cannabinoid CB₂ receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* **2003**, *119*, 747 - 757.

³⁴⁴ Ibrahim, M. M.; Porreca, F.; Lai, J.; Albrecht, P. J.; Rice, F. L.; Khodorova, A.; Davar, G.; Makriyannis, A.; Vanderah T. W.; Mata, H. P.; Malan, T. P. Jr. CB₂ cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 3093 - 3098.

³⁴⁵ Kinsey, S. G.; Mahadevan, A.; Zhao, B.; Sun, H.; Naidu, P. S.; Razdan, R. K.; Selley, D. E.; Imad Damaj, M.; Lichtman, A. H. The CB₂ cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, 244 - 251.

En ce qui concerne la douleur viscérale, peu d'études ont exploré le rôle des récepteurs CB₂ dans la sensation de cette douleur. En 2006, une étude a montré que les agonistes des récepteurs CB₁ et CB₂ atténuent le degré de sensibilité viscérale, tant dans des conditions normales que lorsque la sensibilité était augmentée par une inflammation du côlon induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS).³⁴⁶ L'étude de Rousseaux *et al*, en 2006, a confirmé l'implication des récepteurs CB₂ dans la douleur viscérale.³⁴⁷ Ainsi, il a été présenté que l'agent probiotique *Lactobacillus acidophilus* augmentait le taux de récepteurs CB₂ et opioïdes dans l'épithélium intestinale des rongeurs traités (rats et souris). Le rôle des récepteurs CB₂ a été validé par l'apparition d'une réponse inverse lors de l'administration de l'AM630 (agoniste inverse CB₂). Ces résultats démontrent que les récepteurs CB₂ peuvent être recrutés dans le tractus gastro-intestinal, et peuvent contribuer à la restauration des sensations viscérales normales lors d'une irritation.

b. La FAAH et la douleur

De nombreuses recherches ont démontré que le blocage pharmacologique de la FAAH réduisait les comportements nociceptifs et hyperalgésiques dans des modèles de douleur aiguë, inflammatoire ou neuropathique.³⁴⁸ Il a notamment été affirmé que l'inhibition complète de la FAAH, avec pour conséquence des taux d'ECs dix fois supérieurs à la normale, produisait des effets antinociceptifs d'amplitude similaire dans des tests de douleur thermique aiguë, viscérale, neuropathique ou inflammatoire.³⁴⁹

En ce qui concerne la douleur neuropathique, Kinsey *et al* ont montré que l'allodynie « froide » et mécanique était réduite dans un modèle de douleur induite par ligature chronique du nerf sciatique, par un mécanisme faisant intervenir les récepteurs aux cannabinoïdes.³⁵⁰

³⁴⁶ Sanson, M.; Bueno, L.; Fioramonti, J. Involvement of cannabinoid receptors in inflammatory hypersensitivity to colonic distension in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* **2006**, *18*, 949 - 956.

³⁴⁷ Rousseaux, C.; Thuru, X.; Gelot, A.; Barnich, N.; Neut, C.; Dubuquoy, L.; Dubuquoy, C.; Merour, E.; Geboes, K.; Chamailard, M.; Ouwehand, A.; Leyer, G.; Carcano, D.; Colombel, J. F.; Ardid, D.; Desreumaux, P. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 35 - 37.

³⁴⁸ Schlosburg, J. E.; Kinsey, S. G.; Lichtman, A. H. Targeting fatty acid amide hydrolase (FAAH) to treat pain and inflammation. *AAPS J.* **2009**, *11*, 39 - 44.

³⁴⁹ Kinsey, S. G.; Long, J. Z.; Cravatt, B. F.; Lichtman, A. H. Fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase inhibitors produce anti-allodynic effects in mice through distinct cannabinoid receptor mechanisms. *J. Pain.* **2010**, *11*, 1420 - 1428.

³⁵⁰ Kinsey, S. G.; Long, J. Z.; O'Neal, S. T.; Abdullah, R. A.; Poklis, J. L.; Boger, D. L.; Cravatt, B. F.; Lichtman, A. H. Blockade of endocannabinoid-degrading enzymes attenuates neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *330*, 902 - 910.

Par ailleurs, dans un modèle périphérique de douleur induite par une injection locale de capsaïcine dans la patte de rat, l'hypersensibilité observée était directement modulée par l'inhibition locale de la FAAH par l'URB597.³⁵¹ Aussi, les effets induits par l'URB597 sont bloqués lors de l'ajout d'un antagoniste CB₁.

En ce qui concerne la douleur inflammatoire, le blocage de la FAAH par l'URB937, un inhibiteur de la FAAH ne passant pas la BHE, a récemment présenté des effets antinociceptifs médiés par le récepteur CB₁ dans des modèles murins de douleur neuropathique, inflammatoire et arthritique.^{352,353} Aussi, dans le modèle de l'arthrite induite par l'injection de l'adjuvant de Freund, l'URB937 a notamment réduit l'hyperalgésie mécanique et thermique de façon bien plus importante que d'autres inhibiteurs de la FAAH : l'URB597 et le PF-3845.³⁵⁴

En ce qui concerne la douleur viscérale, l'injection chronique de petites doses d'URB597 (1 mg/kg, i.p., 6 jours), dans un modèle de douleur viscérale induite par l'acide acétique, a montré une conservation des propriétés analgésiques.³⁵⁵ Dans cette étude, l'expression du récepteur CB₁ au niveau central n'a pas été altérée par le traitement, alors que l'AEA a vu son taux doublé dans le cerveau.

Toutes ces études soulignent le potentiel analgésique des agonistes des récepteurs CB₂ et des inhibiteurs de la FAAH.

³⁵¹ Spradley, J. M.; Guindon, J.; Hohmann, A. G. Inhibitors of monoacylglycerol lipase, fatty-acid amide hydrolase and endocannabinoid transport differentially suppress capsaicin-induced behavioral sensitization through peripheral endocannabinoid mechanisms. *Pharmacol. Res.* **2010**, *62*, 249 - 258.

³⁵² Clapper, J. R.; Moreno-Sanz, G.; Russo, R.; Guijarro, A.; Vacondio, F.; Duranti, A.; Tontini, A.; Sanchini, S.; Sciolino, N. R.; Spradley, J. M.; Hohmann, A. G.; Calignano, A.; Mor, M.; Tarzia, G.; Piomelli, D. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 1265 - 1270.

³⁵³ Moreno-Sanz, G.; Sasso, O.; Guijarro, A.; Oluyemi, O.; Bertorelli, R.; Reggiani, A.; Piomelli, D. Pharmacological characterization of the peripheral FAAH inhibitor URB937 in female rodents: interaction with the Abcg2 transporter in the blood-placenta barrier. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 1620 - 1628.

³⁵⁴ Sasso, O.; Bertorelli, R.; Bandiera, T.; Scarpelli, R.; Colombano, G.; Armirotti, A.; Moreno-Sanz, G.; Reggiani, A.; Piomelli, D. Peripheral FAAH inhibition causes profound antinociception and protects against indomethacin-induced gastric lesions. *Pharmacol. Res.* **2012**, *65*, 553 - 563.

³⁵⁵ Busquets-Garcia, A.; Puighermanal, E.; Pastor, A.; De la Torre, R.; Maldonado, R.; Ozaita, A. Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biol. Psychiatry.* **2011**, *70*, 479 - 486.

2. L'inflammation

a. Le récepteur CB₂ et l'inflammation

En plus de la douleur, le cannabis est également connu depuis des millénaires pour traiter différentes pathologies liées à l'inflammation.³⁵⁶ Le récepteur CB₂ est exprimé quasi-exclusivement dans les cellules du système immunitaire, au niveau périphérique³⁵⁷ et central,³⁵⁸ ainsi sa surexpression lors d'épisodes inflammatoires³⁵⁹ laisse supposer son rôle clé dans le contrôle de l'inflammation. Plusieurs études ont d'ailleurs montré, entre autres, l'implication du récepteur CB₂ dans des pathologies neurodégénératives, les MICI, l'athérosclérose ou encore la dermatite de contact.

En ce qui concerne les maladies neurodégénératives, des recherches ont notamment montré que, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, le récepteur CB₂ possède la capacité de réguler la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires, mais joue aussi un rôle dans la diminution des plaques A β . En effet, il a été montré que l'agoniste sélectif des récepteurs CB₂, le JWH015, induit une suppression des plaques A β par des cellules THP-1 (dérivés des macrophages) dans des tissus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et que cet effet est contrecarré par le SR144528 (agoniste inverse CB₂).³⁶⁰

Des résultats du même type ont été publiés sur la sclérose en plaques (SEP). Notamment, une étude sur modèle de souris invalidées génétiquement pour les récepteurs CB₁ et CB₂, a révélé que l'activation du récepteur CB₁ induit une réduction de la spasticité alors que l'activation des récepteurs CB₂ réduit l'inflammation *via* les cellules T et retarde ainsi l'avancement de la pathologie.

³⁵⁶ Berdyshev, E. V. Cannabinoid receptor and the regulation of immune response. *Chem. Phys. Lipids*. **2000**, *108*, 169 - 190.

³⁵⁷ Galiègue, S.; Mary, S.; Marchand, J.; Dussossoy, D.; Carrière, D.; Carayon, P.; Bouaboula, M.; Shire, D.; Le Fur, G.; Casellas, P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *232*, 54 - 61.

³⁵⁸ Van Sickle, M. D.; Duncan, M.; Kingsley, P. J.; Mouihate, A.; Urbani, P.; Mackie, K.; Stella, N.; Makriyannis, A.; Piomelli, D.; Davison, J. S.; Marnett, L. J.; Di Marzo, V.; Pittman, Q. J.; Patel, K. D.; Sharkey, K. A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science* **2005**, *310*, 329 - 332.

³⁵⁹ Mukhopadhyay, S.; Das, S.; Williams, E. A.; Moore, D.; Jones, J. D.; Zahm, D. S.; Ndengele, M. M.; Lechner, A. J.; Howlett, A. C. Lipopolysaccharide and cyclic AMP regulation of CB₂ cannabinoid receptor levels in rat brain and mouse RAW 264.7 macrophages. *J. Neuroimmunol.* **2006**, *181*, 82 - 92.

³⁶⁰ Benito, C.; Tolon, R. M.; Pazos, M. R.; Nunez, E.; Castillo, A. I.; Romero, J. Cannabinoid CB₂ receptors in human brain inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 277 - 285.

Il a également été montré dans cette étude que les souris KO-CB₂ ont une incidence sur la SEP plus élevée que les souris sauvages.³⁶¹

Le système endocannabinoïde a clairement montré sa forte implication dans les MICI. Di Sabatini *et al* ont notamment révélé que les taux d'AEA étaient plus faibles dans les muqueuses intestinales des patients atteints de MICI par rapport à des muqueuses intestinales saines, ceci à cause d'une baisse d'activité de l'enzyme de synthèse de l'AEA, la NAPE-PLD, ainsi qu'à une augmentation de l'activité de l'enzyme de biodégradation de l'AEA, la FAAH. Dans cette même étude, ils ont montré que le taux d'AEA diminuait l'inflammation de la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MICI, ceci par une diminution de la production de collagène et de cytokines pro-inflammatoires.³⁶²

D'autres études ont également montré que le CP-55,940, le Δ^9 -THC et le WIN-55,212-2 (agonistes non sélectifs des récepteurs aux cannabinoïdes) et le JWH015 (agoniste sélectif CB₂) inhibaient la production d'interleukine 8 (IL-8, cytokine pro-inflammatoire), dans la lignée cellulaire HT29 (cellules d'adénocarcinomes coliques). Alors que l'effet n'est pas observable pour un agoniste sélectif CB₁ et contrecarré lors de l'ajout d'un antagoniste CB₂.³⁶³ De nombreux modèles animaux de colite ont validé l'effet protecteur des agonistes sélectifs CB₂. Un traitement par le JWH133 dans des modèles de colite induite par de l'huile de moutarde ou par du « dextran-sodium sulfate » (DSS) a montré une diminution de l'inflammation du côlon.³⁶⁴ Une baisse de l'activité inflammatoire est également observée dans des modèles de colite spontanée chez les souris IL-10^{-/-}.³⁶⁵

³⁶¹ Maresz, K.; Pryce, G.; Ponomarev, E. D.; Marsicano, G.; Croxford, J. L.; Shriver, L. P.; Ledent, C.; Cheng, X.; Carrier, E. J.; Mann, M. K.; Giovannoni, G.; Pertwee, R. G.; Yamamura, T.; Buckley, N. E.; Hillard, C. J.; Lutz, B.; Baker, D.; Dittel, B. N. Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB₁ on neurons and CB₂ on autoreactive T cells. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 492 - 497.

³⁶² Di Sabatino, A.; Battista, N.; Biancheri, P.; Rapino, C.; Rovedatti, L.; Astarita, G.; Vanoli, A.; Dainese, E.; Guerci, M.; Piomelli, D.; Pender, S. L.; MacDonald, T. T.; Maccarrone, M.; Corazza, G. R. The endogenous cannabinoid system in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol.* **2011**, *4*, 574 - 583.

³⁶³ Ihenetu, K.; Molleman, A.; Parsons, M. E.; Whelan, C. J. Inhibition of interleukin-8 release in the human colonic epithelial cell line HT-29 by cannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *458*, 207 - 215.

³⁶⁴ Kimball, E. S.; Schneider, C. R.; Wallace, N. H.; Hornby, P. J. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, *291*, 364 - 371.

³⁶⁵ Singh, U. P.; Singh, N. P.; Singh, B.; Price, R. L.; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P. S. Cannabinoid receptor-2 (CB₂) agonist ameliorates colitis in IL-10(-/-) mice by attenuating the activation of T cells and promoting their apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *258*, 256 - 267.

Enfin, le récepteur CB₂ joue aussi un rôle dans le contrôle de l'athérosclérose en diminuant l'inflammation vasculaire, la migration de cellules immunitaires ainsi que la formation de la plaque athérosclérotique.³⁶⁶ Pour la dermatite de contact, plusieurs études ont montré que le récepteur CB₂ participait à la réponse allergique et que l'administration d'antagonistes / agonistes inverses de ce récepteur améliorait la symptomatologie de cette pathologie,³⁶⁷ même si d'autres études contredisent cette affirmation.³⁶⁸

b. La FAAH et l'inflammation

En ce qui concerne la dermatite de contact, l'application répétée de 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB) sur le pavillon de l'oreille génère chez la souris une réponse allergique, *via* l'activation des cellules T spécifiques cutanées, qui se traduit concrètement par un gonflement du pavillon. Il a été démontré que chez les souris n'exprimant pas la FAAH, le gonflement du pavillon était significativement plus faible que chez les souris sauvages. De plus, l'administration répétée de DNFB chez des souris sauvages a mené à une augmentation locale du taux d'AEA et une augmentation de l'expression d'ARNm du récepteur CB₂.³⁶⁸

En ce qui concerne les MICI, plusieurs études suggèrent un rôle protecteur du système endocannabinoïde dans le contrôle de l'inflammation. Ainsi, Massa *et al*³⁶⁹ ont montré que l'inactivation génétique de la FAAH chez des animaux dont la colite avait été induite à l'acide 2,4-dinitrobenzène sulfonique (DNBS), avait réduit notablement l'inflammation des tissus. Une étude du Pr. Andreu a mis en évidence une surexpression des récepteurs CB₂, de la MAGL ou encore de la DAGL au niveau du tractus gastro-intestinal de patients atteints de MICI.³⁷⁰

³⁶⁶ Steffens, S.; Veillard, N. R.; Arnaud, C.; Pelli, G.; Burger, F.; Staub, C.; Karsak, M.; Zimmer, A.; Frossard, J. L.; Mach, F. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* **2005**, *434*, 782 - 786.

³⁶⁷ Ueda, Y.; Miyagawa, N.; Matsui, T.; Kaya, T.; Iwamura, H. Involvement of cannabinoid CB₂ receptor-mediated response and efficacy of cannabinoid CB₂ receptor inverse agonist, JTE-907, in cutaneous inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *520*, 164 - 171.

³⁶⁸ Karsak, M.; Gaffal, E.; Date, R.; Wang-Eckhardt, L.; Rehnelt, J.; Petrosino, S.; Starowicz, K.; Steuder, R.; Schlicker, E.; Cravatt, B.; Mechoulam, R.; Buettner, R.; Werner, S.; Di Marzo, V.; Tüting, T.; Zimmer, A. Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science* **2007**, *316*, 1494 - 1497.

³⁶⁹ Massa, F.; Marsicano, G.; Hermann, H.; Cannich, A.; Monory, K.; Cravatt, B. F.; Ferri, G. L.; Sibaev, A.; Storr, M.; Lutz, B. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1202 - 1209.

³⁷⁰ Marquez, L.; Suarez, J.; Iglesias, M.; Bermudez-Silva, F. J.; Rodriguez de Fonseca, F.; Andreu, M. Ulcerative colitis induces changes on the expression of the endocannabinoid system in the human colonic tissue. *PLoS One* **2009**, *4*, 6893.

Enfin, Storr *et al* ont montré que l'URB597, tout comme le VDM11 (un inhibiteur de la recapture d'AEA), augmentaient le taux de survie et diminuaient l'inflammation des souris souffrantes de colite induite par le TNBS,^{371,372} avec une préservation des tissus et une nette diminution de l'activité des myéloperoxydases (MPO).³⁷³

Ces travaux montrent de manière concluante l'intérêt des inhibiteurs de la FAAH dans le traitement des MICI.

3. Les autres applications thérapeutiques

a. Les autres applications thérapeutiques du récepteur CB₂

D'autres pathologies ont été associées au récepteur CB₂ ces dernières années, comme l'ostéoporose, les cancers ou encore les hépatologies chroniques.

En ce qui concerne l'ostéoporose, cette pathologie se traduit par une baisse de la masse osseuse ainsi qu'une altération de la microarchitecture osseuse augmentant le risque de fracture. Récemment, le récepteur CB₂ a été identifié à la surface des cellules qui construisent et résorbent l'os, les ostéoblastes et ostéoclastes.³⁷⁴ Il apparaît que le récepteur CB₂ coordonnant l'action de ces cellules, joue un rôle de régulateur dans la croissance osseuse. Aussi, un modèle d'ostéoporose induite par l'ablation des ovaires chez la souris a confirmé ce rôle de régulateur de la croissance en montrant que les rongeurs, dont le récepteur CB₂ a été invalidé, affichaient une densité osseuse inférieure à celle de leurs homologues sauvages alors que l'injection d'un agoniste sélectif CB₂ (HU-308) aux souris sauvages diminue de manière significative la perte osseuse.³⁷⁴

³⁷¹ Storr, M. A.; Keenan, C. M.; Emmerdinger, D.; Zhang, H.; Yüce, B.; Sibaev, A.; Massa, F.; Buckley, N. E.; Lutz, B.; Göke, B.; Brand, S.; Patel, K. D.; Sharkey, K. A. Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB1 and CB2 receptors. *J. Mol. Med. (Berl)*. **2008**, *86*, 925 - 936.

³⁷² D'Argenio, G.; Valenti, M.; Scaglione, G.; Cosenza, V.; Sorrentini, I.; Di Marzo, V. Up-regulation of anandamide levels as an endogenous mechanism and a pharmacological strategy to limit colon inflammation. *FASEB J*. **2006**, *20*, 568 - 570.

³⁷³ Engel, M. A.; Kellermann, C. A.; Rau, T.; Burnat, G.; Hahn, E. G.; Konturek, P. C. Ulcerative colitis in AKR mice is attenuated by intraperitoneally administered anandamide. *J. Physiol. Pharmacol*. **2008**, *59*, 673 - 689.

³⁷⁴ Ofek, O.; Karsak, M.; Leclerc, N.; Fogel, M.; Frenkel, B.; Wright, K.; Tam, J.; Attar-Namdar, M.; Kram, V.; Shohami, E.; Mechoulam, R.; Zimmer, A.; Bab, I. Peripheral cannabinoid receptor, CB₂, regulates bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 696 - 701.

Ainsi, comme pour la dermatite de contact, si l'implication du récepteur CB₂ dans la déperdition osseuse ne fait aucun doute, d'autres études devront être menées afin de déterminer les mécanismes précis des différents ligands utilisés dans ces études.

En ce qui concerne le récepteur CB₂ et son implication dans le cancer, cela remonte aux années 1970 quand des chercheurs ont mis en évidence la capacité du Δ⁹-THC à inhiber la prolifération de cellules d'adénocarcinomes pulmonaires.³⁷⁵ Depuis, différentes recherches ont montré que l'administration de cannabinoïdes exerce un effet antiprolifératif sur plusieurs types de cellules en culture et de modèles de tumeurs xénogreffées chez le rat et la souris.^{376,377} D'autres études ont montré que, dans les astrocytes, le Δ⁹-THC, le WIN-55,212-2 et le HU-210 (agonistes non sélectifs des récepteurs aux cannabinoïdes) présentaient des activités anti-apoptotiques et que l'utilisation d'analogues de céramide induisait l'apoptose des cellules.³⁷⁸ Des travaux réalisés sur des cellules de gliomes ont également présenté des résultats inverses par rapport à ceux sur les astrocytes : les cannabinoïdes induisent l'apoptose sur ces cellules. Dans ce cas, l'effet pro-apoptotique des cannabinoïdes serait lié à la modulation de la synthèse *de novo* de céramide par le récepteur CB₂.^{379,380} Bien d'autres études ont présenté des résultats sur le récepteur CB₂ et les cancers, comme le cancer de la prostate,³⁸¹ le cancer colorectal mais aussi sur la capacité du WIN-55,212-2 à inhiber la production de « vascular endothelial growth factor » (VEGF) et de « vascular endothelial growth factor receptor-2 » (VEGFR-2) dans le processus d'angiogénèse. Le développement d'agonistes sélectifs des récepteurs CB₂ constitue donc une voie prometteuse dans le traitement de certains cancers.

³⁷⁵ Munson, A. E.; Harris, L. S.; Friedman, M. A.; Dewey, W. L.; Carchman, R. A. Antineoplastic activity of cannabinoïdes. *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, *55*, 597 - 602.

³⁷⁶ Guzman, M. Cannabinoids : potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer.* **2003**, *3*, 745 - 755.

³⁷⁷ Bifulco, M.; Laezza, C.; Pisanti, S.; Gazerro, P. Cannabinoids and cancer : pros and cons of an antitumour strategie, *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 123 - 135.

³⁷⁸ Gómez Del Pulgar, T.; De Ceballos, M. L.; Guzmán, M.; Velasco, G. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36527 - 36533.

³⁷⁹ Sánchez, C.; De Ceballos, M. L.; Gomez del Pulgar, T.; Rueda, D.; Corbacho, C.; Velasco, G.; Galve-Roperh, I.; Huffman, J. W.; Ramón y Cajal, S.; Guzmán, M. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB₂ cannabinoid receptor. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5784 - 5789.

³⁸⁰ Gómez del Pulgar, T.; Velasco, G.; Sánchez, C.; Haro, A.; Guzmán, M. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem. J.* **2002**, *363*, 183 - 188.

³⁸¹ Ruiz, L.; Miguel, A.; Díaz-Laviada, I. Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 400 - 404.

Enfin, en ce qui concerne les hépatologies chroniques, Lotersztajn *et al* ont mis en évidence la surexpression de ce récepteur en cas d'hépatopathies.^{382,383} Aussi, une étude de comparaison entre un modèle murin invalidé pour le récepteur CB₂ et un modèle murin sauvage, a révélé qu'après une intoxication au tétrachlorure de carbone, les tissus hépatiques des souris KO-CB₂ étaient significativement plus fibrosés que ceux des souris sauvages. Ainsi, on peut en déduire que le récepteur CB₂ atténue la fibrose expérimentale en réduisant la prolifération et en provoquant l'apoptose des myofibroblastes hépatiques.³⁸⁴ D'autres études ont également montré que le récepteur CB₂ avait un rôle neuroprotecteur dans l'encéphalopathie hépatique ainsi qu'un rôle protecteur dans les lésions induites par ischémie-reperfusion.^{385,386} Le récepteur CB₂ constitue donc une piste sérieuse pour le traitement de maladies hépatiques, même si le rôle du récepteur CB₁ semble important également dans ces pathologies.

b. Les autres applications thérapeutiques de la FAAH

Le mot anandamide vient du sanskrit et signifie béatitude ou bonheur suprême. A partir de cette étymologie, nous comprenons rapidement que les EC sont à l'origine d'effets psychotropes. Ces effets sont associés au récepteur CB₁ et englobent des sentiments comme l'anxiété, la panique ou encore la paranoïa.

Aussi, des inhibiteurs de la FAAH ont démontré des effets anxiolytiques CB₁-dépendants dans de nombreux modèles, sans pour autant présenter les effets négatifs associés aux agonistes directs du récepteur CB₁.³⁸⁷

³⁸² Teixeira-Clerc, F.; Julien, B.; Grenard, P.; Tran Van Nhieu, J.; Deveaux, V.; Li, L.; Serriere-Lanneau, V.; Ledent, C.; Mallat, A.; Lotersztajn, S. CB₁ cannabinoid receptor antagonism : a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 671 - 676.

³⁸³ Lotersztajn, S.; Teixeira-Clerc, F.; Julien, B.; Deveaux, V.; Ichigotani, Y.; Manin, S.; Tran-Van-Nhieu, J.; Karsak, M.; Zimmer, A.; Mallat, A. CB₂ receptors as new therapeutic targets for liver diseases. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 286 - 289.

³⁸⁴ Julien, B.; Grenard, P.; Teixeira-Clerc, F.; Van Nhieu, J. T.; Li, L.; Karsak, M.; Zimmer, A.; Mallat, A.; Lotersztajn, S. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB₂ in the liver. *Gastroenterology* **2005**, *128*, 742 - 755.

³⁸⁵ Avraham, Y.; Israeli, E.; Gabbay, E.; Okun, A.; Zolotarev, O.; Silberman, I.; Ganzburg, V.; Dagon, Y.; Magen, I.; Vorobia, L.; Pappo, O.; Mechoulam, R.; Ilan, Y.; Berry, E. M. Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide induced hepatic encephalopathy in mice. *Neurobiol. Dis.* **2006**, *21*, 237 - 245.

³⁸⁶ Bátkai, S.; Osei-Hyiaman, D.; Pan, H.; El-Assal, O.; Rajesh, M.; Mukhopadhyay, P.; Hong, F.; Harvey-White, J.; Jafri, A.; Haskó, G.; Huffman, J. W.; Gao, B.; Kunos, G.; Pacher, P. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J.* **2007**, *21*, 1788 - 1800.

³⁸⁷ Gaetani, S.; Dipasquale, P.; Romano, A.; Righetti, L.; Cassano, T.; Piomelli, D.; Cuomo, V. The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic and antidepressant drugs. *Int. Rev. Neurobiol.* **2009**, *85*, 57 - 72.

Des souris traitées à l'URB597 ont ainsi présenté une baisse de l'anxiété dans des tests de labyrinthe et ces effets ont perduré sur un traitement à long terme.³⁵⁵ D'autres études dans un modèle de comportements obsessionnels-compulsifs ont démontré que l'inhibition de la FAAH par l'URB597 ou le PF-3845 diminuait l'anxiété des souris *via* un mécanisme CB₁-dépendant.^{388,389}

Comme décrit pour le récepteur CB₂, la recherche du rôle du système endocannabinoïde dans l'ostéoporose vient tout juste de commencer. Cependant, il est d'ores et déjà établi que la FAAH est présente dans les ostéoclastes humains, tout comme les récepteurs aux cannabinoïdes CB₁ et CB₂. Rossi *et al* suggèrent même que les récepteurs aux cannabinoïdes et aux vanilloïdes (également présents dans les ostéoclastes humains) interagissent pour moduler la balance intrinsèque de résorption / minéralisation de l'os par différentes actions de l'AEA sur ces mêmes récepteurs.³⁹⁰

Actuellement, des cannabinoïdes de synthèse, comme le nabilone, ou des médicaments à base de Δ^9 -THC pur, comme le dronabinol, sont prescrits pour les nausées et vomissements causés par la chimiothérapie ainsi que pour la perte d'appétit des personnes atteintes du SIDA.³⁹¹ Même si ces médicaments sont efficaces, il s'agit d'agonistes du récepteur CB₁ et par conséquent, ils présentent des effets psychotropes associés, ce qui en limite l'utilisation. Dernièrement, des inhibiteurs de FAAH et de MAGL ont montré des effets anti-émétiques / anti-nauséux dans des modèles précliniques.³⁹² Ainsi, un traitement à l'URB597 a réduit les épisodes vomitifs, induits par la nicotine et le cisplatine, chez les musaraignes des maisons.³⁹³ De plus, dans un modèle de rats traités à l'URB597, le réflexe nauséux (« gaping ») en réponse à des stimulations olfactives³⁹⁴ et gustatives³⁹⁵ a été supprimé.

³⁸⁸ Gomes, F. V.; Casarotto, P. C.; Resstel, L. B.; Guimarães, F. S. Facilitation of CB1 receptor-mediated neurotransmission decreases marble burying behavior in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. **2011**, *35*, 434 - 438.

³⁸⁹ Kinsey, S. G.; O'Neal, S. T.; Long, J. Z.; Cravatt, B. F.; Lichtman, A. H. Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2011**, *98*, 21 - 27.

³⁹⁰ Rossi, F.; Siniscalco, D.; Luongo, L.; De Petrocellis, L.; Bellini, G.; Petrosino, S.; Torella, M.; Santoro, C.; Nobili, B.; Perrotta, S.; Di Marzo, V.; Maione, S. The endovanilloid/endocannabinoid system in human osteoclasts: possible involvement in bone formation and resorption. *Bone*. **2009**, *44*, 476 - 484.

³⁹¹ Pertwee, R. G. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *156*, 397 - 411.

³⁹² Parker, L. A.; Rock, E. M.; Limebeer, C. L. Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163*, 1411 - 1422.

³⁹³ Parker, L. A.; Limebeer, C. L.; Rock, E. M.; Litt, D. L.; Kwiatkowska, M.; Piomelli, D. The FAAH inhibitor URB-597 interferes with cisplatin- and nicotine-induced vomiting in the *Suncus murinus* (house musk shrew). *Physiol. Behav.* **2009**, *97*, 121 - 124.

³⁹⁴ Rock, E. M.; Limebeer, C. L.; Mechoulam, R.; Piomelli, D.; Parker, L. A. The effect of cannabidiol and URB597 on conditioned gaping (a model of nausea) elicited by a lithium-paired context in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **2008**, *196*, 389 - 395.

³⁹⁵ Cross-Mellor, S. K.; Ossenkopp, K. P.; Piomelli, D.; Parker, L. A. Effects of the FAAH inhibitor, URB597, and anandamide on lithium-induced taste reactivity responses: a measure of nausea in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **2007**, *190*, 135 - 143.

Ces différentes études prouvent clairement l'intérêt du récepteur CB₂ et de la FAAH dans le traitement d'un large spectre de pathologies. Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au développement d'agonistes CB₂ et d'inhibiteurs de la FAAH pour le traitement des MICI, puisque les traitements de ces maladies restent, à ce jour, insuffisants.

CONCEPTION

Nous savons aujourd'hui, d'après plusieurs études réalisées *in vitro* et *in vivo*, que le récepteur CB₂ joue un rôle important dans la régulation de l'inflammation intestinale. En effet, le JWH015, un agoniste sélectif du récepteur CB₂, a notamment montré une inhibition dose-dépendante de la production d'IL-8 induite par TNF- α sur la lignée cellulaire d'adénocarcinome colique HT29. Or, cet effet n'a pas été observé avec un agoniste sélectif des récepteurs CB₁.³⁶³

Plus récemment, il a été démontré que le JWH133, un autre agoniste sélectif des récepteurs CB₂, diminue l'inflammation du côlon dans des modèles murins de colites induites par différents agents irritants tels l'huile de moutarde, le DSS et le TNBS.^{26,364}

De plus, Di Sabatino *et al* ont montré que le taux de l'AEA est plus faible dans les muqueuses intestinales des patients atteints de MICI par rapport à des muqueuses intestinales saines. Ceci serait dû à une baisse d'activité de l'enzyme de biosynthèse de l'AEA, la NAPE-PLD, ainsi que par une augmentation de l'activité de l'enzyme de dégradation de l'AEA, la FAAH. De plus, ces études montrent que l'AEA diminue l'inflammation de la muqueuse intestinale chez ces mêmes patients atteints de MICI, par une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et de collagène.

Ces nombreuses études permettent de conclure que le récepteur CB₂ et la FAAH sont deux cibles thérapeutiques incontestables dans le traitement des MICI. Ainsi, nous avons envisagé la conception de deux nouvelles séries d'inhibiteurs de la FAAH et d'une série d'agonistes sélectifs du récepteur CB₂.

I. Conception d'inhibiteurs de la FAAH de type 2-benzoxazolinone – Série A

1. L'URB597 : un lead

La famille des carbamates avec comme chef de file l'URB597 constitue l'une des plus importantes familles d'inhibiteurs de la FAAH connues à ce jour. Comme précédemment énoncé, l'URB597 est particulièrement actif, entre autres, sur la douleur aiguë, inflammatoire ou neuropathique, et protège de la colite expérimentale.

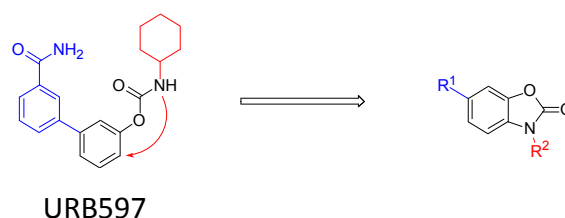


Figure 63. Conception de la série d'inhibiteurs de la FAAH de type 2-benzoxazolinone

À partir de la structure de l'URB597, nous avons choisi de concevoir une nouvelle famille d'inhibiteurs de la FAAH : les 2-benzoxazolinones. Cette nouvelle famille a été conçue suite à la rigidification de la fonction carbamate de l'URB597 (cf. figure 63). Plusieurs relations structure-activité (RSA) ont été envisagées, avec l'aide d'études de modélisation moléculaire, autour de ce motif facilement substituable afin de concevoir de nouveaux inhibiteurs originaux de la FAAH.

2. Pharmacomodulations envisagées autour de la 2-benzoxazolinone

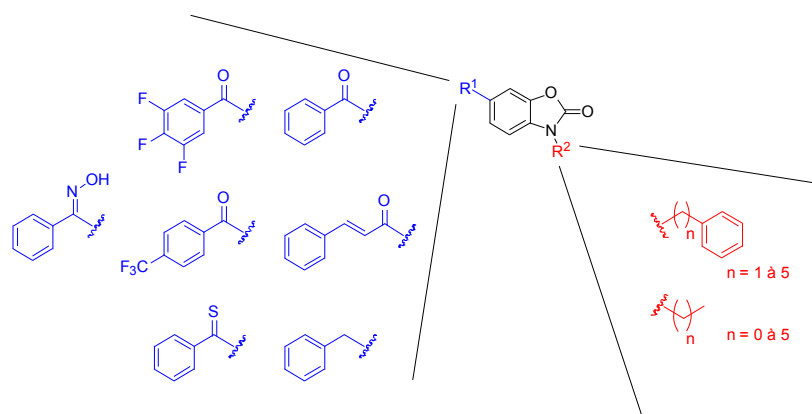


Figure 64. Série des 2-benzoxazolinones envisagées en tant qu'inhibiteurs de la FAAH

Compte-tenu de la structure de la FAAH et de la lipophilie de ses inhibiteurs, plusieurs modulations du motif 2-benzoxazolinone ont été effectuées (*cf.* figure 64). Tout d'abord, nous avons envisagé d'acyler la position C-6 de la 2-benzoxazolinone par différents groupements aromatiques de type benzoyle, substitués ou non, ou 3-phényl-acryloyle. Ces groupements se placeraient au niveau du port cytosolique de la FAAH.

Ensuite, nous avons imaginé de substituer l'atome d'azote par différentes chaînes aliphatiques et phénylalkyles qui pourraient se loger dans la large poche lipophile de la FAAH : l'ABP. En effet, les phénylalanines 381 et 432, présentes dans l'ABP, permettent par des interactions de type π -stacking d'ancrer de longues chaînes phénylalkyles. Ceci est favorisé par les méthionines 436 et 495, également présentes dans l'ABP, qui, en orientant leurs paires libres d'électrons vers les hydrogènes engagés dans les interactions de type π -stacking, stabilisent l'inhibiteur.²³³

Enfin, nous avons envisagé de réduire le groupement carbonyle en position C-6 du composé 6-benzoyl-benzoxazolin-2-one mais également de le remplacer par une thiocétone et une oxime, ceci afin de vérifier son intérêt dans le mécanisme d'inhibition de la FAAH.

3. Sélection de composés de type 2-benzoxazolinone dans la chimiothèque

Précédemment au laboratoire, des composés, issus d'un criblage virtuel effectué sur la chimiothèque du laboratoire de chimie thérapeutique de la Faculté de Pharmacie de Lille, ont été sélectionnés pour évaluer pharmacologiquement leur potentiel inhibiteur de la FAAH.

Ainsi, à partir d'une banque de 1998 produits, 892 molécules dont 357 composés de type 2-benzoxazolinone avaient été sélectionnées pour être modélisées dans le site actif de la FAAH en utilisant une méthode de « docking déterministique ». Cette méthode avait l'avantage de rechercher des conformations en imposant une ou plusieurs contraintes au logiciel.

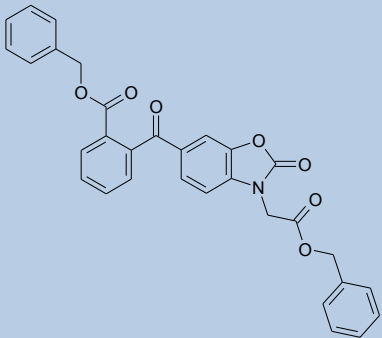
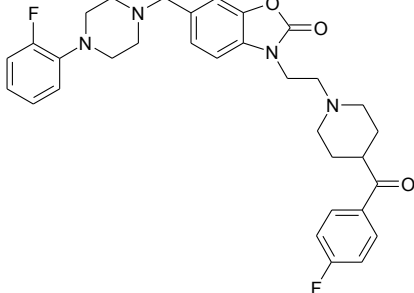
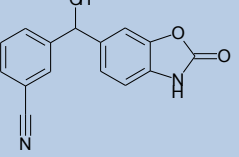
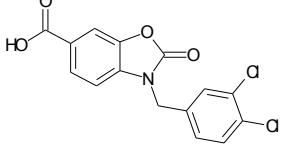
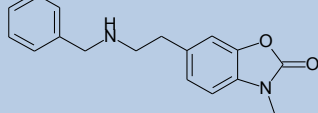
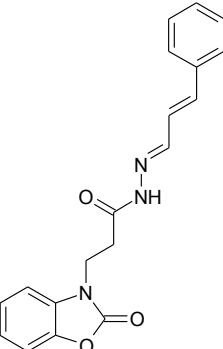
Le programme *Gold*, utilisé pour le « docking » des molécules, est un algorithme génétique permettant de générer plusieurs positionnements du composé dans le site actif. Le programme choisit alors les meilleurs descendants par sélection naturelle et détermine un certain nombre de positionnements préférentiels en termes d'interaction ligand-récepteur et de conformation.

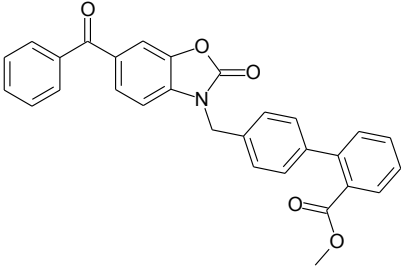
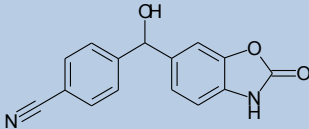
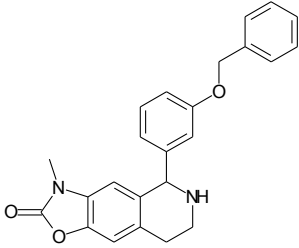
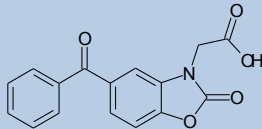
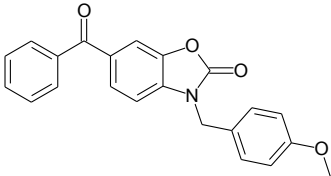
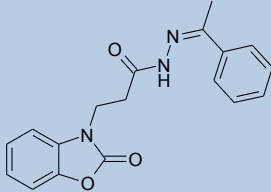
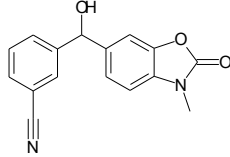
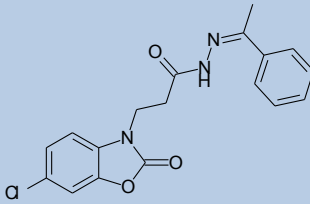
Ensuite, les 30 positionnements des 892 composés issus du « docking » ont été soumis à des expériences de « scoring ». Lors de ces manipulations, il s'agit d'estimer des interactions ligand-récepteur grâce à différentes fonctions. Après cette étape, le top 4 % du « scoring », soit 54 molécules, a été évalué dans un test d'inhibition compétitive de la FAAH à 10^{-3} M.

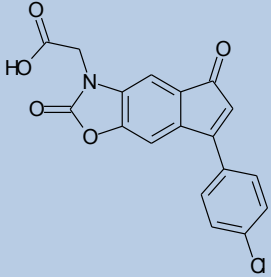
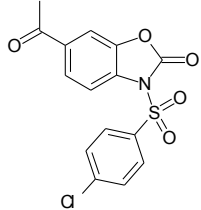
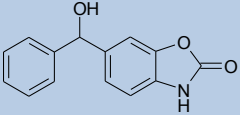
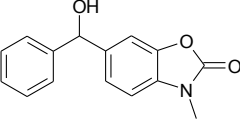
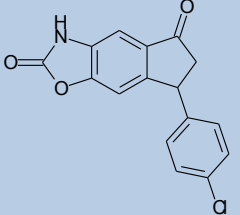
Enfin, parmi les 54 composés retenus précédemment, 19 composés de type 2-benzoxazolinone ont présenté un pourcentage d'inhibition de la FAAH supérieur à 60 %, dont 11 ont inhibé l'enzyme avec un pourcentage supérieur à 80 % à la concentration de 10^{-3} M.

Les CI_{50} de ces 19 composés de type 2-benzoxazolinone seront donc déterminées au même titre que les composés envisagés dans la Série A. Les structures de ces 19 composés issus de la chimiothèque sont regroupées dans le tableau 4 et numérotées de **C1** à **C19**.

Tableau 4. Structure des 19 composés sélectionnés par criblage virtuel

Nom	Structure
C1	
C2	
C3	
C4	
C5	
C6	

Nom	Structure
C7	
C8	
C9	
C10	
C11	
C12	
C13	
C14	

Nom	Structure
C15	
C16	
C17	
C18	
C19	

II. Conception d'inhibiteurs de la FAAH et d'agonistes du récepteur CB₂ de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole

1. Inhibiteurs de la FAAH de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole – Série B

a. Les travaux antérieurs

La série des 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles est née de modifications structurales envisagées autour de l'OL-135, chef de file des inhibiteurs de la famille des α -cétohétero cycles. Cette famille de composés, possède les deux caractéristiques essentielles à l'inhibition de la FAAH. Tout d'abord, une fonction carbonyle permettant une liaison « covalente réversible » avec la sérine 241 puis un noyau aryle hydrophobe qui se place dans l'ABP (cf. figure 65).

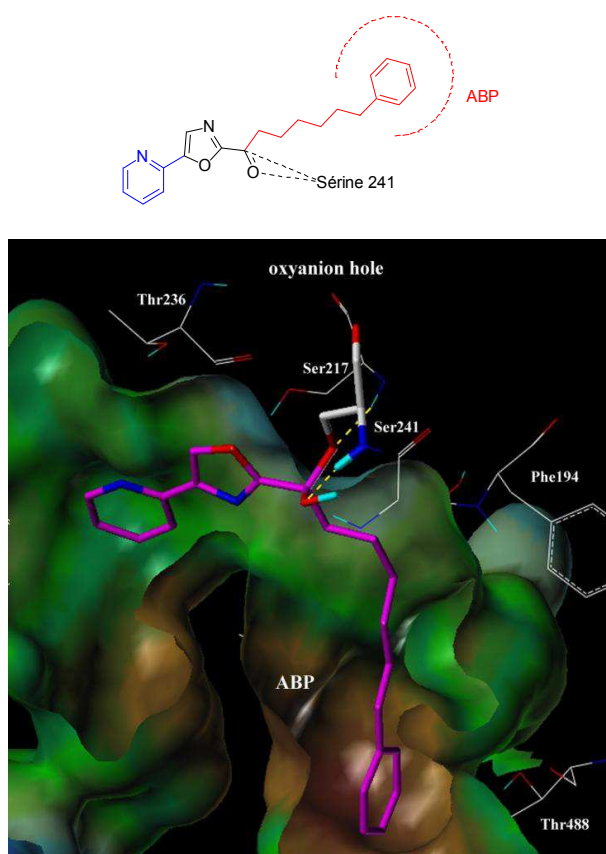


Figure 65. Structure chimique et « docking » de l'OL-135 dans le site actif de la FAAH

Dans plusieurs publications, les composés possédant un hétérocycle différent de l'oxazole classique de l'OL-135 ont montré une bonne inhibition de la FAAH, suggérant que ce dernier n'interagit pas de manière directe avec la FAAH, mais permet d'orienter correctement ses substituants dans l'enzyme.³⁹⁶ Ainsi, en conservant un hétérocycle à cinq sommets l'orientation des groupements devrait être conservée.

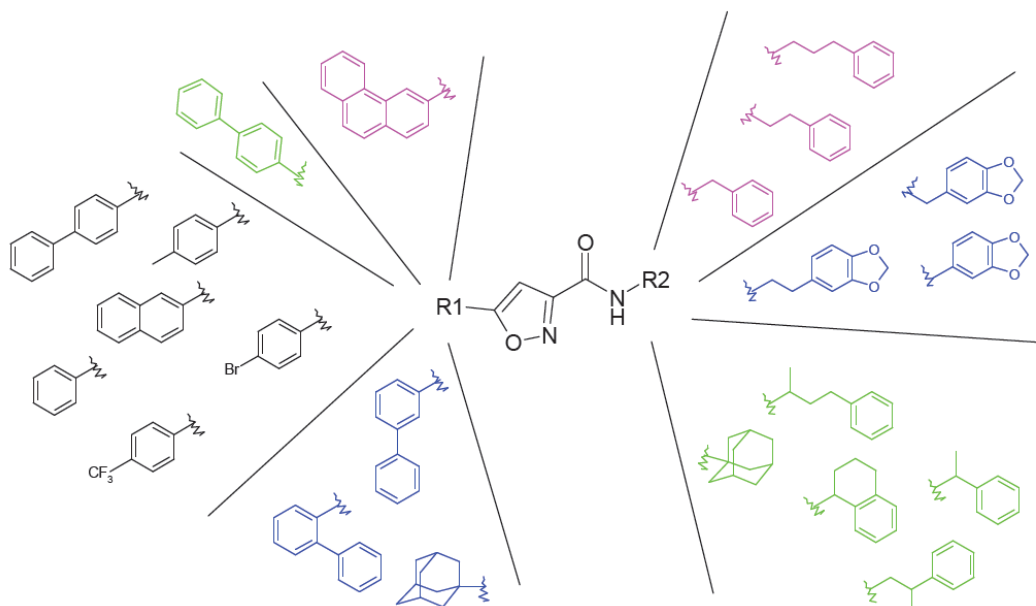


Figure 66. Série des 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles envisagés en tant qu'inhibiteurs de la FAAH

Au sein du laboratoire, plusieurs modulations ont été précédemment effectuées sur l'OL-135. Dans un premier temps, l'oxazole de l'OL-135 avait été remplacé par son isomère de position, l'isoxazole (*cf.* figure 66). De nombreux composés possédant cet hétérocycle ont également été décrits dans la littérature pour leurs effets anti-inflammatoires.³⁹⁷

Dans un second temps, la fonction cétone de l'OL-135 avait été remplacée par une fonction amide. La fonction amide, tout en conservant la géométrie spatiale du carbonyle, permet d'apporter un caractère donneur d'hydrogène supplémentaire pouvant potentiellement intégrer au niveau de la triade catalytique ou de la poche à oxanions.

³⁹⁶ Boger, D. L.; Sato, H.; Lerner, A. E.; Hedrick, M. P.; Fecik, R. A.; Miyauchi, H.; Wilkie, G. D.; Austin, B. J.; Patricelli, M. P.; Cravatt, B. F. Exceptionally potent inhibitors of fatty acid amide hydrolase: the enzyme responsible for degradation of endogenous oleamide and anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 5044 - 5049.

³⁹⁷ Talley, J. J.; Rogers, K. L.; Brown, D. L.; Nagarajan, S.; Carter, J. S.; Weier, R. M.; Stealey, M. A.; Collins, P. W.; Seibert, K.; Graneto, M. J.; Xu, X.; Partis, R. Substituted isoxazoles for the treatment of inflammation. **1996**, WO1996025405.

Ensuite, la pyridine en position C-5 avait été remplacée par différents groupements aromatiques et aliphatiques. Les groupements introduits étaient assez volumineux et avaient été choisis de manière à potentialiser les interactions hydrophobes avec le site actif de la protéine. À partir des résultats pharmacologiques, le groupe *p*-biphényle s'était révélé être le meilleur groupement pour cette position. Les isomères de position du *p*-biphényle, les groupements *o*-biphényle et *m*-biphényle, avaient également été testés. Cependant, cette modulation avait fait chuter le potentiel inhibiteur de FAAH des composés.

Enfin, le motif phénylhéxyle de l'OL-135 avait été remplacé par différents motifs : des groupements phénylalkyles, des groupements 3,4-méthylènedioxyphénylalkyles et plusieurs groupements hydrophobes encombrants.

Le laboratoire a ainsi précédemment synthétisé 41 composés finaux basés sur ce motif 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole.

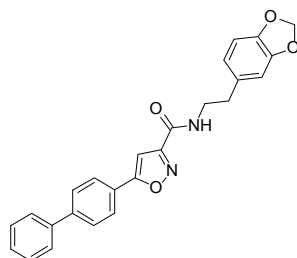


Figure 67. Structure du composé **ALIAE202**

Ces travaux antérieurs au laboratoire (thèse du Dr. Virginie Lucas) sur la série 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles ont ainsi permis la découverte du composé **ALIAE202** (cf. figure 67). Ce composé a montré une bonne inhibition de la FAAH ($CI_{50} = 27$ nM), et une forte diminution des dommages du côlon chez les souris ayant reçu ce composé en traitement préventif par voie intrapéritonéale (IP), trois jours avant l'administration du TNBS. Il a également été montré que les cytokines pro-inflammatoires habituellement sécrétées en cas de colite (TNF- α et IL-1 β) avaient retrouvé des taux endogènes quasi-normaux chez les souris ayant reçu l'**ALIAE202**.³⁹⁸

³⁹⁸ Andrzejak, V.; Muccioli, G. G.; Body-Malapel, M.; El Bakali, J.; Djouina, M.; Renault, N.; Chavatte, P.; Desreumaux, P.; Lambert, D. M.; Millet, R. New FAAH inhibitors based on 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole scaffold that protect against experimental colitis. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3777 - 3786.

Au vu de ces résultats très prometteurs, nous avons choisi de continuer les pharmacomodulations de l'**ALIAE202** afin d'améliorer d'avantage les propriétés de cette molécule « lead ».

b. Pharmacomodulations de l'ALIAE202

Dans un premier temps, afin d'observer l'influence de l'hétérocycle central sur le potentiel d'inhibition de la FAAH des molécules, nous avons envisagé de remplacer le groupement 3-carboxamido-1,2-isoxazole par différents oxazoles et oxadiazoles tout en maintenant les éléments structuraux de l'**ALIAE202** qui avaient montré la meilleure activité inhibitrice pour la FAAH (les groupements *p*-biphényle en position C-5 et 3,4-méthylènedioxyphényléthyle sur la fonction carboxamide en position C-3).

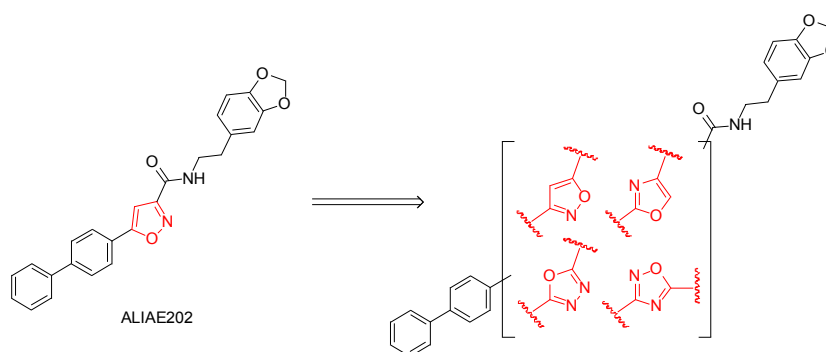


Figure 68. Pharmacomodulations de l'hétérocycle central de l'**ALIAE202**

Ainsi, nous avons imaginé de remplacer le 3-carboxamido-1,2-isoxazole par ses isostères, le 5-carboxamido-1,2-isoxazole et le 4-carboxamido-1,3-oxazole, le 2-carboxamido-1,3,4-oxadiazole et le 5-carboxamido-1,2,4-oxadiazole (cf. figure 68). Ces modulations nous permettront ainsi d'établir des relations entre l'activité inhibitrice de nos composés et la place des hétéroatomes sur le cycle mais aussi de mesurer l'influence de ces connecteurs sur l'orientation de ses substituants.

Dans un second temps, nous avons envisagé de moduler la fonction carboxamide par les fonctions amide inverse, le thioamide, carboxamide *N*-méthylé ou encore méthylamine (cf. figure 69).

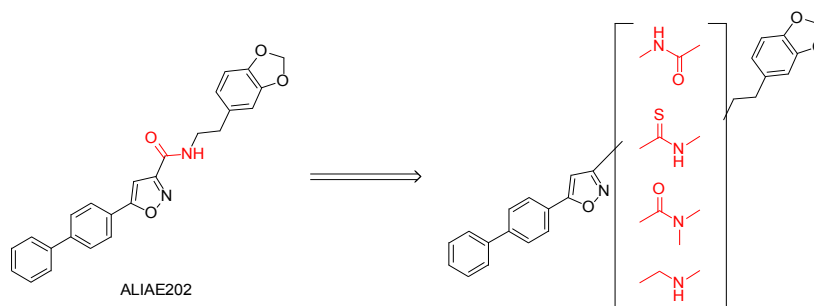
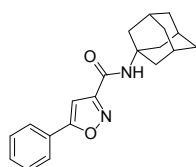


Figure 69. Pharmacomodulations de la fonction carboxamide de l'**ALIAE202**

Ces modulations de la fonction carboxamide nous permettront de vérifier ou non le rôle indispensable de cette fonction sur l'activité inhibitrice de la FAAH.

2. Agonistes sélectifs du récepteur CB₂ de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole – Série C

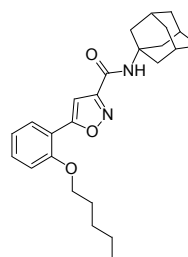
Les résultats pharmacologiques des composés 3-carboxamido-5-aryl-isoxazoles précédemment synthétisés au laboratoire ont mis en exergue deux composés, l'**ALIAE206** et l'**ALIAE218** (cf. figure 70). Ce dernier diffère uniquement par la chaîne *O*-pentyle présente sur le groupement phényle. L'**ALIAE206** a ainsi montré un caractère inhibiteur de la FAAH (CI₅₀ = 459 nM) mais pas d'activité sur le récepteur CB₂ (K_i > 3000 nM) tandis que l'**ALIAE218** n'a pas présenté d'activité inhibitrice vis-à-vis de la FAAH (CI₅₀ > 1000 nM) mais il a révélé une excellente affinité pour le récepteur CB₂ (K_i = 36 nM).



ALIAE206

*h*FAAH : CI₅₀ = 459 nM

*h*CB₂ : K_i > 3000 nM



ALIAE218

*h*FAAH : CI₅₀ > 1000 nM

*h*CB₂ : K_i = 36 nM

Figure 70. Structures chimiques des composés **ALIAE206** et **ALIAE218**

Ainsi, à partir de ces résultats, nous avons cherché à moduler les substituants R¹ et R² dans le but de concevoir de nouveaux agonistes du récepteurs CB₂ voire développer des molécules mixtes inhibitrices de la FAAH et agonistes du récepteur CB₂ (cf. figure 71).

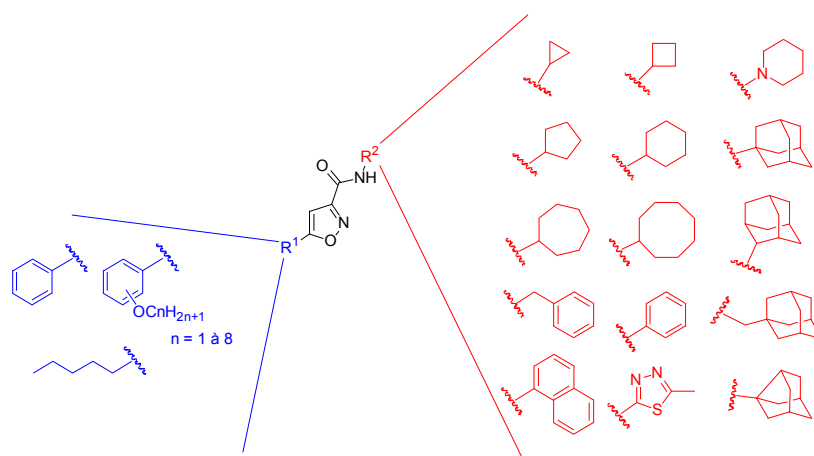


Figure 71. Série 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole en tant qu'agoniste CB₂

Pour cela, nous avons conservé les éléments pharmacophoriques précédemment identifiés comme essentiels pour l'affinité et la sélectivité envers le récepteur CB₂ à savoir une chaîne alkyle et un groupement aliphatique encombrant.³⁹⁹

Ainsi, en partant du composé **ALIAE218**, nous avons envisagé d'étudier l'influence de la position de la chaîne *O*-pentyle en synthétisant les isomères de position (*mé*ta et *para*). Puis, nous avons cherché à déterminer la longueur optimale de la chaîne alkyle sur le groupement phényle en position C-5 en synthétisant les homologues inférieurs (*O*-méthyle à *O*-butyle) et supérieurs (*O*-hexyle à *O*-octyle).

L'intérêt de la présence du noyau phényle portant le groupement *O*-pentyle a ensuite été étudié en greffant la chaîne *O*-pentyle directement sur la position C-5 de l'isoxazole.

Enfin, nous avons fait varier la nature du groupement R² par différents groupements aliphatiques et aromatiques en concordance avec les RSA précédemment établies au laboratoire.

³⁹⁹ Stern, E.; Muccioli, G. G.; Bosier, B.; Hamtiaux, L.; Millet, R.; Poupaert, J. H.; Henichart, J. P.; Depreux, P.; Goossens, J. F.; Lambert, D. M. Pharmacomodulations around the 4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamides, a class of potent CB₂-selective cannabinoid receptor ligands: consequences in receptor affinity and functionality. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5471 - 5484.

STRATÉGIE DE SYNTHÈSE

I. Stratégie de synthèse des inhibiteurs de la FAAH de type 2-benzoxazolinone – Série A

La stratégie dans cette nouvelle série d'inhibiteurs de la FAAH de type 2-benzoxazolinone a été de synthétiser un échantillonnage non exhaustif de composés répondant aux éléments pharmacophoriques décrits dans la partie conception afin de pouvoir rapidement les évaluer biologiquement et ainsi pouvoir établir des tendances pour les RSA.

1. Acylation de Friedel-Crafts de la position C-6 de la 2-benzoxazolinone : synthèse des composés **1** à **4**

a. Synthèse de la 6-benzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (**1**)

i. En présence du réactif d'Eaton

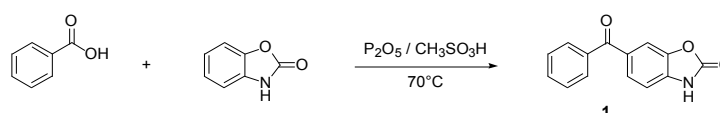


Figure 72. Acylation de la 2-benzoxazolinone par l'acide benzoïque en présence du réactif d'Eaton

Dans un premier temps, nous avons réalisé une réaction de condensation de l'acide benzoïque (1,5 équiv) en utilisant le réactif de Eaton (4 équiv), CH₃SO₃H / P₂O₅ : 1 / 10 (rapport massique). Le réactif d'Eaton est en réalité un mélange d'anhydrides méthanesulfoniques, mais d'autres espèces sont également présentes comme l'acide polyphosphorique (PPA) ou des anhydrides mixtes de PPA et d'acide méthanesulfonique.⁴⁰⁰ Le réactif d'Eaton est une source d'acide très fort que l'on assimile à un donneur de proton.

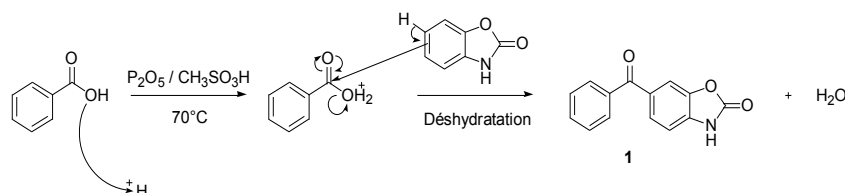


Figure 73. Mécanisme de l'acylation de la 2-benzoxazolinone en présence du réactif d'Eaton

⁴⁰⁰ Zhao, D.; Hughes, D. L.; Bender, D. R.; DeMarco, A. M.; Reider, P. J. Regioselective Fischer Indole Route to 3-Unsubstituted Indoles. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3001 - 3006

Le rendement de cette réaction est de 29 % (70°C, 5 heures).

ii. En présence de l'acide polyphosphorique

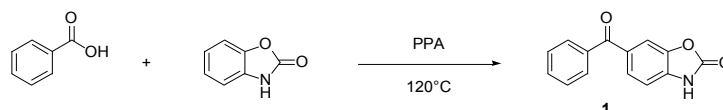


Figure 74. Acylation de la 2-benzoxazolinone par l'acide benzoïque en présence de l'acide polyphosphorique

Dans un second temps, la synthèse de la 6-benzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (**1**) a été réalisée avec le PPA seul, servant à la fois de réactif et de solvant. Cette méthode, bien connue au laboratoire,⁴⁰¹ a pour avantage par rapport à l'utilisation du réactif d'Eaton, un traitement très simple : précipitation dans l'eau glacée suivi de lavages successifs à l'eau jusqu'à la neutralité du filtrat. L'inconvénient étant la difficulté à manipuler le PPA qui est très visqueux.

Compte-tenu du rendement de 85 % (120°C, 4 heures) avec le PPA, cette méthode a été privilégiée pour la synthèse de la 6-benzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one.

b. Synthèse du 6-[(E)-3-phényl-2-propenoyl]-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (**2**)

i. En présence du réactif d'Eaton

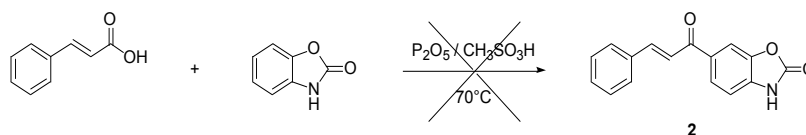


Figure 75. Acylation de la 2-benzoxazolinone par l'acide *trans*-cinnamique en présence du réactif d'Eaton

⁴⁰¹ Renard, P.; Lesieur, D.; Lespagnol, C. Acyl-6-benzoxazolinones et acides (acyl-6-oxo-2-benzoxazolinyl-3)-alcanoïques. *Eur. J. Med. Chem.* **1980**, *15*, 453 - 456.

En parallèle de la synthèse du composé **1**, la condensation de la 2-benzoxazolinone sur l'acide *trans*-cinnamique (1,5 équiv) a été envisagée premièrement avec le réactif d'Eaton (4 équiv). Cependant, le produit final n'a jamais pu être isolé par cette méthode (70°C, 5 heures).

ii. En présence de l'acide polyphosphorique

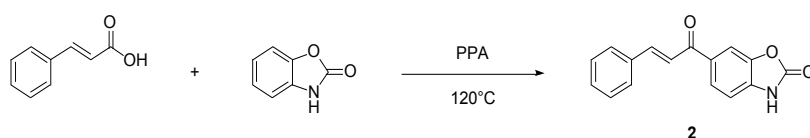


Figure 76. Acylation de la 2-benzoxazolinone par l'acide *trans*-cinnamique en présence de l'acide polyphosphorique

Etant donné le bon rendement de l'acylation de la 2-benzoxazolinone par l'acide benzoïque, la condensation a été réalisée, dans un second temps, avec le PPA seul. Ainsi, selon le même mode opératoire que pour le composé **1**, le composé **2** a été obtenu avec un rendement de 75 % (120°C, 4 heures).

c. Synthèse du 6-(3,4,5-trifluorobenzoyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (**3**)

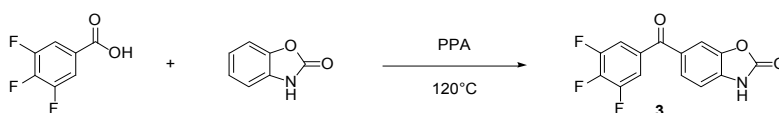


Figure 77. Acylation de la 2-benzoxazolinone par l'acide 3,4,5-trifluorobenzoïque en présence de l'acide polyphosphorique

L'acylation de la 2-benzoxazolinone par l'acide 3,4,5-trifluorobenzoïque (2 équiv) a été effectuée par la méthode utilisant le PPA seul. Le rendement de la réaction est de 5 % (120°C, 6 heures).

Ce faible rendement pourrait s'expliquer par le fait que l'acide 3,4,5-trifluorobenzoïque est bien plus fort que l'acide benzoïque, aussi les conditions sont probablement beaucoup trop dures pour la formation du composé **3**.

d. Synthèse de la 6-(4-trifluorométhylbenzoyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (**4**)

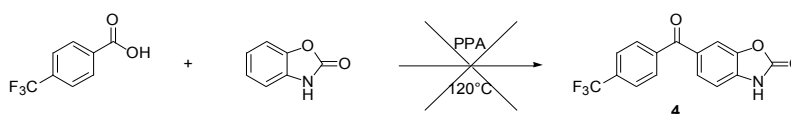


Figure 78. Acylation non réussie de la 2-benzoxazinone par l'acide 4-trifluorométhylbenzoïque en présence de l'acide polyphosphorique

La 6-(4-trifluorométhylbenzoyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one n'a pas pu être obtenue à partir de l'acide 4-trifluorométhylbenzoïque (1,5 équiv) et de la 2-benzoxazinone en présence de PPA (140°C, 5 heures). Une réaction de Friedel-Crafts avec le chlorure d'aluminium pourrait être une alternative pour la synthèse du composé **4**.

2. Modulations du carbonyle en position C-6 du composé 6-benzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one : synthèse des composés **5** à **7**

a. Synthèse de la 6-benzyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (**5**)

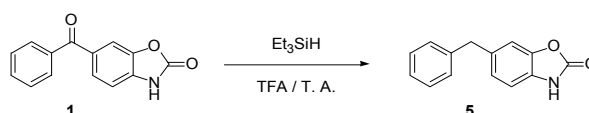


Figure 79. Synthèse du composé **5** par réduction du carbonyle en position C-6 du composé 6-benzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one

La 6-benzyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (**5**) a été synthétisée par réduction totale du groupement carbonyle en position C-6 du composé **1**. La réduction totale a été réalisée en présence de triéthylsilane (Et_3SiH , 2,2 équiv) dans l'acide trifluoroacétique (TFA). Nous obtenons un rendement de 67 % (T. A., 49 heures).

b. Synthèse de la 6-(hydroxyiminobenzyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (**6**)

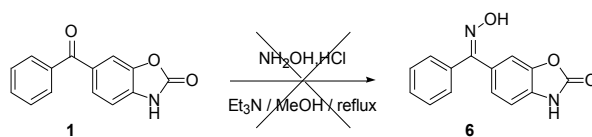


Figure 80. Synthèse du composé **6** par oximation du carbonyle en position C-6 du composé 6-benzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one

Le composé 6-(hydroxyiminobenzyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (**6**), envisagé par oximation du composé **1** en présence de chlorure d'hydroxylamine (2 équiv) dans le méthanol, n'a pas pu être isolé (reflux, 4 heures). Le chlorhydrate d'hydroxylamine avait préalablement été mis sous sa forme basique par la triéthylamine.

c. Synthèse de la 6-thiobenzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (**7**)

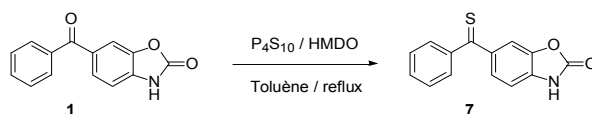


Figure 81. Synthèse du composé **7** par thionation du carbonyle en position C-6 du composé 6-benzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one

La 6-thiobenzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (**7**) est obtenue par thionation du composé **1**. Cette réaction s'effectue dans le toluène en présence de pentasulfure de diphosphore (0,3 équiv) et d'hexaméthylsiloxane (HMDO, 2,5 équiv).⁴⁰² Le rendement est de 90 % (reflux, 2 heures).

⁴⁰² Curphey, T. J. Thionation with the reagent combination of phosphorus pentasulfide and hexamethyldisiloxane. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6461 - 6473.

3. Substitution nucléophile de type 2 : synthèse des composés **8** à **21**

a. Synthèse des 6-benzoyl-3-alkyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-ones
(**8 - 15**)

Le 6-benzoyl-3-méthyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (composé **8**) a été obtenu par méthylation de son atome d'azote. Cette réaction s'est effectuée dans l'acétone en présence de sulfate de diméthyle (2,5 équiv) et de carbonate de potassium (4 équiv) pendant 6 heures à reflux.

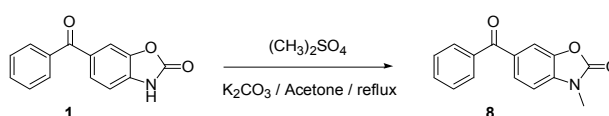


Figure 82. Synthèse du composé **8**

Contrairement au composé **8**, la synthèse des composés **9** à **15** s'est effectuée par réaction de l'anion de la benzoxazolinone du composé **1** avec les différents dérivés bromés (1,5 équiv) en présence de carbonate de potassium (1,5 équiv) dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF) à 80°C pendant 6 heures.

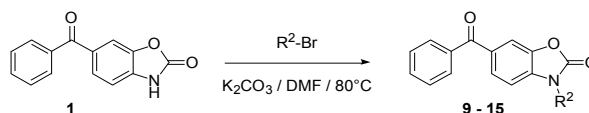


Figure 83. Synthèse des composés **9** à **15**

La structure des substituants R² et les rendements des 8 composés de type 6-benzoyl-3-alkyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-ones synthétisés sont regroupés dans le tableau 5.

b. Synthèse des 3-phenalkyl-6-[(*E*)-3-phényl-2-propenoyl]-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-ones (**16 - 20**)

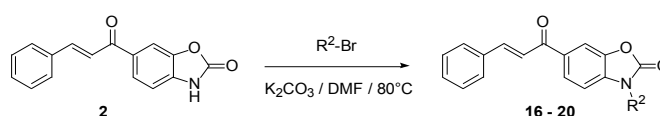


Figure 84. Synthèse des composés **16** à **20**

De la même manière que pour la synthèse des composés **9** à **15**, les composés **16** à **20** ont été obtenus par la réaction de différents dérivés bromés (1,5 équiv) avec le composé **2** en présence de carbonate de potassium (1,5 équiv) dans le DMF à 80°C pendant 6 heures. Les rendements des cinq composés de type 3-phenalkyl-6-[(E)-3-phényl-2-propenoyl]-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one synthétisés sont répertoriés dans le tableau 5.

c. Synthèse de la 3-(5-phénylpentyl)-6-(3,4,5-trifluorobenzoyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (**21**)

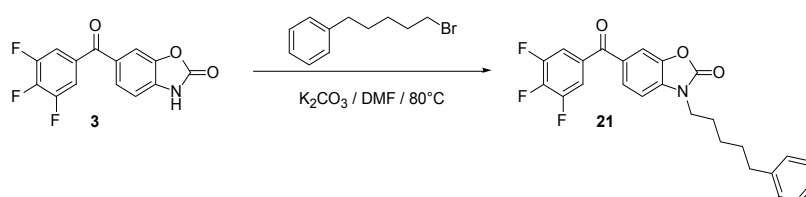
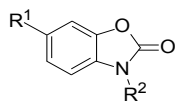


Figure 85. Substitution nucléophile avec le 6-(3,4,5-trifluorobenzoyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one et le 1-bromo-5-phénylpentane

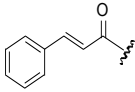
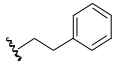
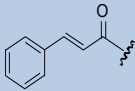
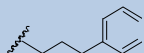
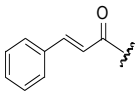
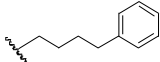
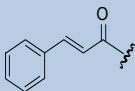
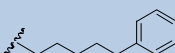
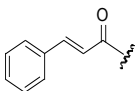
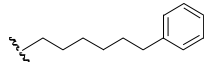
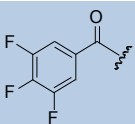
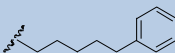
Enfin, le 1-bromo-5-phénylpentane (1,5 équiv) de la même manière que précédemment en présence de carbonate de potassium (1,5 équiv) permet de former le composé **21** avec un rendement de 74 % (80°C, 8 heures).

Au total, 17 composés finaux de type 2-benzoxazolinone ont été synthétisés.

Tableau 5. Structures et rendements des composés finaux de la série A des composés de type 2-benzoxazolinones



Nom	R ¹	R ²	Rendement (%)
1		H	95
2		H	75
3		H	5
5		H	67
7		H	90
8			72
9			99
10			81
11			90
12			63
13			90
14			97
15			83

Nom	R ₁	R ₂	Rendement (%)
16			32
17			44
18			69
19			71
20			51
21			74

II. Stratégie de synthèse des inhibiteurs de la FAAH de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole– Série B

1. Synthèse du *N*3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-*N*3-méthyl-5-(4-biphényl)-3-isoxazolecarboxamide (**22**)

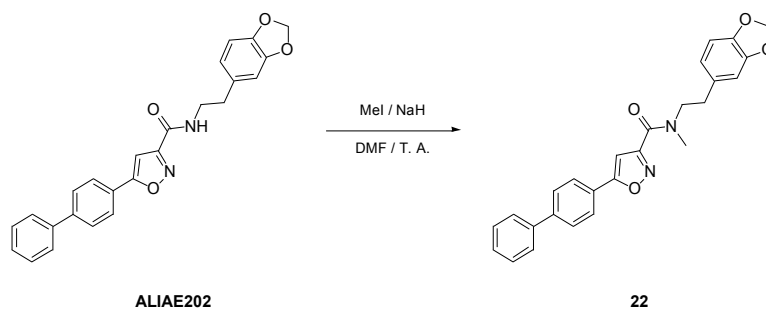


Figure 86. Synthèse du composé **22** par *N*-méthylation du composé **ALIAE202**

Une réaction de *N*-méthylation de la fonction amide de l'**ALIAE202** a été effectuée dans le DMF en présence d'iodure de méthyle (2,5 équiv) et d'hydrure de sodium (2,5 équiv). Le rendement de la méthylation est de 52 % (T. A., 5 heures).

2. Synthèse de la N3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-3-isoxazoleméthylamine (**23**)

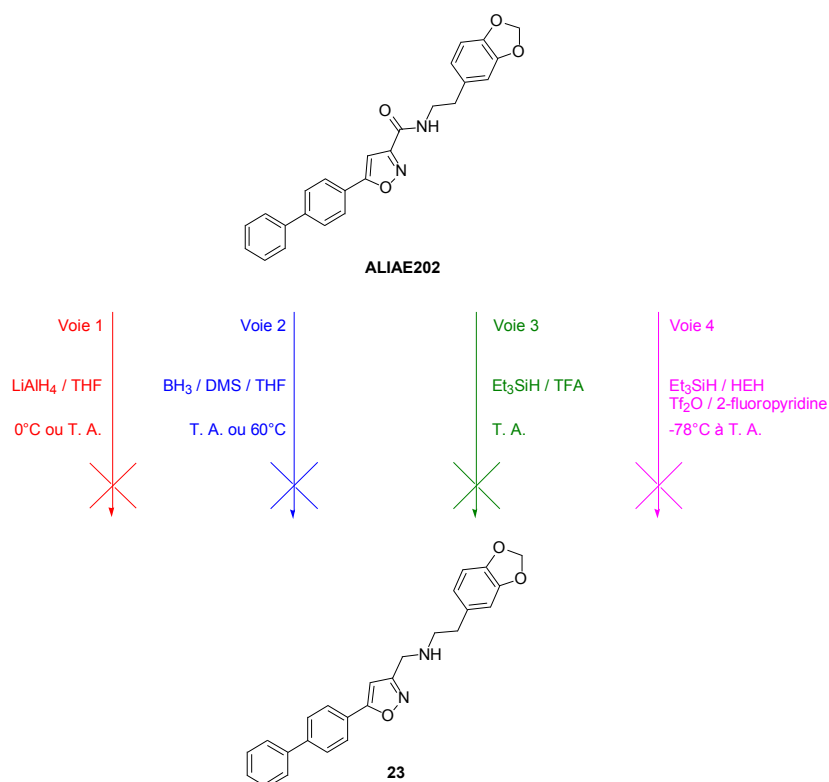


Figure 87. Voies de synthèse envisagées pour la réduction de la fonction amide du composé **ALIAE202**

La réaction de réduction de la fonction amide de l'**ALIAE202** n'a pas pu être réalisée en une étape bien que quatre voies de synthèse différentes de la N3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-3-isoxazoleméthylamine aient été essayées.

a. Réduction de l'amide : voie de synthèse n°1

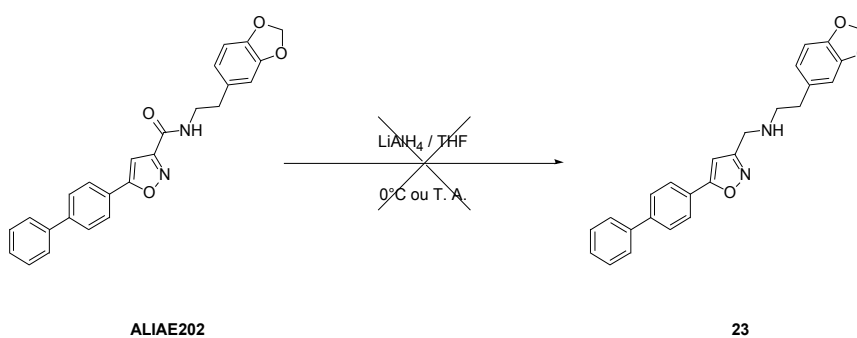


Figure 88. Réduction du composé **ALIAE202** par le tétrahydrualuminate de lithium

La première voie de synthèse envisagée pour obtenir le composé **23** fut la méthode classique de réduction des amides par le tétrahydroaluminat de lithium (LiAlH_4 , 2,5 équiv). Cependant, après 2h30 de réaction dans le tétrahydrofurane (THF) à 0°C , la fonction amide du composé **ALIAE202** n'a pas été réduite.

La même réaction en utilisant 6 équivalents de LiAlH_4 à température ambiante n'a pas fonctionné non plus. L'**ALIAE202** de départ a été récupéré.

b. Réduction de l'amide : voie de synthèse n°2

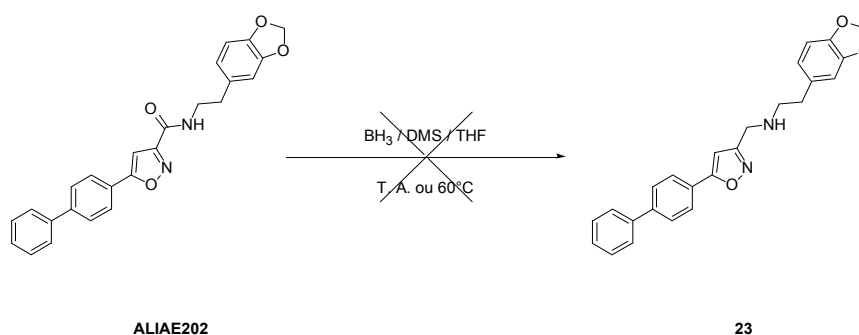
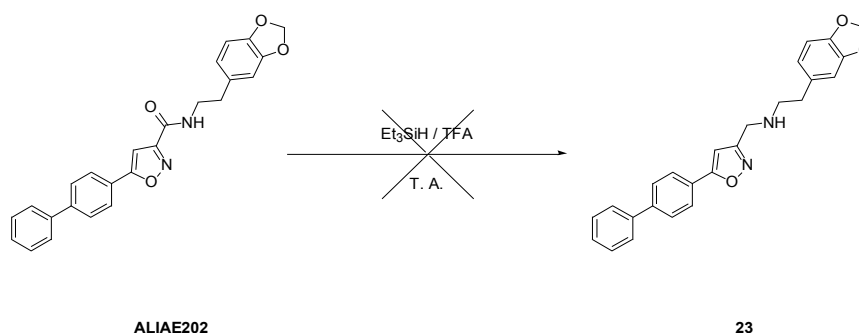


Figure 89. Réduction du composé **ALIAE202** par le complexe borane / diméthylsulfure

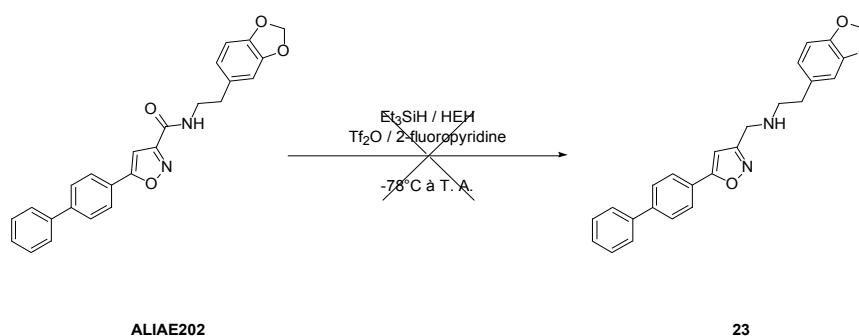
La deuxième voie de synthèse envisagée a consisté en une réduction de la fonction amide de l'**ALIAE202** par le mélange borane (BH_3) / diméthylsulfure (DMS) 2 M (3 équiv) dans le THF. La réaction a été effectuée une première fois sous azote à température ambiante pendant une nuit et une seconde fois sous azote à 60°C pendant une nuit. Dans les deux cas, la réduction n'a pas fonctionné.

c. Réduction de l'amide : voie de synthèse n°3

Figure 90. Réduction du composé **ALIAE202** par le triéthylsilane

Pour la troisième voie de synthèse du composé **23**, le triéthylsilane (Et₃SiH, 2,5 équiv), dans l'acide trifluoroacétique, a été utilisé comme agent réducteur. La réaction a été effectuée à température ambiante durant 48 heures. L'**ALIAE202** n'a pas réagi et a été partiellement récupéré.

d. Réduction de l'amide : voie de synthèse n°4

Figure 91. Réduction du composé **ALIAE202** par la méthode de Pelletier *et al.*⁴⁰³

La quatrième et dernière voie de synthèse de la N3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-3-isoxazoléméthylamine (composé **23**) envisagée a consisté à réduire la fonction amide par la méthode de Pelletier *et al.*⁴⁰³

⁴⁰³ Pelletier, G.; Bechara, W. S.; Charette, A. B. Controlled and chemoselective reduction of secondary amides. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12817 - 12819.

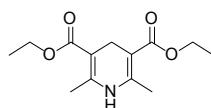


Figure 92. Structure chimique de l'ester de Hantzsch

Ce protocole consiste tout d'abord en l'activation chimiosélective de l'amide par l'anhydride triflique (Tf_2O , 1,05 équiv) en présence d'une base faible et non-nucleophile, la 2-fluoropyridine (1,1 équiv). En effet, plus le milieu est acide, plus les donneurs d'hydrures agissent fort, aussi la 2-fluoropyridine est ajouté pour diminuer la réactivité. Ensuite, les agents de réduction, Et_3SiH (1,1 équiv) et l'ester de Hantzsch (HEH, 1,4 équiv), sont ajoutés successivement à la réaction, le HEH, donneur d'hydrure plus fort que Et_3SiH , permettant un meilleur rendement de la réduction qu'avec l' Et_3SiH seul.

Le mécanisme envisagé de cette réaction est le suivant :

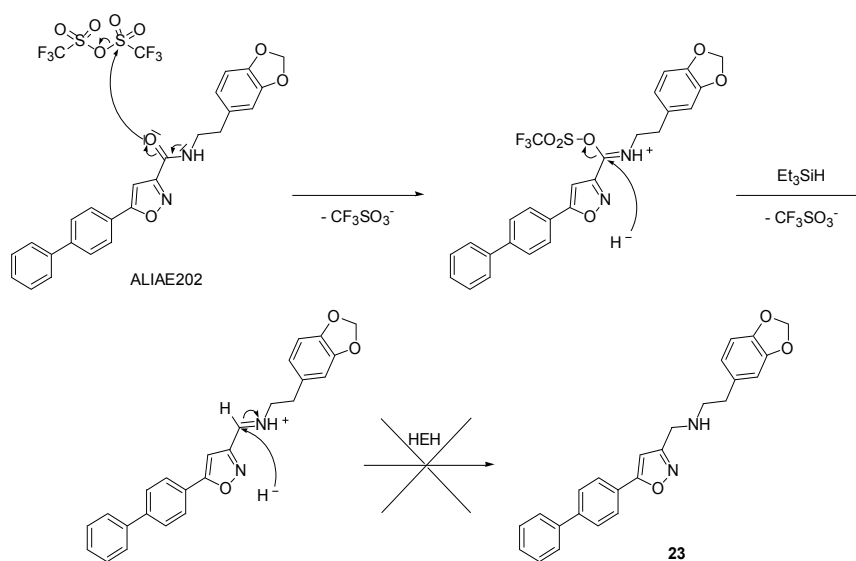


Figure 93. Mécanisme réactionnel proposé de la synthèse du composé **23**

Après 18 heures de réaction, de -78°C à température ambiante, le composé **23** n'a pas été obtenu. L'analyse LCMS du milieu révèle la présence de l'**ALIAE202** de départ et de composés secondaires non identifiés mais pas le composé **23** attendu.

3. Synthèse du N3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-3-isoxazolecarbothioamide (**24**)

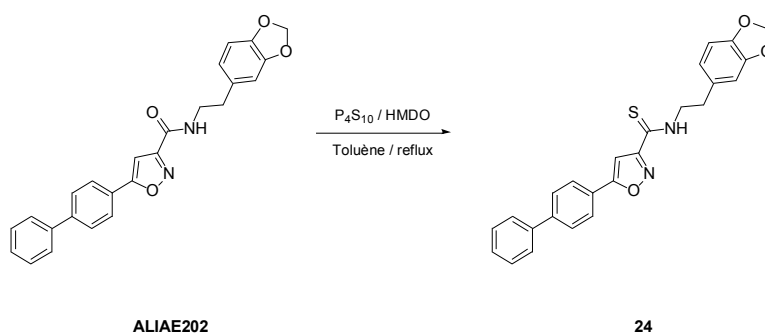


Figure 94. Synthèse du composé **24** par thionation du carbonyle du composé **ALIAE202**

Cette réaction de thionation de l'amide a été effectuée dans le toluène à partir de l'**ALIAE202** en présence de P_4S_{10} (3 équiv) et d'HMDO (2,5 équiv). Le rendement de cette réaction est de 26 % (reflux, 2 heures). Ce faible rendement peut s'expliquer par une faible solubilité du P_4S_{10} dans le toluène, cette réaction s'effectuant le plus souvent dans le benzène.⁴⁰²

4. Synthèse de la *N*3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-*N*'3-hydroxy-3-isoxazolecarboximidamide (**25**)

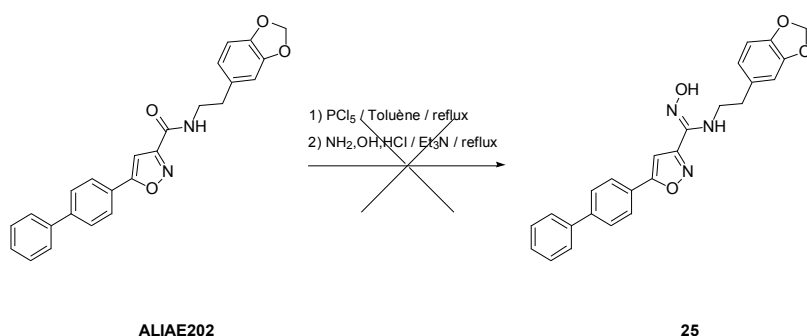


Figure 95. Synthèse du composé **25** par oximation du carbonyle du composé **ALIAE202**

La synthèse de la *N*3-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-*N*'3-hydroxy-3-isoxazolecarboximidamide (**25**) a été envisagée par oximation de la fonction amide de l'**ALIAE202**. Pour cela, l'**ALIAE202** a, tout d'abord, été mis en réaction avec le pentachlorure de phosphore (1,5 équiv) dans le toluène. Puis, dans un second temps, l'hydroxylamine (9 équiv), sous sa forme base, a été ajoutée afin de former l'oxime.⁴⁰⁴

Le mécanisme envisagé de cette réaction est le suivant :

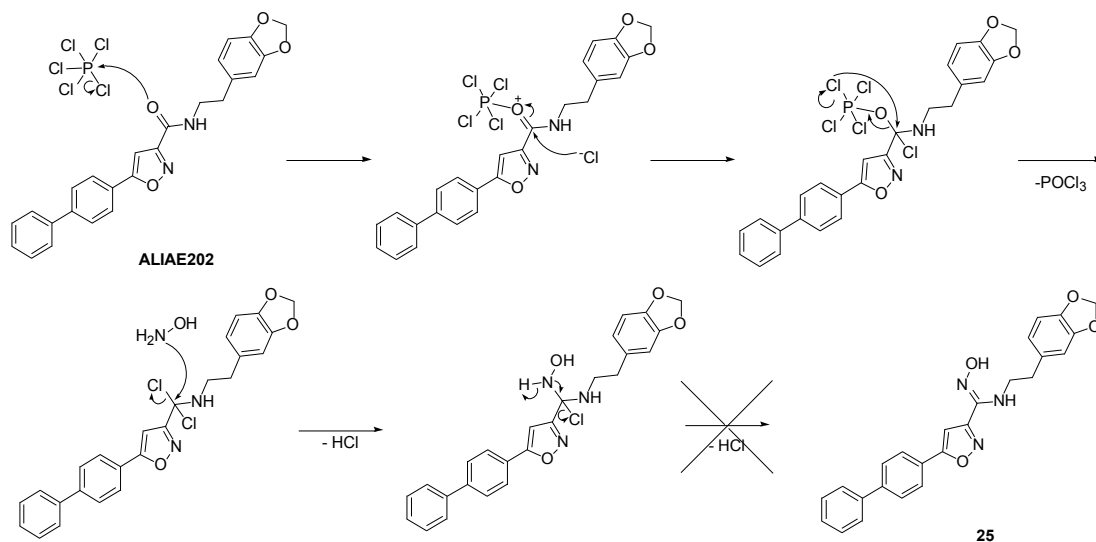


Figure 96. Mécanisme réactionnel proposé pour la synthèse du composé **25** : réaction d'oximation du carbonyle du composé **ALIAE202**

⁴⁰⁴ Romine, J. L.; Martin, S. W.; Gribkoff, V. K.; Boissard, C. G.; Dworetzky, S. I.; Natale, J.; Li, Y.; Gao, Q.; Meanwell, N. A.; Starrett, J. E. 4,5-Diphenyltriazol-3-ones: Openers of Large-Conductance Ca²⁺-Activated Potassium (Maxi-K) Channels. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2942 - 2952.

Cependant, la réaction n'étant pas totale et de nombreux produits secondaires s'étant formés, le composé **25** désiré n'a pas pu être isolé.

5. Synthèse du *N1-(5-(4-biphényl)-3-isoxazolyl)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)propanamide (27)*

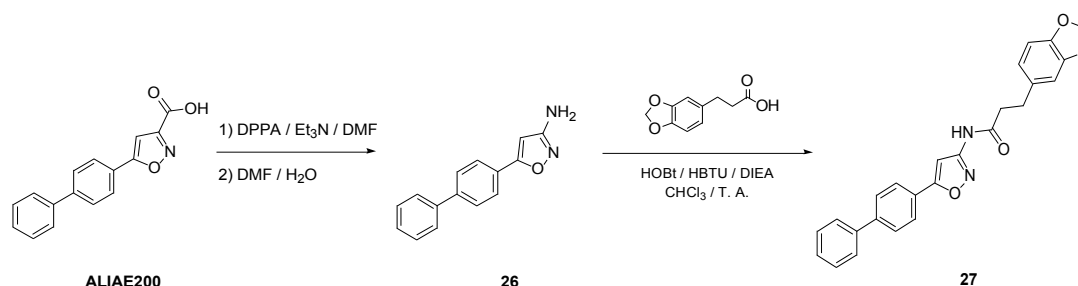


Figure 97. Schéma général de la synthèse du composé **27**

La synthèse du *N1-(5-(4-biphényl)-3-isoxazolyl)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)propanamide (27)* a été effectuée en 2 étapes. Tout d'abord, la fonction acide carboxylique de l'acide 5-(4-biphényl)-isoxazole-3-carboxylique (**ALIAE200**), précédemment synthétisé au laboratoire, subit un réarrangement de Curtius pour former la 5-(4-biphényl)-3-isoxazolyl-amine (composé **26**). L'amine obtenue subit ensuite un couplage de type peptidique avec l'acide 3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-propionique pour former le *N1-(5-(4-biphényl)-3-isoxazolyl)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)propanamide* (composé **27**), rétro-amide de l'**ALIAE202**.

a. Réarrangement de Curtius : synthèse du composé **26**

Le réarrangement de Curtius est une réaction de réarrangement d'un azoture d'acyle en isocyanate.⁴⁰⁵ Ici, l'azide de diphenylphosphoryle (DPPA) réagit avec l'acide carboxylique pour former l'azoture d'acyle correspondant qui se réarrange ensuite en isocyanate.

⁴⁰⁵ Curtius, T. Hydrazide und azide organischer säuren I. abhandlung. *J. Prakt. Chem.* **1894**, 50, 275 - 294.

Le mécanisme de cette réaction est le suivant :

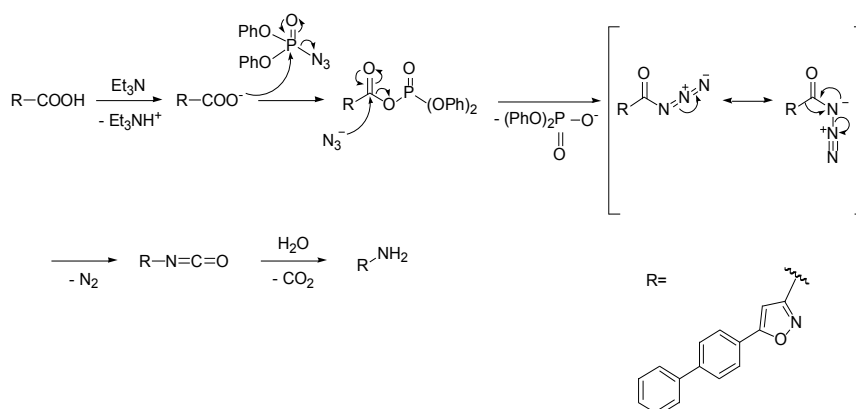


Figure 98. Mécanisme réactionnel du réarrangement de Curtius de l'ALIAE200

Ainsi, la 5-(4-biphényl)-3-isoxazolyl-amine est synthétisée à partir de l'ALIAE200 en présence de DPPA (1,5 équiv) et de triéthylamine (1,5 équiv) dans le DMF sous atmosphère inerte à température ambiante pendant 3 heures. Ensuite, de l'eau a été ajoutée à la solution afin de former un mélange DMF/eau : 8/2 (rapport volumique). L'eau hydrolyse alors la fonction isocyanate et libère la 5-(4-biphényl)-3-isoxazolyl-amine (**26**) ainsi formée. Le rendement de ces deux étapes est de 55 %.

Ce même réarrangement a été effectué avec le *tert*-butanol (*tert*-BuOH) à la place du DMF et le *tert*-butanolate de potassium (*tert*-BuOK) à la place de la triéthylamine. La réaction a été faite à reflux sous atmosphère inerte durant 16 heures. Cette variante permet l'obtention de l'amine **26** protégée par une fonction carbamate. L'amine a ensuite été déprotégée en milieu acide. Le rendement de cette synthèse alternative est de 20 %.

b. Couplage de type peptidique : synthèse du composé 27

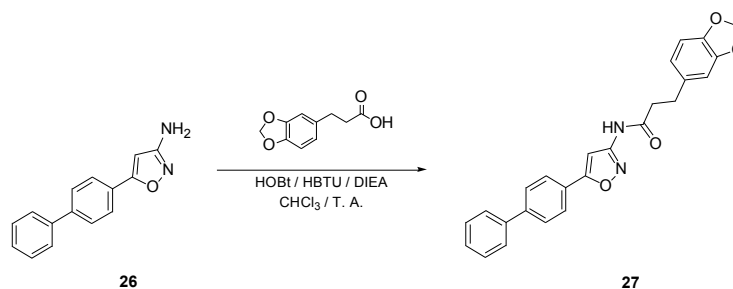


Figure 99. Synthèse du composé **27** par couplage de type peptidique de l'acide 3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-propionique avec le composé **26**

Le couplage de type peptique entre la 5-(4-biphényl)-3-isoxazolyl-amine (**26**, 1,2 équiv) et l'acide 3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-propionique commercial en présence des agents de couplage hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (HBTU, 1,5 équiv) et hydroxybenzotriazole (HOBT, 0,5 équiv), et en présence de diisopropyléthylamine (DIEA, 4,5 équiv) a permis d'obtenir le composé **27** désiré avec un rendement de 0,5 % (T. A., 24 heures).

Ce faible rendement peut notamment s'expliquer par l'amine aromatique **26** utilisée. Celle-ci n'est que très faiblement réactive ce qui défavorise le couplage.

Le mécanisme de la réaction est le suivant :

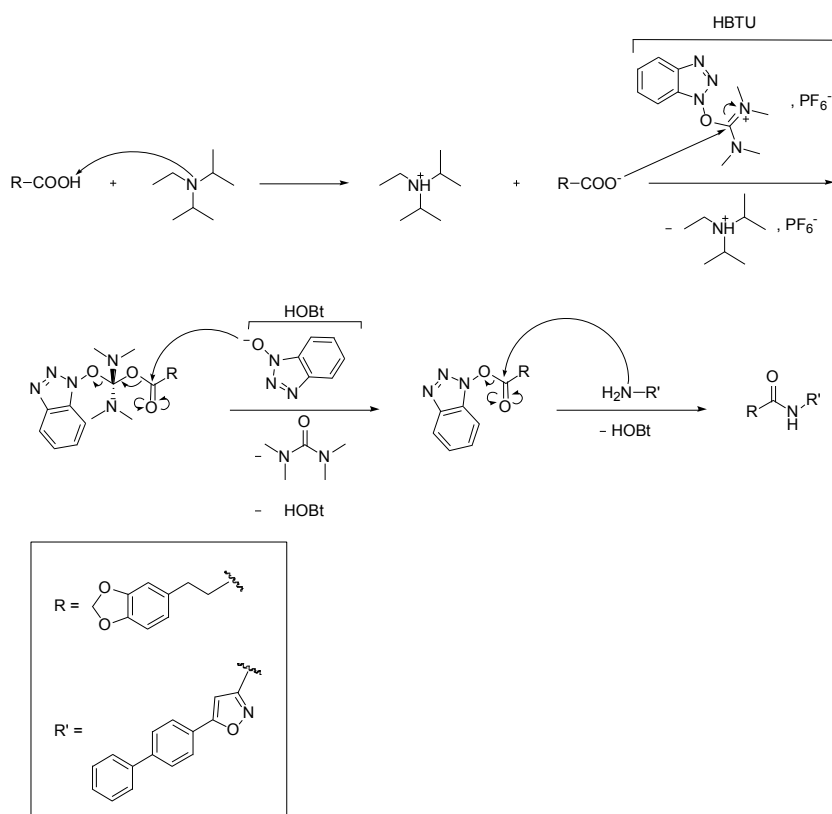


Figure 100. Mécanisme réactionnel du couplage de type peptique entre l'acide commercial et l'amine **26**

Dans ce mécanisme, l'agent de couplage HBTU joue le rôle d'activateur de l'acide en générant un ester activé, susceptible de réagir avec l'HOBT. Un autre ester activé possédant un excellent groupement partant, l'HOBT, est alors formé puis couplé avec les amines désirées.

Cette ultime étape permet de régénérer l'HOBt qui peut ainsi être introduit en quantité catalytique.

6. Synthèse du *N*5-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-3-(4-biphényl)-5-isoxazolecarboxamide (**31**)

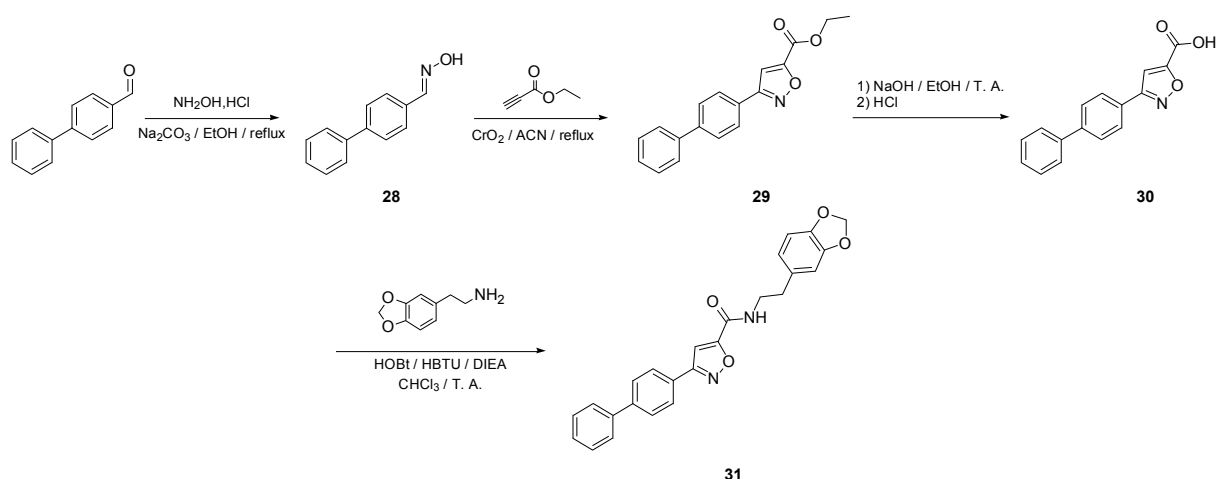


Figure 101. Schéma général de la synthèse du composé **31**

Le *N*5-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-3-(4-biphényl)-5-isoxazolecarboxamide (composé **31**) est obtenu en 4 étapes. Tout d'abord, la 4-biphénylcarboxime (composé **28**) est formée à partir du 4-biphénylcarboxaldéhyde commercial et du chlorhydrate d'hydroxylamine. Ensuite, l'oxime est cyclisée en 1,2-isoxazole avec le propionate d'éthyle en présence de dioxyde de chrome (composé **29**). Enfin, la fonction ester est saponifiée en acide carboxylique (composé **30**) pour ensuite être amidifié par couplage de type peptidique avec la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine (composé **31**).

a. Oximation : synthèse du composé **28**

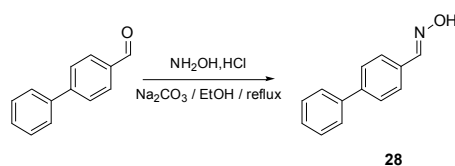


Figure 102. Synthèse du composé **28** par oximation du 4-biphénylcarboxaldéhyde

La première étape de la synthèse du composé **31** consiste en la formation de la 4-biphénylcarboxime à partir du 4-biphénylcarboxaldéhyde commercial et du chlorhydrate d'hydroxylamine (2,3 équiv) en présence de carbonate de sodium (1,3 équiv) dans l'éthanol. Le rendement est quantitatif (reflux, 18 heures).

b. Cyclisation : synthèse du composé 29

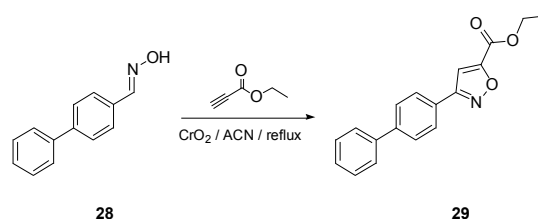


Figure 103. Synthèse du composé **29** par cyclisation du composé **28** en 1,2-isoxazole-5-carboxylate d'éthyle

Le composé **29** est obtenu par cyclisation de la 4-biphényl-carboxime à l'aide de propiolate d'éthyle (3 équiv) et de dioxyde de chrome (10 équiv) dans l'acétonitrile.^{406,407} Le dioxyde de chrome permet d'oxyder l'oxime en oxyde de nitrile. Puis, l'oxyde de nitrile est cyclisé en isoxazole selon un probable mécanisme d'interaction orbitalaire comme décrit par Kissane *et al.*⁴⁰⁸ Le rendement de cette étape est de 40 % (reflux, 2 heures).

Le mécanisme de cette cyclisation est proposé dans le schéma ci-dessous :

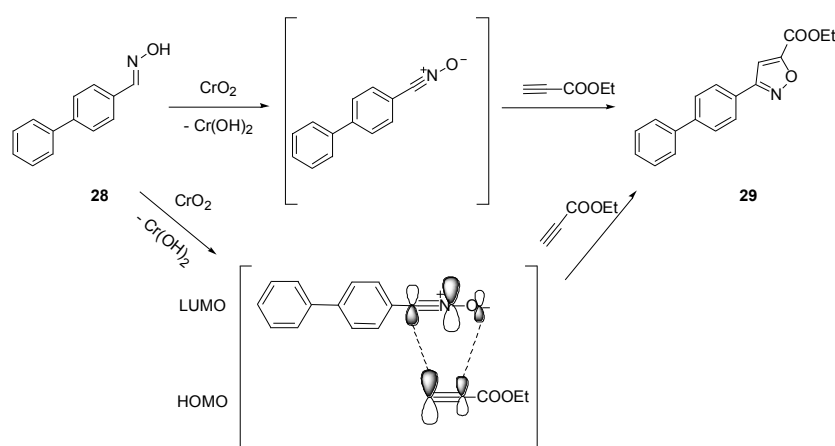


Figure 104. Mécanisme réactionnel de cyclisation du composé **28** en 1,2-isoxazole-5-carboxylate d'éthyle

⁴⁰⁶ Wang, Y. G.; Xu, W. M.; Huang, X. An Efficient Solid-Phase Synthesis of Substituted Isoxazole, Triazole, and Cycloalkadiene Derivatives Using Supported Selenium Resin. *Synthesis* **2007**, *1*, 28 - 32.

⁴⁰⁷ Bhosalea, S.; Kurhadea, S.; Prasadb, U. V.; Pallea, V. P.; Bhuniya, D. Efficient synthesis of isoxazoles and isoxazolines from aldoximes using Magtrieve™ (CrO2). *Tetrahedron lett.* **2009**, *50*, 3948 - 3951.

⁴⁰⁸ Kissane, M.; Maguire, A. R. Asymmetric 1,3-dipolar cycloadditions of acrylamides. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 845 - 883.

c. Saponification : synthèse du composé 30

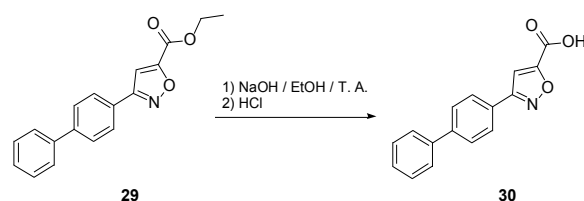


Figure 105. Synthèse du composé **30** par saponification de la fonction ester du composé **29**

La saponification de la fonction ester du composé **29** a été réalisée à température ambiante en présence d'un excès de soude (10 équiv) et a permis d'obtenir l'acide carboxylique **30** avec un rendement de 76 % (T. A. 24 heures).

d. Couplage de type peptidique : synthèse du composé 31

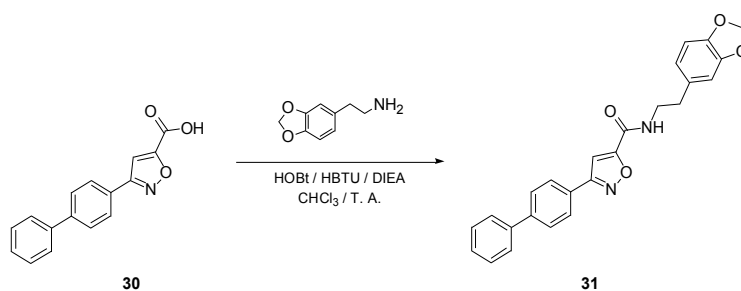


Figure 106. Synthèse du composé **31** par couplage de type peptidique du composé **30** avec la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine

L'étape finale est une réaction d'amidification de l'acide **30** par la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine (1,2 équiv) en présence des agents de couplage HBTU (1,5 équiv) et HOBt (0,5 équiv) et en présence de DIEA (4,5 équiv). Le composé **31** a été obtenu avec un rendement de 79 % (T. A., 24 heures).

7. Synthèse du *N*4-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-2-(4-biphényl)-1,3-oxazole-4-carboxamide (**34**)

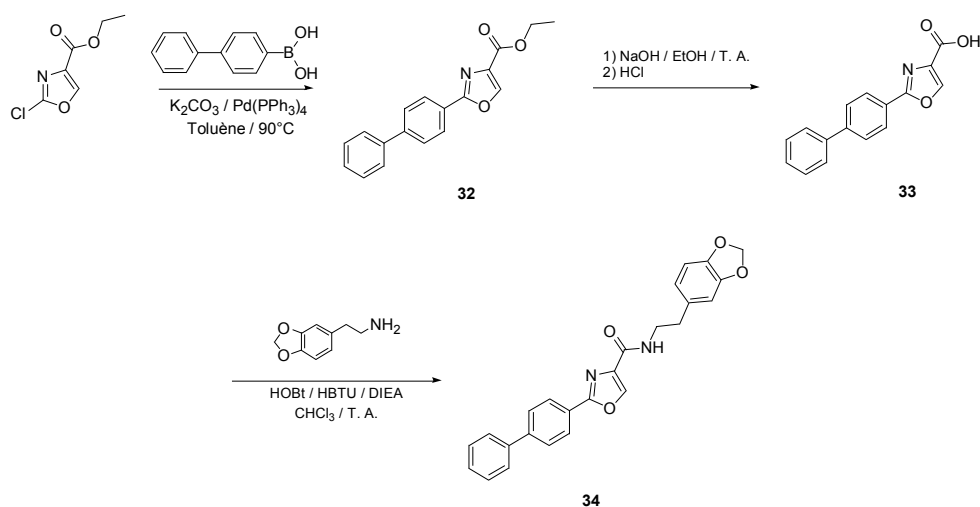


Figure 107. Schéma général de la synthèse du composé **34**

Le *N*4-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-2-(4-biphényl)-1,3-oxazole-4-carboxamide (composé **34**) a été obtenu en 3 étapes. Tout d'abord, l'ester carboxylique **32** a été synthétisé par couplage de Suzuki de l'acide 4-biphénylboronique commercial avec le 2-chloro-1,3-oxazole-4-carboxylate d'éthyle commercial. Ensuite, l'ester **32** est saponifié pour donner l'acide carboxylique **33**. Enfin, le composé **33** est amidifié sous conditions de couplage de type peptidique avec la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine (composé **34**).

a. Couplage de Suzuki : synthèse du composé **32**

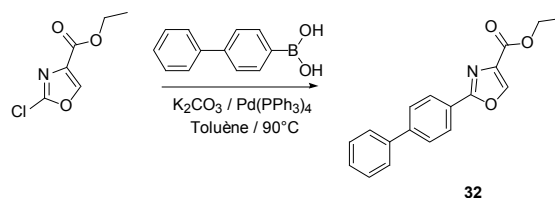


Figure 108. Synthèse du composé **32** par couplage de Suzuki entre le 2-chloro-1,3-oxazole-4-carboxylate d'éthyle et l'acide 4-biphénylboronique

En 1979, Suzuki décrit pour la première fois le couplage d'un aryle halogéné et d'un acide arylboronique en présence d'un catalyseur au palladium (0) et d'une base, permettant la formation d'une liaison carbone-carbone.⁴⁰⁹

Le mécanisme de ce couplage est un cycle catalytique comprenant 3 étapes :

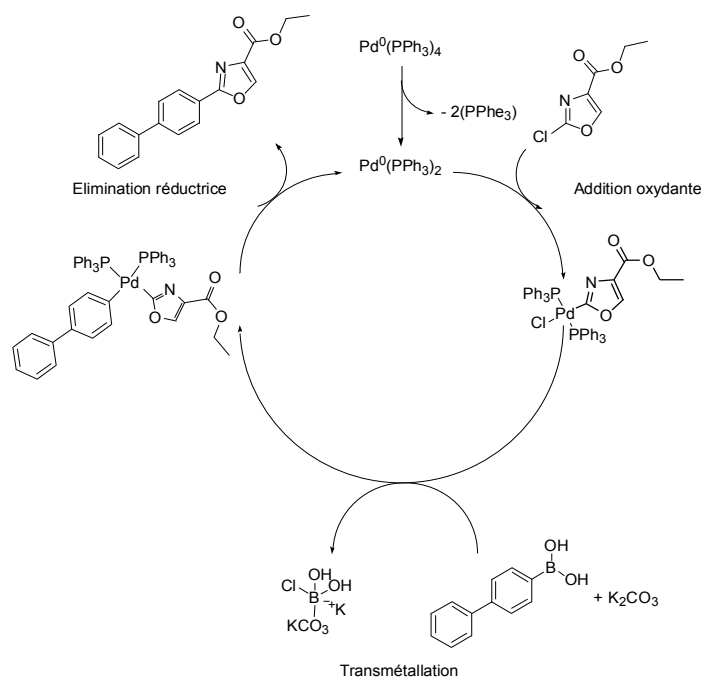


Figure 109. Mécanisme réactionnel du couplage de Suzuki

Après être passé sous sa forme $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2$, le 2-chloro-1,3-oxazole-4-carboxylate d'éthyle s'ajoute dans un premier temps au palladium triphénylphosphine ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 0,04 équiv) de manière oxydative. Dans un second temps, l'acide boronique (1,1 équiv) est activé par le carbonate de potassium (2,2 équiv) favorisant ainsi la transmétallation et la fixation du 4-biphényle sur le catalyseur palladié. Enfin, l'étape finale est une élimination réductrice qui permet la formation de la liaison carbone-carbone et la régénération du catalyseur.

Cette réaction a été effectuée dans le toluène selon le protocole de Hodgetts *et al.*⁴¹⁰ Le rendement du composé **32** obtenu est de 48 % (90°C, 2h30).

⁴⁰⁹ Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 3437 - 3440.

⁴¹⁰ Hodgetts, K, J.; Kershaw, M. T. Synthesis of 2-Aryloxazolo[4,5-c]quinoline-4(5H)-ones and 2-Arylthiazolo[4,5-c]quinoline-4(5H)-ones. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2911 - 2914.

b. Saponification : synthèse du composé 33

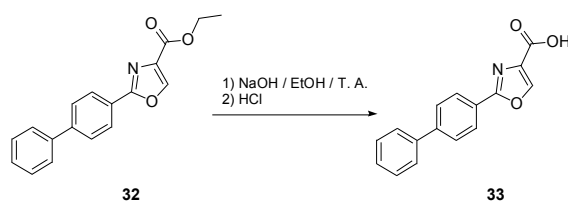


Figure 110. Synthèse du composé **33** par saponification de la fonction ester du composé **32**

La saponification de l'ester **32** a été réalisée à température ambiante en présence d'un excès de soude (10 équiv) et a permis d'obtenir l'acide **33** avec un rendement de 94 % (T. A. 24 heures).

c. Couplage de type peptidique : synthèse du composé 34

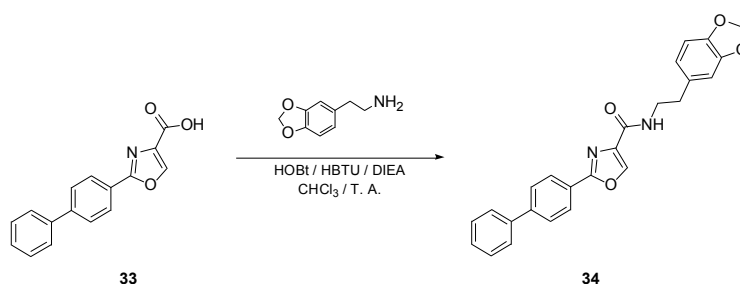
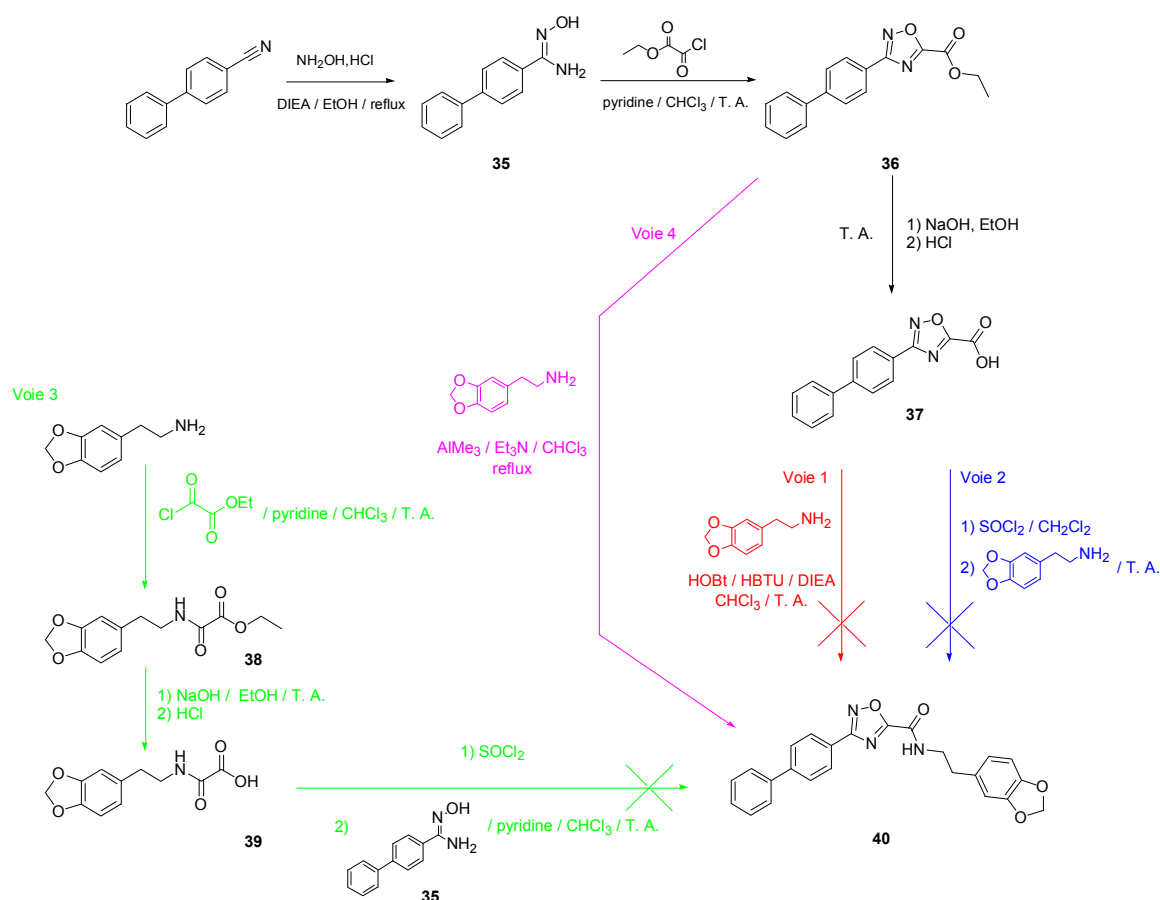


Figure 111. Synthèse du composé **34** par couplage de type peptidique du composé **33** avec la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine

Le couplage de type peptidique entre l'acide **33** et la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine (1,2 équiv) en présence des agents de couplage HBTU (1,5 équiv) et HOBt (0,5 équiv), et en présence de DIEA (4,5 équiv) a permis d'obtenir le composé **34** désiré avec un rendement de 48 % (T. A., 24 heures).

8. Synthèse du N5-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-3-(4-biphényl)-1,2,4-oxadiazole-5-carboxamide (**40**)

Figure 112. Schéma général de la synthèse du composé **40**

Le N5-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-3-(4-biphényl)-1,2,4-oxadiazole-5-carboxamide (composé **40**) a été obtenu en 3 étapes. Tout d'abord, la *N*-hydroxy-biphényl-4-carboximidine (composé **35**) est synthétisée par addition du chlorhydrate d'hydroxylamine sur le 4-cyanobiphényle commercial. L'hydroxy-amidine formée (**35**) est alors cyclisée en 1,2,4-oxadiazole à l'aide de chlorure d'éthoxyoxalyle. Dans un premier temps, l'étape d'amidification a été envisagée par saponification de la fonction ester du composé intermédiaire **36** suivi d'un couplage de type peptidique avec la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine (voie 1). Cette première voie n'ayant pas permis l'obtention de notre composé final **40**, une deuxième voie a été envisagée en activant l'acide carboxylique **37** sous sa forme de chlorure d'acyle puis en substituant l'amine (voie 2), sans succès. Une troisième voie a donc été envisagée.

Le chlorure d'éthyloxalyle a été substitué par la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine (composé **38**). Puis, le composé **38** est saponifié pour donner l'acide carboxylique correspondant (composé **39**). L'acide **39** formé, après être activé sous sa forme chlorure d'acyle, est mis en réaction avec le composé **35**. Le composé cyclisé souhaité **40** n'a malheureusement pas été obtenu (voie 3). Enfin, le composé **40** a été obtenu par une 4^{ème} voie de synthèse consistant en une amidification par aminolyse de l'ester **36** par un réactif aminoaluminium généré par le triméthylaluminium (AlMe_3) et la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine (voie 4).

a. Formation de la carboxamidine : synthèse du composé **35**

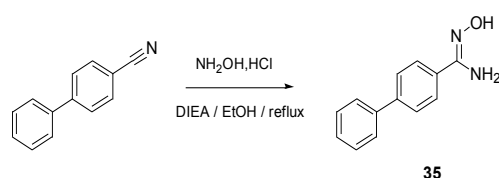


Figure 113. Schéma de synthèse du composé **35**

La synthèse de la N-hydroxy-biphényl-4-carboxamidine (composé **35**) a été réalisée dans l'éthanol à partir du 4-cyanobiphényle commercial (1 équivalent), du chlorhydrate d'hydroxylamine (2 équivalents) et d'une base organique, la DIEA (2 équivalents). Le rendement est quantitatif (reflux, 18 heures).⁴¹¹

Son mécanisme consiste en une attaque de l'amine primaire de l'hydroxylamine sur le carbone portant le nitrile du 4-cyanobiphényle.

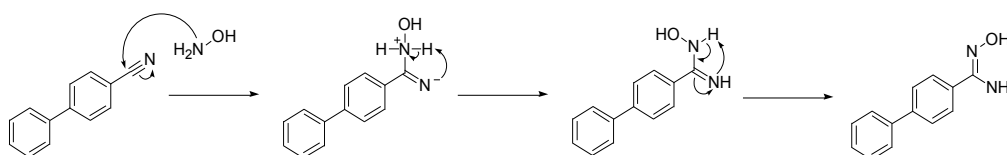


Figure 114. Mécanisme réactionnel de la synthèse du composé **35**

⁴¹¹ Burns, A. R.; Kerr, J. H.; Kerr, W. J.; Passmore, J.; Paterson, L. C.; Watson, A. J. Tuned methods for conjugate addition to a vinyl oxadiazole; synthesis of pharmaceutically important motifs. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2777 - 2783.

b. Cyclisation en 1,2,4-oxadiazole : synthèse du composé 36

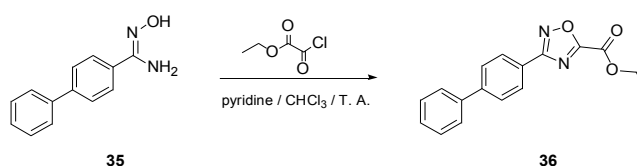


Figure 115. Synthèse du composé **36** par cyclisation du composé **35** en 1,2,4-oxadiazole-5-carboxylate d'éthyle

Cette réaction de cyclisation en 1,2,4-oxadiazole met en jeu le chlorure d'éthylaloxyle (3 équiv) et la *N*-hydroxy-biphényl-4-carboxamidine (composé **35**) en présence de pyridine (1 équiv) dans le chloroforme sous azote. Le rendement de cette cyclisation est de 60 % (T. A., 18 heures).⁴¹²

Le mécanisme de cette cyclisation en 1,2,4-oxadiazole a été envisagé ci-dessous :

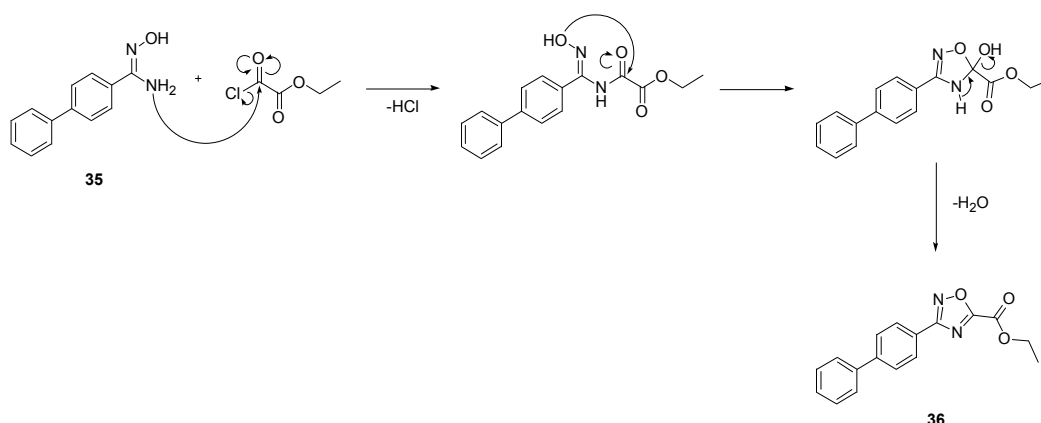


Figure 116. Mécanisme réactionnel de la cyclisation en 1,2,4-oxadiazole-5-carboxylate d'éthyle du composé **35**

c. Synthèse du composé 40 : voie de synthèse n°1

La première voie de synthèse de la *N*5-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-3-(4-biphényl)-1,2,4-oxadiazole-5-carboxamide (composé **40**) envisagée est celle passant par la saponification de

⁴¹² Bethge, K.; Pertz, H. H.; Rehse, K. New Oxadiazole Derivatives Showing partly Anti-platelet, Antithrombotic and Serotonin Antagonistic Properties. *Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, *338*, 78 - 86.

la fonction ester du composé **36** suivi d'un couplage de type peptidique avec la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine.

i. Saponification : synthèse du composé 37

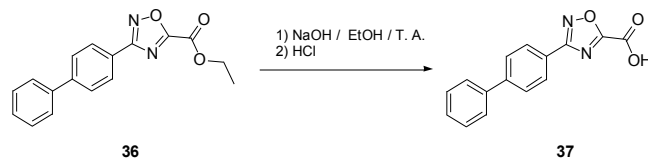


Figure 117. Synthèse du composé **37** par saponification de la fonction ester du composé **36**

La saponification de la fonction ester du composé **36** a été réalisée à température ambiante en présence d'un excès de soude (10 équiv) et a permis d'obtenir l'acide **37**, après un traitement avec une solution d'HCl 1N, avec un rendement de 75 % (T. A. 24 heures).

ii. Couplage de type peptidique : synthèse du composé 40

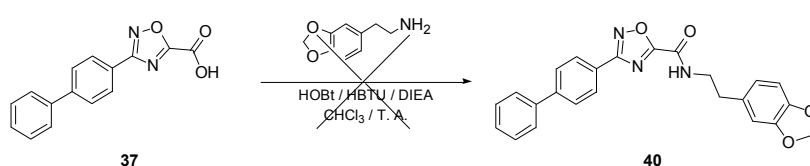


Figure 118. Synthèse du composé **40** par couplage de type peptidique du composé **37** avec la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine

Suite à l'étape de saponification, l'amidification de l'acide **37** synthétisé par la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine (1,2 équiv) en présence des agents de couplage HBTU (1,5 équiv) et HOBT (0,5 équiv) et en présence de DIEA (4,5 équiv) a été envisagée. Le composé **40** n'a cependant pas été obtenu.

d. Synthèse du composé 40 : voie de synthèse n°2

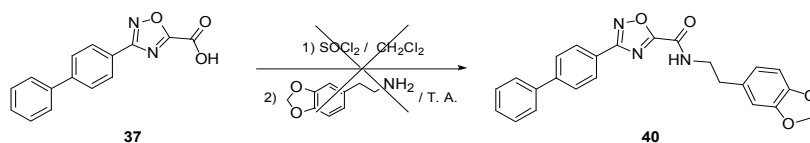


Figure 119. Synthèse du composé **40** par réaction du chlorure d'acyle du composé **37** et de la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine

Après une première voie de synthèse infructueuse, une deuxième voie de synthèse a été envisagée en passant par la formation intermédiaire du chlorure d'acyle de l'acide carboxylique **37**. Pour cela, le composé **37** a été mis en réaction avec le chlorure de thionyle (4 équiv) dans le dichlorométhane afin de former le chlorure d'acyle souhaité. Puis, après évaporation du chlorure de thionyle en excès, la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine (1,1 équiv) a été ajoutée au milieu réactionnel. L'amidification n'a cependant pas eu lieu.

L'échec des voies de synthèse n°1 et 2 pourrait s'expliquer tout d'abord par une très bonne stabilité de la fonction acide carboxylique du composé **37** avec la formation de deux pseudo-cycles à 5 sommets (cf. figure 118).

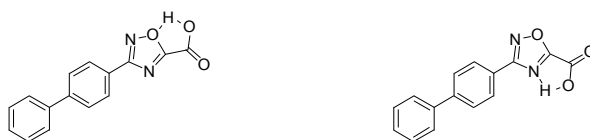


Figure 120. Représentation de la formation des pseudo-cycles à 5 sommets du composé **37**

*e. Synthèse du composé **40** : voie de synthèse n°3*

*i. Substitution avec le chlorure d'éthylloxalyle et saponification : Synthèse du composé **38***

Le *N*-(2-benzo[1,3]dioxol-5-yl-éthyl)-oxalamate d'éthyle (composé **38**) est obtenu par réaction à température ambiante du chlorure d'éthylloxalyle (1,1 équiv) sur la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine en présence de triéthylamine (4,5 équiv) dans le dichlorométhane pendant 2h30 (71 %).

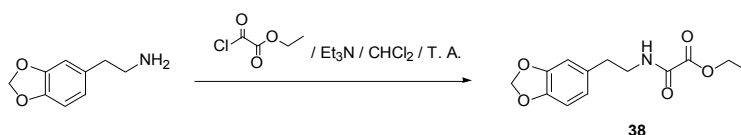


Figure 121. Synthèse du composé **38** par réaction du chlorure d'éthylloxalyle sur la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine

Après purification, la fonction ester du composé **38** est saponifiée à température ambiante en présence d'un excès de soude (10 équiv) pendant 24 heures pour donner l'acide *N*-(2-benzo[1,3]dioxol-5-yl-éthyl)-oxalamique (composé **39**, 54 %).

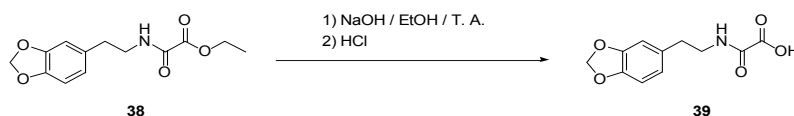


Figure 122. Synthèse du composé **39** par saponification de la fonction ester du composé **38**

ii. *Addition de la carboxamidine 35 : Synthèse du composé 40*

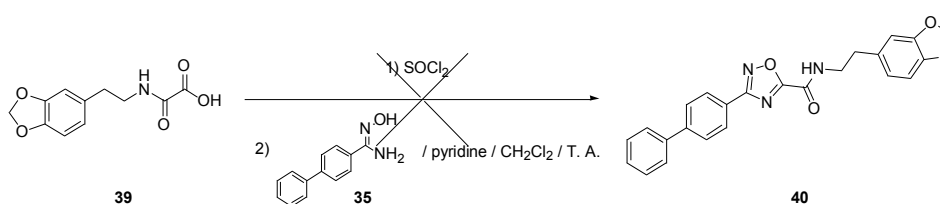


Figure 123. Synthèse du composé **40** cyclisé par réaction du composé **35** et du composé **39**

La deuxième partie de cette voie de synthèse n°3 consiste en une cyclisation en 1,2,4-oxazole. Ainsi, la formation du chlorure de l'acide *N*-(2-benzo[1,3]dioxol-5-yl-éthyl)-oxalamique, à partir du composé **39** précédemment synthétisé, a été envisagée par réaction dans le chlorure de thionyle sous azote pendant 2 heures. Le chlorure d'acyle formé étant très sensible à l'humidité, nous avons rapidement évaporé le chlorure de thionyle restant. Puis, le chlorure d'acyle a été ajouté lentement à la solution de pyridine et de composé **35** dans le dichlorométhane sous azote. Le produit **40** attendu n'a pas été formé après une nuit à température ambiante.

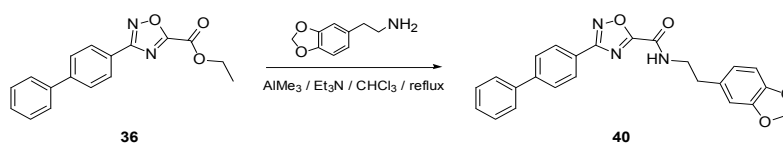
f. Synthèse du composé **40** : voie de synthèse n°4

Figure 124. Synthèse du composé **40** par aminolyse du composé **36** en présence de triméthylaluminium

Une 4^{ème} voie de synthèse a alors été envisagée selon la méthode de Weinreb.⁴¹³ Celle-ci correspond à l'amidification de l'ester **36** par un réactif aminoaluminium généré à partir d' AlMe_3 (1,3 équiv) et de 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine (1,3 équiv). La triéthylamine (3 équiv) permet ici l'obtention de la forme basique de la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine chlorhydratée commerciale. La réaction s'est effectuée dans le chloroforme anhydre et sous atmosphère inerte.

Une proposition de mécanisme de cette réaction est décrite ci-dessous :

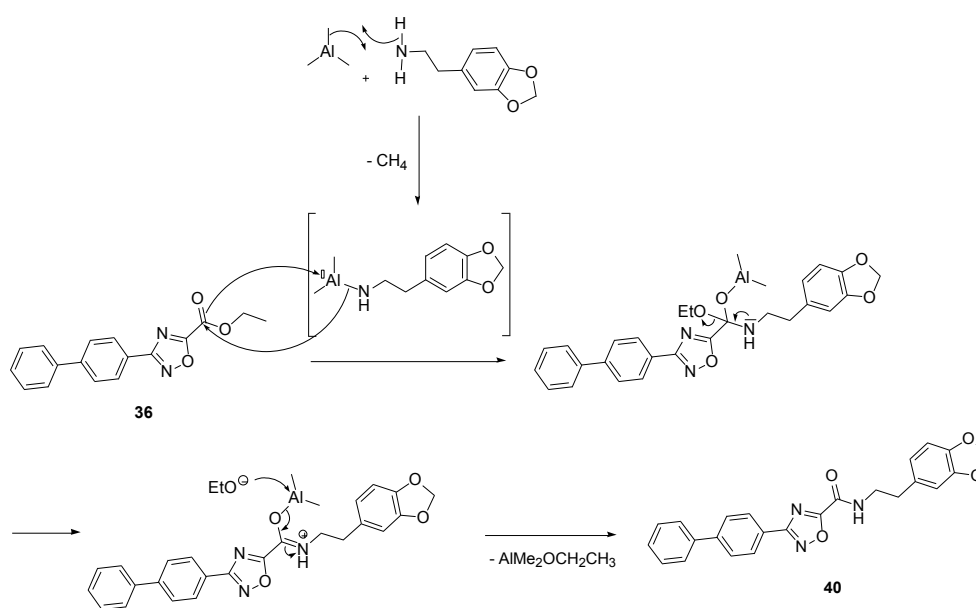


Figure 125. Mécanisme réactionnel proposé de la synthèse du composé **40** par aminolyse du composé **36** par un réactif aminoaluminium

⁴¹³ Basha, A.; Lipton, M.; Weinreb, S. M. A mild, general method for conversion of esters to amides. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 4171 – 4172.

Ainsi, le doublet de l'atome d'azote du complexe formé [R-NH-Al(Me)₂], à partir de la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine et du triméthylaluminium, attaquerait le carbonyle de la fonction ester du composé **36**, après que celui-ci se soit lié à l'atome d'aluminium. Ensuite, l'éthanoate libéré attaquerait à son tour le diméthylaluminium pour former l'amide **40**.

Par cette 4^{ème} voie de synthèse, nous avons enfin obtenu le N5-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-3-(4-biphényl)-1,2,4-oxadiazole-5-carboxamide (composé **40**) avec un rendement de 2 % (reflux, 5 heures).

Le rendement de cette réaction est extrêmement faible. Il peut s'expliquer par le nombre important de produits secondaires formés non isolés, induisant une purification difficile.

9. Synthèse du N2-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-1,3,4-oxadiazole-2-carboxamide (**44**)

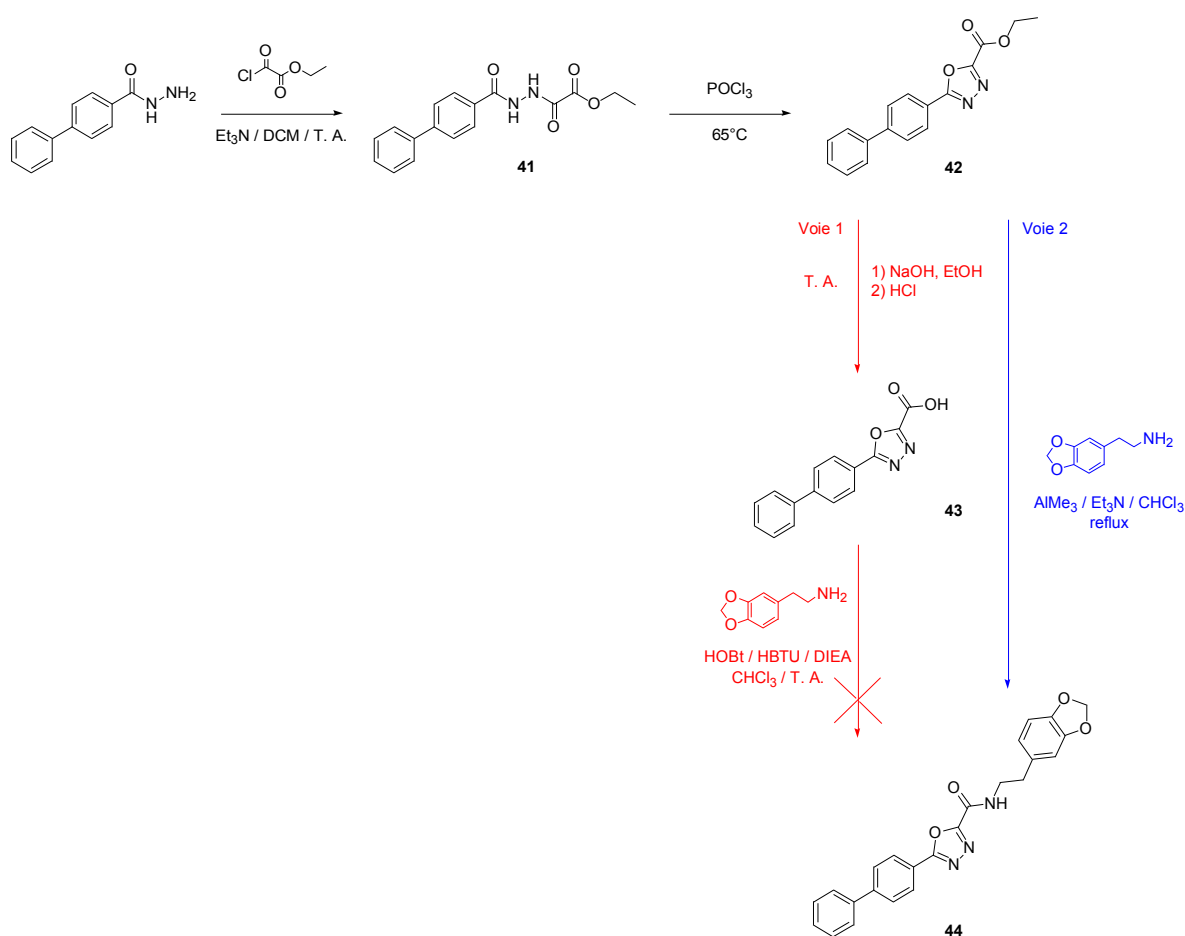


Figure 126. Schéma général de la synthèse du composé **44**

Le *N*2-[2-(1,3-benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-1,3,4-oxadiazole-2-carboxamide (composé **44**) a été obtenu en trois étapes. Tout d'abord, le chlorure d'éthyloxalyle est substitué par le 4-biphénylhydrazide commercial pour former le composé **41**. Puis, le composé **41** formé est alors cyclisé en 1,3,4-oxadiazole dans l'oxychlorure de phosphore à reflux (composé **42**). La synthèse du composé **44** ayant été effectuée en parallèle de celle du composé **40**, la saponification de la fonction ester du composé **42** suivi d'un couplage de type peptidique avait également été envisagé (voie 1). Cette voie de synthèse n'a cependant pas permis l'obtention du composé **44**. Enfin, compte-tenu de la réussite de l'amidification selon le protocole de Weinreb pour le composé **40** (AlMe_3 , Et_3N , CHCl_3 à reflux), le composé **44** a été synthétisé avec succès selon cette méthode à partir du composé **42**.

a. Substitution avec le chlorure d'éthyloxalyle : synthèse du composé

41

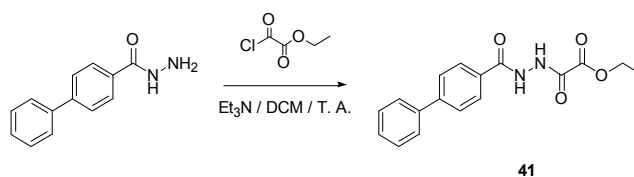


Figure 127. Synthèse du composé **41** par réaction du chlorure d'éthyloxalyle avec le 4-biphénylhydrazide

Cette première étape consiste en la substitution 4-biphénylhydrazide commercial par le chlorure d'éthyloxalyle (1,1 équiv) en présence de triéthylamine (2 équiv) dans le dichlorométhane sous azote. Le rendement est de 56 % (T. A., 2 heures).

Ce rendement moyen peut notamment s'expliquer par l'instabilité du chlorure d'éthyloxalyle qui retrouve facilement sa forme acide carboxylique. Ainsi, la réaction nécessite d'utiliser un solvant anhydre possible et d'effectuer la réaction sous atmosphère inerte.

b. Cyclisation en 1,3,4-oxadiazole : synthèse du composé 42

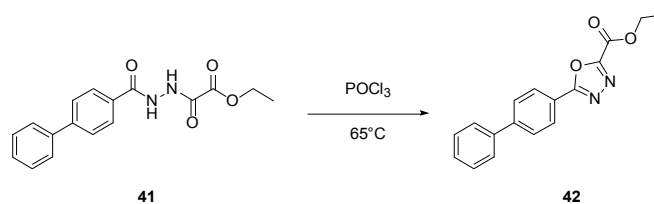


Figure 128. Synthèse du composé **42** par cyclisation du composé **41** en 1,3,4-oxadiazole-5-carboxylate d'éthyle

La deuxième étape est une cyclisation du composé **41** en 1,3,4-oxadiazole par action de l'oxychlorure de phosphore (POCl_3) utilisé également comme solvant. Le rendement de cette réaction est de 69 % (65°C , 5 heures).⁴¹²

Le mécanisme de cette cyclisation envisagé est le suivant :

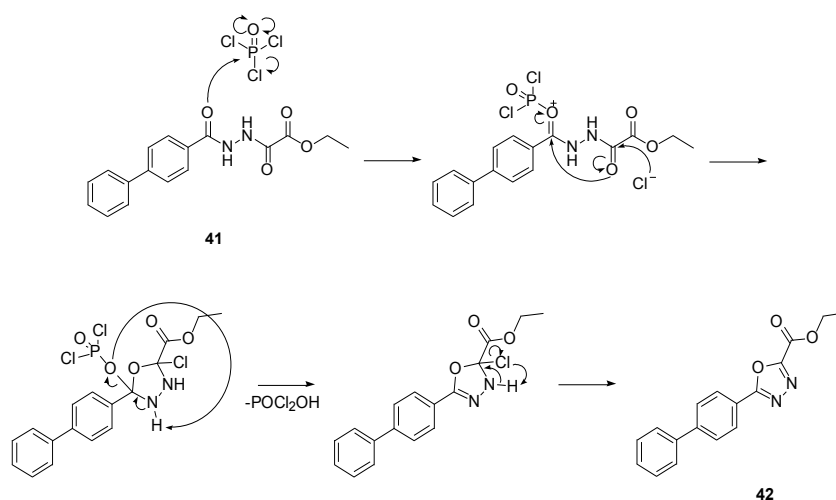


Figure 129. Mécanisme réactionnel de la cyclisation du composé **41** en 1,3,4-oxadiazole-5-carboxylate d'éthyle

c. Synthèse du composé **44**

i. Voie de synthèse n°1 : Saponification de l'ester et couplage de type peptidique

La première voie de synthèse envisagée du composé **44** est celle passant par la saponification du composé **42** en acide carboxylique (composé **43**) suivi d'un couplage de type peptidique avec la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine.

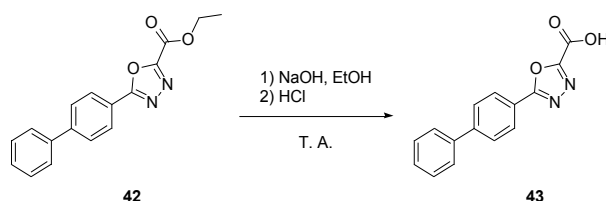


Figure 130. Synthèse du composé **43** par saponification de la fonction ester du composé **42**

La saponification du composé **42** a été réalisée à température ambiante en présence d'un excès de soude (10 équiv) et a permis d'obtenir l'acide **43** avec un rendement de 70 % (T. A., 24 heures).

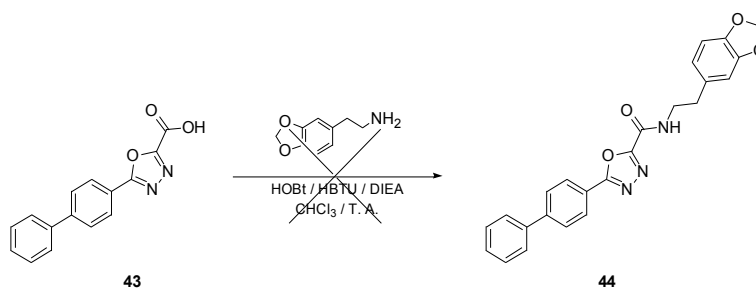


Figure 131. Synthèse du composé **44** par couplage de type peptidique du composé **43** avec la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine

La réaction d'amidification de l'acide **43** par la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine (1,2 équiv) en présence des agents de couplage HBTU (1,5 équiv) et HOBT (0,5 équiv) et en présence de DIEA (4,5 équiv) n'a pas fonctionné.

ii. Voie de synthèse n°2 : Amidification par AlMe_3

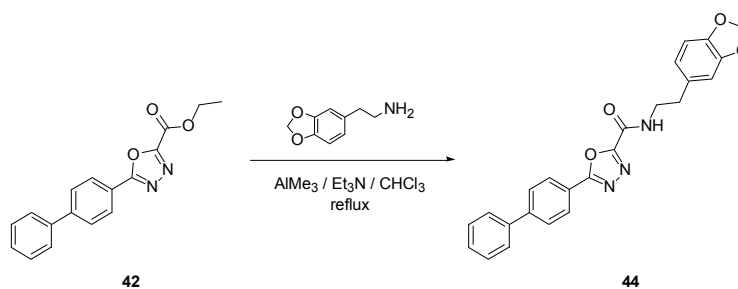


Figure 132. Synthèse du composé **44** par aminolyse du composé **42** en présence de triméthylaluminium

Le composé **44** attendu a finalement été synthétisé par amidification selon le protocole de Weinreb décrit pour la synthèse du composé **40**. Suivant cette méthode, le composé **42** a subi une amidification par un réactif aminoaluminium généré par réaction de l' AlMe_3 et de la 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine. Le rendement est de 17 % (reflux, 5 heures).

Au total, 7 composés finaux de la série B ont été synthétisés. Le récapitulatif des structures et les rendements des composés finaux obtenus sont regroupés dans le tableau 6.

Tableau 6. Structures et rendements des composés finaux de la série B : composés de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole

Nom	Structures	Rendements totaux (%)
22		52
24		26
27		0,3
31		24
34		10
40		0,8
44		6

III. Stratégie de synthèse des agonistes sélectifs du récepteur CB₂ de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole – Série C

Les composés finaux sont obtenus en 4 étapes à partir de la 1-(2-pentyloxyphényl)éthanone (composé **45**) synthétisée au laboratoire par *O*-alkylation de la fonction phénol de la 1-(2-hydroxyphényl)éthanone commercial. Le 2,4-dioxobutenoate d'éthyle **46** est ensuite obtenu par condensation de Claisen de la cétone **45** en présence d'oxalate de diéthyle et d'éthanoate de sodium, comme décrit par Marvel et Dreger.⁴¹⁴ L'intermédiaire **46** est ensuite cyclisé en isoxazole-3-carboxylate d'éthyle (composé **47**) par addition de chlorhydrate d'hydroxylamine dans l'éthanol à reflux. Il a été démontré que cette 2,4-dioxobutenoate d'éthyle **46** se présente sous sa forme énol grâce à la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire. Les composés désirés **49** à **58** sont finalement obtenus avec des rendements plus ou moins bons (19 - 77 %), par saponification de la fonction ester du composé **47** avec de l'hydroxyde de sodium dans l'éthanol à température ambiante (composé **48**) suivie par une amidification sous conditions de couplage peptidique (HOBt / HBTU / DIEA dans le chloroforme à température ambiante pendant une journée).

⁴¹⁴ Marvel, C. S.; Dreger, E. E. In *Organic syntheses collect*; Blatt AH, Ed. Wiley: New York, NY, **1941**; *1*, 238.

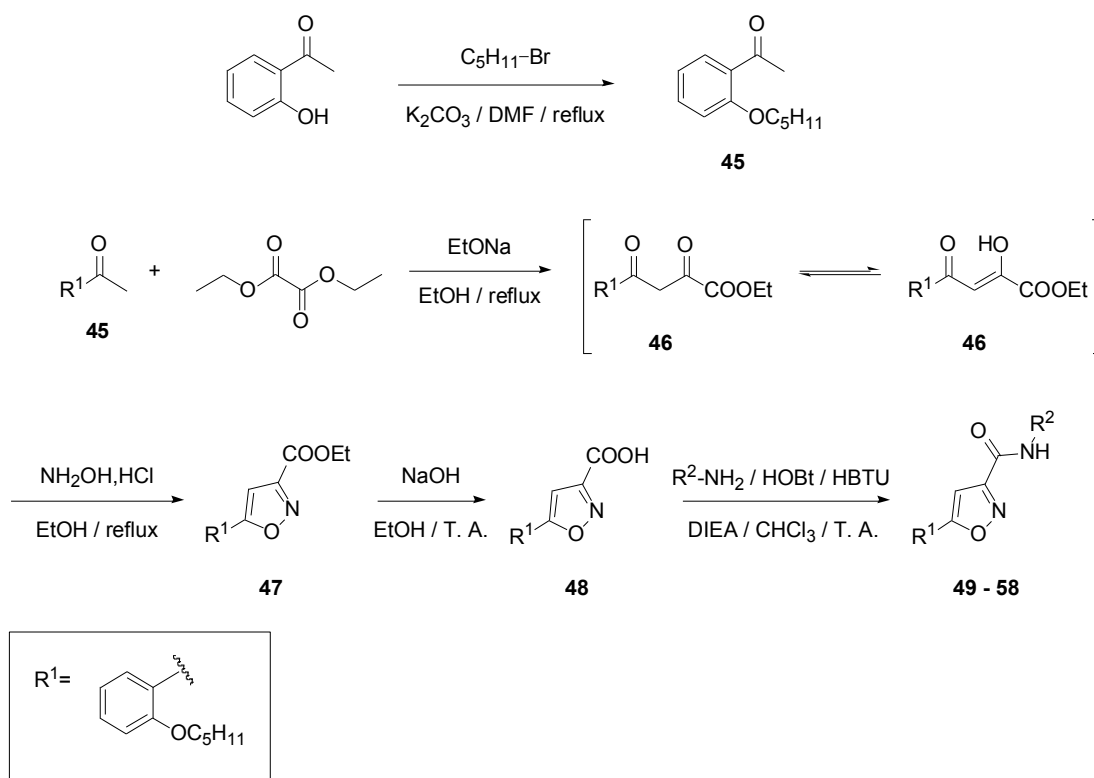
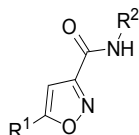


Figure 133. Schéma général de la synthèse des composés **49** à **58**

Le détail des structures des composés finaux est résumé dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7. Structures des composés **49** à **58**



<i>Composés</i>	<i>R¹</i>	<i>R²</i>
49	2-pentoxyphényl	2-adamantyl
50	2-pentoxyphényl	3-noradamantyl
51	2-pentoxyphényl	cyclobutyl
52	2-pentoxyphényl	cycloheptyl
53	2-pentoxyphényl	cyclooctyl
54	2-pentoxyphényl	phényl
55	2-pentoxyphényl	1-benzyl
56	2-pentoxyphényl	2-(5-méthyl)-1,3,4-thiadiazolyl
57	2-pentoxyphényl	naphtyl
58	2-pentoxyphényl	diisobutyl

L'espèce chimique néoformée se réarrange pour donner les céto-énolates de sodium qui sont ensuite « réacidifiés » au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique 1N. Le rendement obtenu pour cette étape est quantitatif (reflux, 2 heures).

Le mécanisme réactionnel de la synthèse du composé **46** est le suivant :

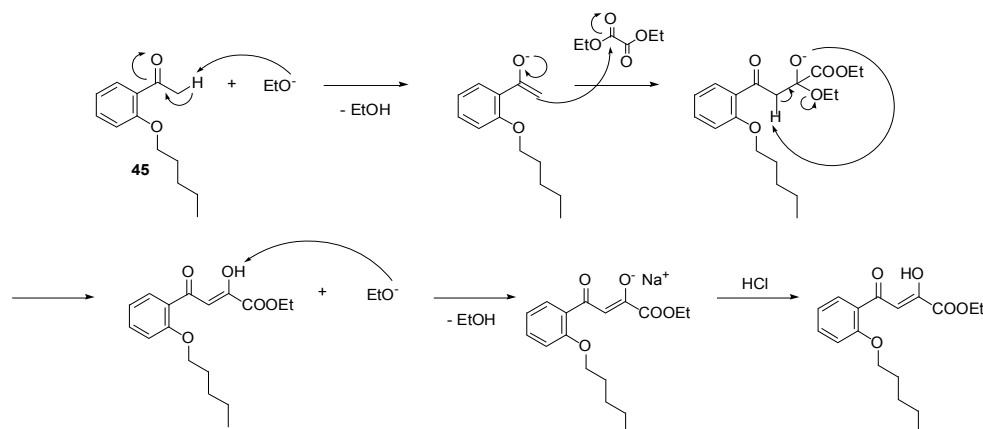


Figure 136. Mécanisme réactionnel de la synthèse du composé **46** par condensation de Claisen

3. Réaction de cyclisation en isoxazole : synthèse du composé **47**

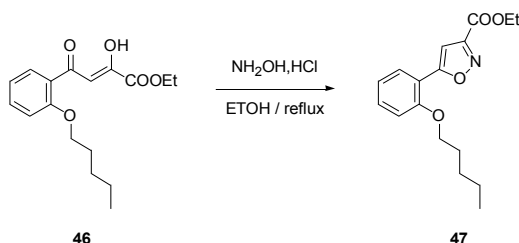


Figure 137. Synthèse du composé **47** par cyclisation du composé **46** en isoxazole-3-carboxylate d'éthyle

En solution, le chlorhydrate d'hydroxylamine (1 équiv) est en équilibre avec la forme libre de l'amine. Lorsqu'il est ajouté à la dicétone **46** obtenue précédemment, il permet de générer l'hétérocycle isoxazole par le biais du mécanisme suivant : ^{416,417}

⁴¹⁶ Pei, Y.; Wickham, B. O. S. Regioselective syntheses of 3-aminomethyl-5-substituted isoxazoles: a facile and chemoselective reduction of azide to amine by sodium borohydride using 1,3-propanedithiol as a catalyst. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7509 - 7512.

⁴¹⁷ Zeng, L. F.; Zhang, H. S.; Wang, Y. H.; Sanchez, T.; Zheng, Y. T.; Neamati, N.; Long, Y. Q. Efficient synthesis and utilization of phenyl-substituted heteroaromatic carboxylic acids as aryl diketo acid isosteres in the design of novel HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4521 - 4524.

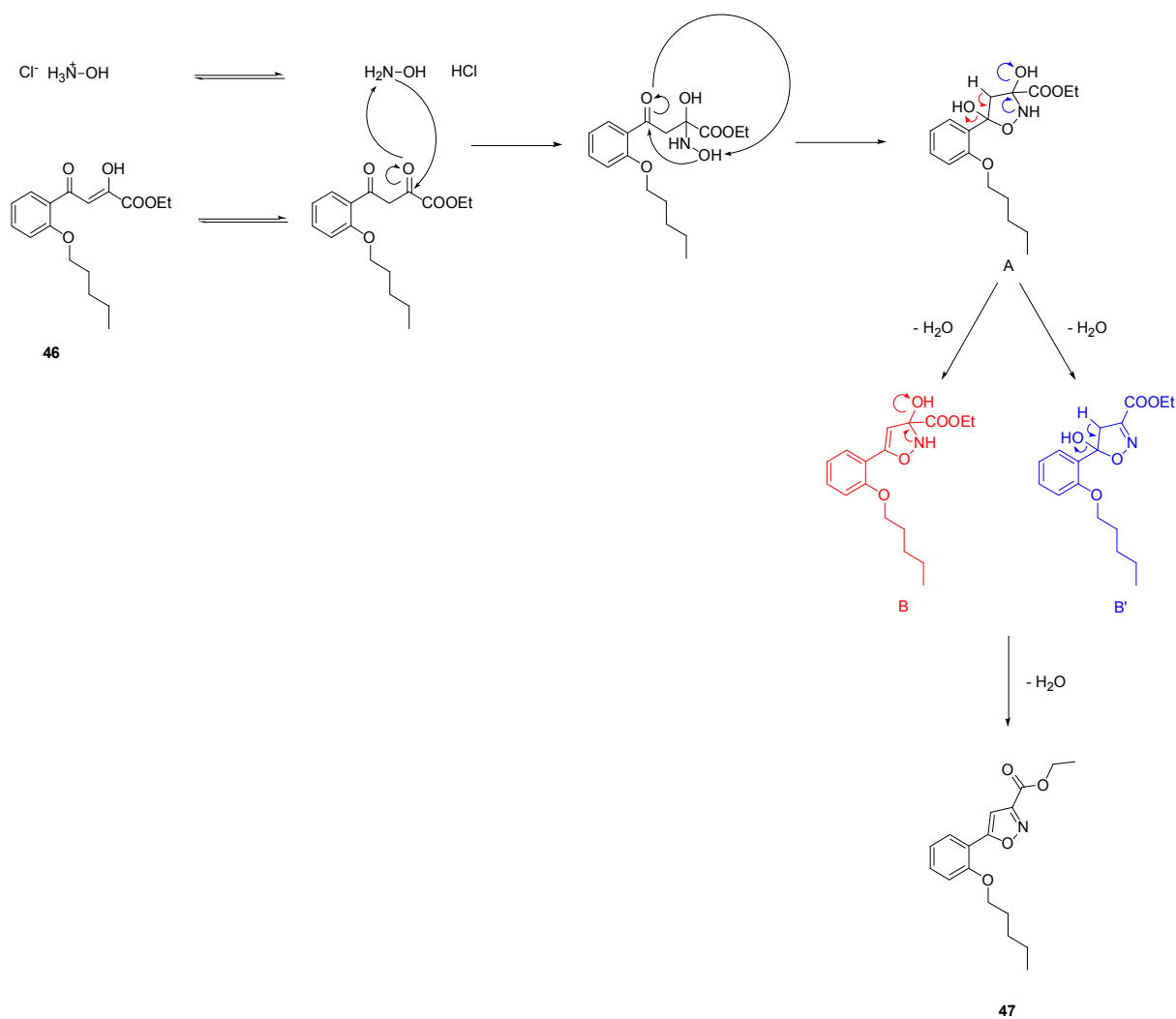


Figure 138. Mécanisme réactionnel de la cyclisation du composé **47** en isoxazole

La formation de l'isoxazole passe par une double déshydratation de l'intermédiaire A. Ainsi, la déshydratation peut d'abord être effectuée en position 4-5 et générer l'intermédiaire B ou en position 2-3 et aboutir au composé B'. Dans les deux cas, la deuxième déshydratation aboutira à l'isoxazole pur. Pour cette étape, l'isoxazole **47** a été obtenu avec un rendement de 85 % (reflux, 2 heures).

4. Saponification de l'ester : synthèse du composé **48**

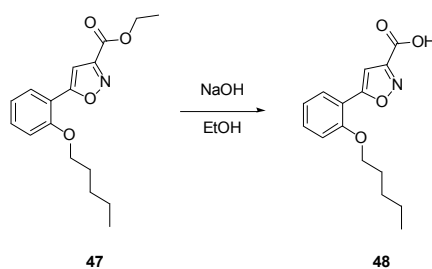


Figure 139. Synthèse du composé **48** par saponification de la fonction ester du composé **47**

La saponification de l'ester **47** a été réalisée à température ambiante en présence d'un excès de soude (10 équiv) et a permis d'obtenir l'acide **48**, après un traitement avec une solution d'HCl 1N, avec un rendement de 86 % (T. A., 24 heures).

5. Couplage peptidique : synthèse des composés finaux **49** à **58**

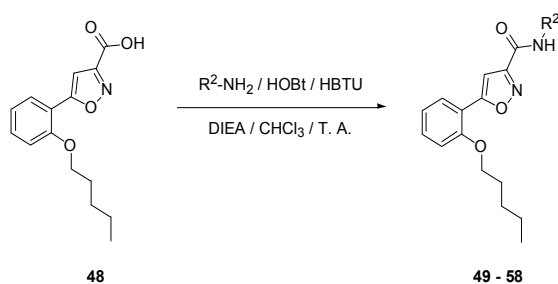
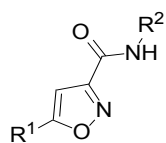


Figure 140. Synthèse des composés **49** à **58** par couplage de type peptidique de différentes amines avec le composé **48**

Une réaction d'amidification de l'acide **48** avec les amines correspondantes (1,1 équiv) en présence des agents de couplage HBTU (1,5 équiv) et HOBt (0,5 équiv), et de la DIEA, nous a permis d'obtenir les amides terminaux **49** à **58** avec des rendements variables (*cf.* tableau 8) entre 19 et 77 % (T. A., 24 heures).

Au final, la méthode de synthèse employée nous a permis de synthétiser 10 amides.

Tableau 8. Structures et rendements de l'étape d'amidification des composés **49** à **58**



Nom	R ¹	R ²	Rendement (%)
49			32
50			56
51			77
52			32
53			43
54			19
55			73
56			23
57			25
58			25

ÉVALUATIONS PHARMACOLOGIQUES



I. Méthodes des évaluations pharmacologiques

1. Mesure de l'activité inhibitrice des composés vis-à-vis de la FAAH

Les mesures de l'activité inhibitrice vis-à-vis de la FAAH (valeur de la CI_{50}) ont été réalisées à la plateforme de binding de l'ICPAL par M^{me} Amélie Barczyk. Le test consiste à déterminer la concentration pour laquelle le composé à tester inhibe 50 % de l'activité enzymatique (CI_{50}). Pour cela, les activités inhibitrices sont mesurées en suivant le pourcentage d'inhibition de l'hydrolyse du [³H]-anandamide par la FAAH en présence de différentes concentrations de l'inhibiteur potentiel à tester. Les CI_{50} sont ensuite calculées pour les meilleurs composés.

Concrètement, 60 ng de FAAH recombinante humaine (Cayman) dans 165 μ L de tampon (125 mM de chlorhydrate de trishydroxyméthylaminométhane, Tris HCl, 1 mM d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), pH = 9) avec 10 μ L d'une solution de composé à tester dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et 25 μ L de [³H]-anandamide (50 000 dpm, concentration finale 2 μ M) sont incubés dans des tubes pendant 10 min à 37°C. La réaction est ensuite stoppée par un rapide ajout dans la glace, d'un mélange méthanol/chloroforme (1:1, v/v). Puis, les tubes sont vigoureusement agités. Les phases sont séparées par centrifugation à 2500 rpm, et des aliquots de 70 μ L de la phase méthylique supérieure sont prélevés puis mis en contact avec le liquide scintillant « MicroScintTM40 » (Perkin Elmer). La lecture est réalisée à l'aide du compteur à scintillation (« TOP COUNT », Perkin Elmer).

Les tubes ne contenant que du DMSO servent de contrôle et leur valeur est systématiquement soustraite pour les calculs. Dans ces conditions, l'URB597 (*cf.* figure 141) a été utilisé comme inhibiteur de référence, et inhibe la FAAH humaine avec une CI_{50} de 15 nM (CI_{50} = 4,6 nM dans la littérature).²³⁵ Aussi, les CI_{50} ont été calculées quand le pourcentage d'inhibition était supérieur à 50 % à la concentration de 10^{-5} M.

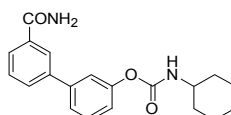


Figure 141. Structure de l'URB 597 : composé de référence.

2. Mesure de l'activité cytotoxique des composés

Les activités antiprolifératives des composés ont été mesurées afin d'évaluer les effets cytotoxiques potentiels de ceux-ci. Ces mesures ont été effectuées à l'ICPAL par M^{me} Amélie Barczyk.

Concrètement, la prolifération des cellules est évaluée par une méthode colorimétrique développée par Promega, le « CellTiter96* Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay ». Cette méthode est basée sur la réduction du 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium (MTS, jaunâtre) en un produit coloré, le formazan (violet), par le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) ou nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) déshydrogénase des cellules métaboliquement actives (cf. figure 142). La quantité de formazan produite est mesurée par l'absorbance à une longueur d'onde de 490 nm. Cette quantité de formazan produite est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

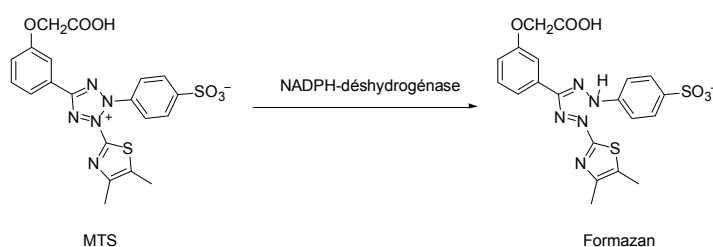


Figure 142. Réaction de réduction du MTS en formazan

Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits (3000 cellules par puits). Elles sont cultivées pendant 24 heures dans leur milieu de culture. Les cellules sont ensuite incubées en présence des composés à étudier. Les solutions-mères de composés sont préparées dans le DMSO à une concentration de 10⁻² M. Puis, ces solutions sont diluées dans un milieu de culture contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) pour obtenir différentes concentrations. Ainsi, la concentration finale en DMSO est inférieure à 1 ‰ et compatible avec la croissance cellulaire. Après 72 heures d'incubation, les cellules sont mises en contact avec 20 µL d'une solution de MTS.

Enfin, après 1 à 4 heures d'incubation, l'absorbance est mesurée grâce à un lecteur de microplaques « Power wave XS » (Biotek) à 490 nM. Les résultats obtenus sont traités par le logiciel « Gen5 » et sont représentés par une courbe effet-dose traduisant le pourcentage de cellules vivantes en fonction de la concentration de la molécule étudiée. Cette courbe permet de calculer la CI_{50} qui correspond à la concentration de la molécule pour laquelle on observe une réduction de 50 % du nombre de cellules par rapport à un contrôle n'ayant subi aucun traitement.

3. Mesure de l'affinité des composés vis-à-vis des récepteurs CB_1 et CB_2

Les tests de liaison aux récepteurs aux cannabinoïdes ont été réalisés sur la plateforme de Binding de l'ICPAL avec l'aide du Dr Roxane Mansouri. Ils ont été effectués sur des membranes cellulaires préparées à partir de cellules surexprimant de manière stable soit le récepteur CB_1 humain (hCB_1), soit le récepteur CB_2 humain (hCB_2).

Lors de ces tests les composés [3H]-SR141716A (0,5 nM) et [3H]-CP55,940 (0,5 nM) ont été utilisés respectivement comme radioligands de référence des récepteurs hCB_1 et hCB_2 . Ces radioligands ont été ajoutés à une solution de nos composés dans le DMSO (concentration finale inférieure à 0,1 %) ainsi que 6 μ g de membranes cellulaires diluées dans une solution tampon (20 mM HEPES, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0,3 % albumine de sérum bovin, pH 7,4) pour un volume total de 550 μ L. Après 1h30 d'incubation à 30°C, les solutions sont rapidement filtrées sur plaque filtrante « Unifilter-96 GF/C », préalablement trempée dans la solution tampon, à l'aide d'un « Filtermate Unifilter 96-Harvester » (PerkinElmer).

La plaque filtrante est ensuite lavée 20 fois au tampon froid sans albumine. Ensuite, 60 μ L de liquide scintillant sont ajoutés dans chaque puits de la plaque filtrante. Enfin, après 30 min au froid (4°C), la radioactivité sur la plaque filtrante est mesurée à l'aide d'un « TopCount NXT™ Microplate Scintillation Counter » (PerkinElmer). Le (R)-(+)-WIN 55,212-2 (cf. figure 143) a été utilisé comme composé agoniste de référence des récepteurs CB_1 et CB_2 .

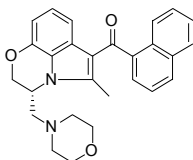


Figure 143. Structure du (R)-(+)-WIN 55,212-2 : composé de référence

Tous les composés ont d'abord été évalués à une concentration de 1 μM sur les deux récepteurs et les valeurs de constantes d'inhibition K_i ont été déterminées lorsque le pourcentage de liaison spécifique était supérieur à 60 %. Dans ce cas, chaque composé a été testé à des concentrations allant de 10^{-6} à 10^{-12} M, permettant ainsi de tracer une courbe et de déterminer par régression non-linéaire, la CI_{50} . Le K_i , quant à lui, a été calculé à partir de la CI_{50} , en appliquant l'équation de Cheng-Prusoff :

$$K_i = \text{CI}_{50} / (1 + L / K_d)$$

dans laquelle, L représente la concentration en radioligand et

K_d , la constante de dissociation à l'équilibre pour le radioligand.

4. Mesure de l'activité fonctionnelle des composés vis-à-vis des récepteurs CB_1 et CB_2

En plus des tests d'affinités pour les récepteurs $h\text{CB}_1$ et $h\text{CB}_2$, nous avons déterminé la fonctionnalité de nos composés les plus affins pour le récepteur CB_2 .

Pour ceci, nous avons utilisé la guanosine-5'-O-(3-[^{35}S]-GTP γS) ainsi que des membranes de cellules CHO exprimant $h\text{CB}_2$ comme précédemment décrit.³⁹⁹ Ce test constitue une mesure de l'activation de la protéine G par le récepteur, première étape dans la voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G. Dans cet essai, des antagonistes n'ont pas d'effet sur la liaison du [^{35}S]-GTP γS alors que les agonistes ont montré une augmentation de la liaison du nucléotide au récepteur.

L'efficacité maximale (E_{max}) et la concentration efficace à 50% (CE_{50}) de nos composés nouvellement synthétisés, ainsi que du WIN-55,212-2 utilisé comme composé de référence, ont été ainsi déterminés.

L'activité basale du récepteur a été établie à hauteur de 100%. Ainsi, les efficacités maximales au-dessus de 100% indiquent que les composés possèdent un caractère agoniste (partiel ou entier) envers le récepteur, alors que les efficacités maximales égales ou inférieures à 100% informent respectivement du caractère antagoniste et agoniste inverse des composés pour le récepteur.

5. *Mesure de la stabilité des composés en présence de microsomes hépatiques*

Une étude de la stabilité métabolique des composés agonistes selectifs CB₂, sélectionnés pour une étude *in vivo*, en présence de microsomes hépatiques de souris mâles a été réalisée à la plateforme de criblage de l'unité Inserm U761.

Les incubations des composés sont effectuées en « duplicate » dans un bain d'eau agité à 37 °C. Les mélanges d'incubation ont été préparés dans des tubes en polypropylène contenant 1 µM de composé test (1 % dans le méthanol), les microsomes de foie de souris mâles CD-1 (0,3 mg de protéine microsomale/mL), 5 mM de MgCl₂, 1 mM de NADP, 5 mM de glucose-6-phosphate, 0,4 U/mL de glucose-6-phosphate et de 50 mM de tampon phosphate de potassium (pH 7,4) dans un volume final de 0,5 mL. Les points d'échantillonnage sont pris à 5, 10, 20, 30 et 40 min et les réactions sont arrêtées par l'ajout d'acétonitrile glacé contenant 200 nM de standard interne (4 vol). Les échantillons sont alors centrifugés pendant 10 min à 10000 g et à 4 °C pour permettre la précipitation des protéines microsomales. Le surnageant est ensuite soumis à une analyse LC-MS/MS. Les incubations de contrôle ont été effectuées en « triplicate » avec des microsomes dénaturés dans de l'acétonitrile contenant 200 nM de standard interne et le propranolol, composé de référence dont la biodisponibilité est connue. Les points d'échantillonnage ont été prélevés à 0 et 40 min (pour évaluer la stabilité chimique du propranolol dans les conditions expérimentales).

Les échantillons dans les mélanges d'incubation sont ensuite séparés par chromatographie liquide à ultra haute performance (CLUHP) et quantifiés.

Le calcul de quantification de chaque composé a été obtenu par la conversion des ratios d'échantillon sur surface du pic du standard interne en pourcentage de composé restant, 100 % étant la valeur du ratio à t = 0 min. La clairance intrinsèque *in vitro* (Cl_{int} exprimée en $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$) a été calculée selon l'équation suivante

$$Cl_{int} = \text{dose} / AUC_{\infty}$$

où la dose représente la quantité initiale de composé dans le mélange d'incubation (1 μM) et AUC_{∞} représente l'aire sous la courbe de concentration en fonction du temps extrapolée à infini.

Le temps de demi-vie *in vitro* ($t_{1/2}$ exprimé en min), représentant le temps nécessaire pour que la quantité du composé présent soit divisée par deux, a été calculé selon la formule suivante :

$$t_{1/2} \text{ in vitro} = \ln(2) / k$$

où k est la constante d'élimination du composé calculée à partir de la pente de la courbe de régression linéaire et exprimée en min^{-1} .

6. *Mesure de l'activité anti-inflammatoire in vivo des composés*

L'activité anti-inflammatoire des meilleurs composés agonistes sélectifs du récepteur CB₂ synthétisés et testés *in vitro* a été évaluée sur un modèle murin de colite induite au dextran sulfate de sodium (DSS). Cette expérimentation a été effectuée à l'unité Inserm U995 par le Dr Mathilde Body-Malapel (cf. figure 144).

Pour ceci, 4 groupes de 10 souris mâles C57 / B16 âgées de 7 semaines, sans maladie spécifique sont constitués : mise à part le groupe de contrôle contenant 6 individus, chaque groupe comprend 10 individus. La colite a été induite par le DSS dissous dans de l'eau distillée et stérile, à une concentration de 2,5 % (w/v). Le DSS est donné *ad libitum* pendant 7 jours. Simultanément, les composés dissous dans des hydroxypropyl- β -cyclodextrines (150 mM) à la concentration de 10 mg/kg de masse corporelle sont injectés par voie intrapéritonéale quotidiennement. Les souris de contrôle ne reçoivent que les cyclodextrines.

Chaque jour, la masse corporelle des souris est mesurée et au 7^{ème} jour, les souris sont sacrifiées afin de déterminer l'indice d'activité de la maladie (DAI), la longueur du côlon, les scores histologiques et les taux des ARN messagers des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et Kc.

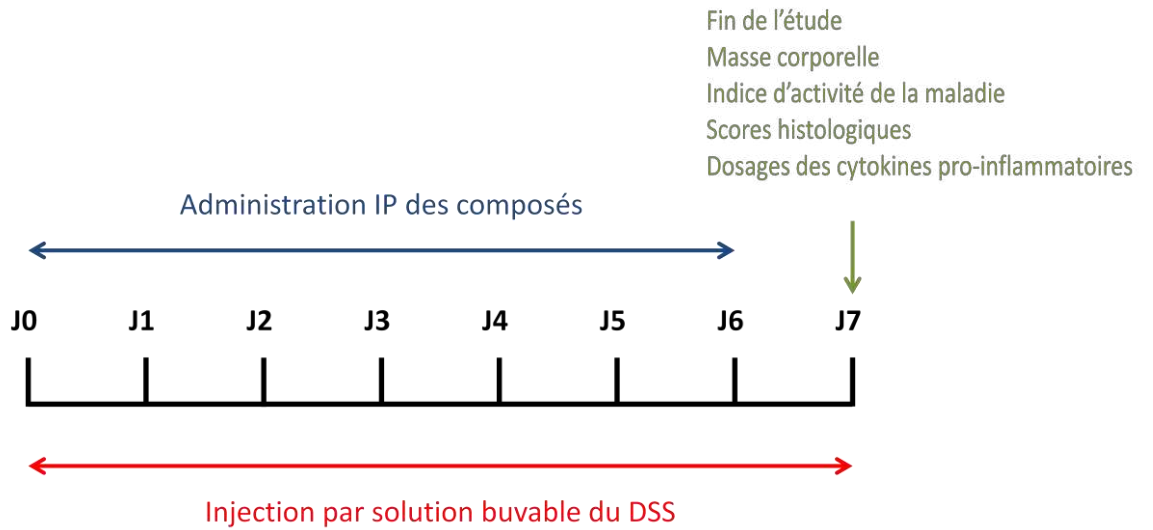
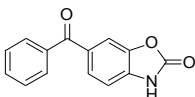
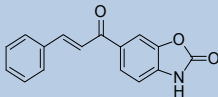
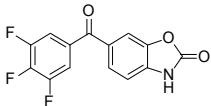
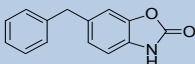
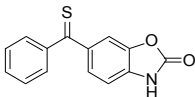
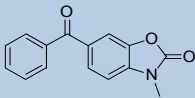
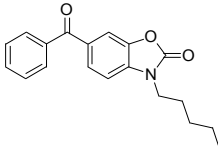
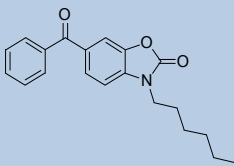
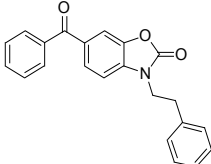
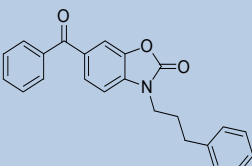
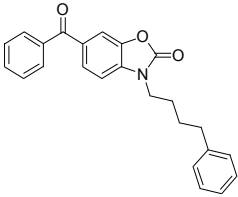
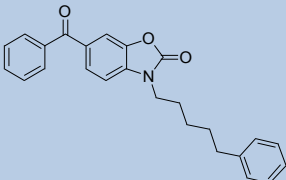
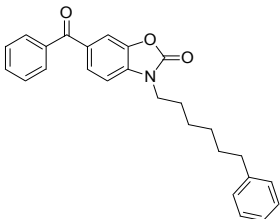
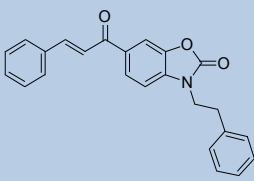
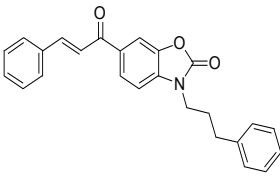
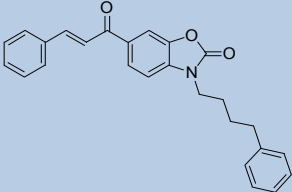
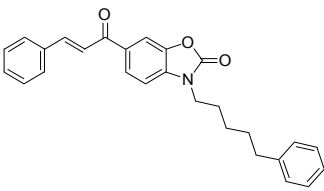
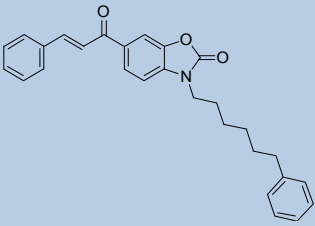


Figure 144. Représentation schématique de l'étude *in vivo*

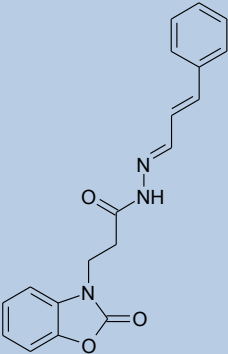
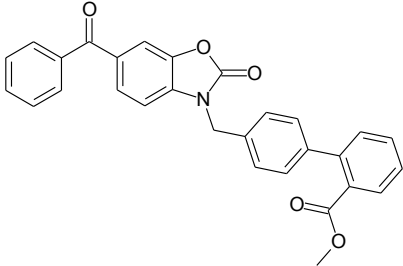
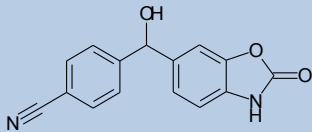
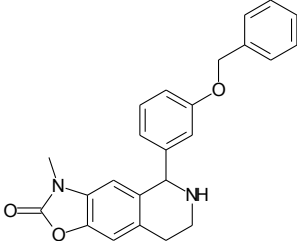
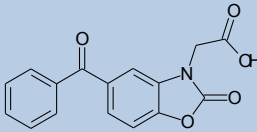
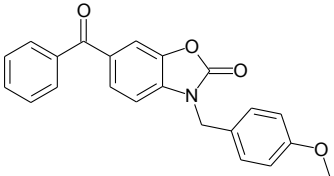
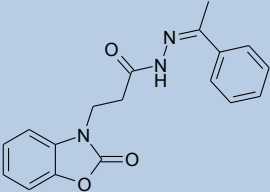
II. Résultats pharmacologiques des composés de la série A

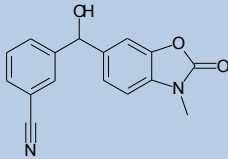
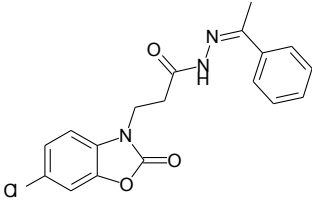
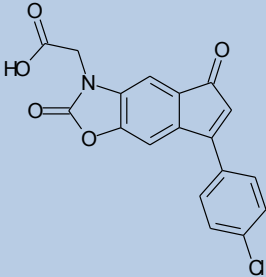
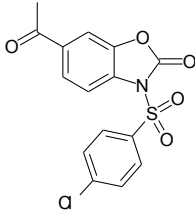
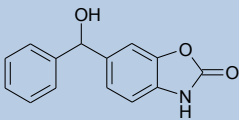
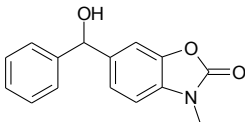
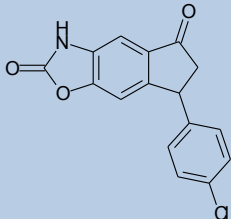
Tableau 9. Activités inhibitrices de la FAAH des composés de la Série A

Nom	Structure	CI ₅₀ (FAAH)
1		> 10 μM
2		> 10 μM
3		> 10 μM
5		> 10 μM
7		> 10 μM
8		> 10 μM
9		> 10 μM
10		5,02 ± 3,85 μM
11		> 10 μM
12		> 10 μM

Nom	Structure	Cl ₅₀ (FAAH)
13		> 10 μM
14		> 10 μM
15		> 10 μM
16		> 10 μM
17		> 10 μM
18		> 10 μM
19		> 10 μM
20		> 10 μM

Nom	Structure	Cl ₅₀ (FAAH)
21		> 10 μM
C1		> 10 μM
C2		> 10 μM
C3		> 10 μM
C4		> 10 μM
C5		> 10 μM

Nom	Structure	Cl ₅₀ (FAAH)
C6		> 10 μM
C7		> 10 μM
C8		> 10 μM
C9		7,08 ± 0,34 μM
C10		> 10 μM
C11		2.92 ± 0,16 μM
C12		> 10 μM

Nom	Structure	CI ₅₀ (FAAH)
C13		> 10 μM
C14		> 10 μM
C15		> 10 μM
C16		> 10 μM
C17		> 10 μM
C18		> 10 μM
C19		> 10 μM

L'évaluation des 38 composés finaux de la série A a révélé que contrairement à ce que nous attendions, la grande majorité des composés ne présente aucune activité inhibitrice envers la FAAH. En effet, d'après le tableau 9, seulement 3 composés (**10**, **C9** et **C11**) possèdent une CI_{50} inférieure à 10 μ M (cf. figure 145).

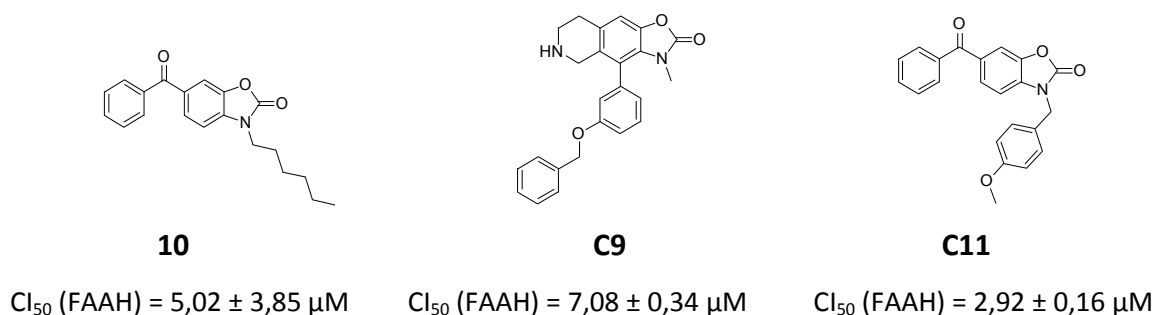


Figure 145. Structures des composés de la série A inhibiteurs de la FAAH

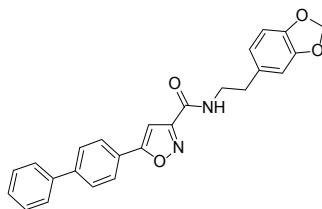
À partir de ces résultats, il nous est possible de dégager plusieurs RSA. Tout d'abord, nous pouvons observer que les composés **1**, **2** et **C17**, structurellement proches avec l'atome d'azote de la 2-benzoxazolinone non alkylée, ne présentent aucune activité inhibitrice vis-à-vis de la FAAH, tout comme les composés **8** et **C18** où l'atome d'azote est méthylé. De la même manière, le composé **9** avec une chaîne *N*-pentyle ne possède pas d'activité inhibitrice. Cependant, une activité est détectée lorsque la chaîne alkyle est de 6 carbones. Ainsi, le composé **10** possède une CI_{50} de 5,02 \pm 3,85 μ M. Il semblerait alors qu'une chaîne alkyle substituant l'atome d'azote de la 2-benzoxazolinone d'une longueur au moins égale à 6 carbones soit favorable à l'inhibition de la FAAH. Il sera cependant nécessaire d'évaluer des composés analogues au composé **10**, possédant une chaîne alkyle de plus de 6 carbones afin de confirmer cette hypothèse.

Ensuite, nous pouvons également remarquer que les composés **12** et **17**, possédant une chaîne phénylpropyle sur l'atome d'azote de la 2-benzoxazolinone, ne présentent pas d'activité inhibitrice de la FAAH. Pourtant, la longueur de cette chaîne phénylpropyle est identique à la longueur de la chaîne hexyle du composé **10**. Une explication possible serait que le groupement phényle soit trop encombrant.

Enfin, nous constatons que les composés **11** et **16**, possédant une chaîne phényléthyle sur l'atome d'azote de la 2-benzoxazolinone, ne montrent pas d'inhibition de la FAAH, alors que le composé **C11** avec un groupement *p*-méthoxybenzyle sur l'atome d'azote présente une CI_{50} de $2,92 \pm 0,16 \mu\text{M}$. Ainsi, le groupement méthoxy en position *para* du benzyle (composé **C11**) semble favorable à l'activité inhibitrice. De plus, nous retrouvons également le motif éther phénolique sur le composé **C9**, composé montrant une inhibition de la FAAH ($CI_{50} = 7,08 \pm 0,34 \mu\text{M}$).

Sur les 7 composés finaux de la série B, 4 composés (composés **22**, **24**, **31** et **34**) ont été évalués dans un test d'inhibition compétitive de la FAAH. Les composés **27**, **40** et **44** seront prochainement testés.

L'activité inhibitrice de l'**ALIAE202**, composé « lead » de la série B, vis-à-vis de la FAAH, a été une première fois évaluée par un autre protocole effectué à l'Université Catholique de Louvain au sein de l'équipe du Pr. Didier Lambert et du Pr Giulio Muccioli. L'**ALIAE202** possédait alors une CI_{50} de 88 nM. Afin de pouvoir comparer les composés finaux de la série B, dérivés de l'**ALIAE202**, nous avons décidé d'évaluer les composés finaux de la série B et l'**ALIAE202** à la plateforme de binding de l'ICPAL selon un même protocole. La CI_{50} du composé **ALIAE202** mesurée à l'ICPAL est de 27 nM (cf. figure 146).



ALIAE202

CI_{50} (FAAH) = 27 nM

Figure 146. Activité inhibitrice de l'**ALIAE202** déterminée à l'ICPAL

D'après le tableau 10, nous pouvons remarquer que le remplacement de la fonction carboxamide en position C-3 de l'**ALIAE202** par la fonction thioamide (composé **24**) a fait chuter l'activité inhibitrice vis-à-vis de la FAAH de 27 nM à 170 nM. De même, lorsque l'azote de la fonction carboxamide de l'**ALIAE202** est méthylé (composé **22**), l'inhibition de la FAAH est alors 37 fois moins bonne (CI_{50} (FAAH) = 1,0 μ M). Ainsi, il apparaît que l'atome d'oxygène de la fonction carboxamide soit préférable à l'atome de soufre mais également, que l'hydrogène porté par l'atome d'azote de l'amide soit nécessaire à une bonne inhibition de la FAAH (cf. figure 147).

Nous pouvons observer que le remplacement de l'hétérocycle central de l'**ALIAE202** par le 5-carboxamido-1,2-isoxazole (composé **31**) n'altère pas l'activité inhibitrice de la FAAH (**31** : CI_{50} (FAAH) = 25 nM).

Cependant, lorsque le 3-carboxamido-1,2-isoxazole du composé **ALIAE202** est remplacé par le 4-carboxamido-1,3-oxazole (composé **34**), l'activité inhibitrice vis-à-vis de la FAAH passe de 27 nM à 3,4 μM. Ainsi, il semble que l'inversion de l'atome d'azote et d'oxygène en position 1 et 2 de l'hétérocycle central n'entraîne aucune modification de l'activité. Alors que la permutation de l'atome d'azote de la position 2 à la position C-4 est délétère pour l'inhibition de la FAAH (cf. figure 147).

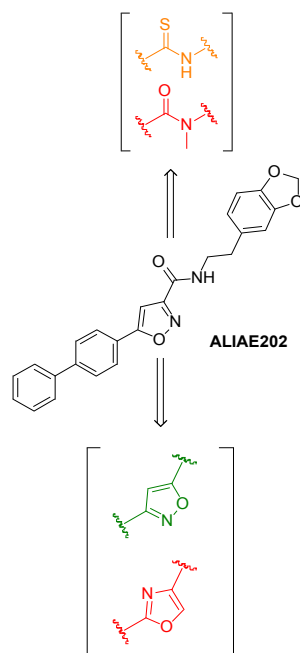


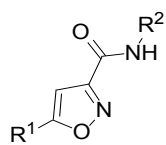
Figure 147. Relations structure-activité de la série B
(vert = inhibition égale ou meilleure, orange = inhibition légèrement moins bonne, rouge = très peu d'inhibition ; en comparaison avec l'inhibition de la FAAH par l'ALIAE202)

Plusieurs RSA ont ainsi pu être établies mais l'évaluation des composés **27**, **40** et **44** nous permettra de déterminer si l'inversion des positions de l'atome d'azote et d'oxygène de la fonction carboxamide (composé **27**) ou si l'ajout d'un hétéroatome au sein de l'hétérocycle central (composés **40** et **44**) entraînera une perte ou un gain d'activité.

IV. Résultats pharmacologiques des composés de la série C

Les composés de la série C (composés agonistes sélectifs du récepteur CB₂ de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole) ont été testés et comparés à des composés précédemment synthétisés au laboratoire par le Dr Virginie Lucas. Ces composés précédemment synthétisés sont regroupés dans le tableau 11 et numérotés de **V1** à **V18**.

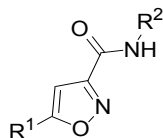
Tableau 11. Structure des composés de la série C précédemment synthétisés **V1** à **V18**



Nom	R ¹	R ²
V1		
V2		
V3		
V4		
V5		
V6		
V7		
V8		
V9		
V10		
V11		
V12		
V13		
V14		
V15		
V16		
V17		
V18		

1. Affinité des composés vis-à-vis des récepteurs CB₁ et CB₂

Tableau 12. Affinités des composés **V1** à **V18**, **49** à **58**, et du **WIN-55,212-2** pour les récepteurs CB₁ et CB₂.



Nom	R ¹	R ²	K _i (nM)		Index de sélectivité CB ₂ vs CB ₁
			hCB ₂	hCB ₁	
V1			949 ± 65	ND	ND
V2			>1000	ND	ND
V3			>1000	ND	ND
V4			>1000	ND	ND
V5			70,1 ± 5,4	>3000	>42
V6			>1000	ND	ND
V7			79,6 ± 5,8	>1000	>12
V8			369 ± 62	>3000	>8
V9			36,0 ± 3,4	>3000	>83
V10			30,5 ± 6,4	>3000	>98
V11			>1000	ND	ND
V12			>1000	ND	ND

Nom	R ¹	R ²	K _i (nM)		Index de sélectivité CB ₂ vs CB ₁
			hCB ₂	hCB ₁	
V13			>1000	ND	ND
V14			>1000	ND	ND
49			60,1 ± 6,2	>3000	>49
50			9,0 ± 0,6	>1000	>111
V15			>1000	ND	ND
51			411,6 ± 71	>1000	>2,4
V16			60,9 ± 0,9	>1000	>16
V17			22,8 ± 4,6	>3000	>131
V18			600 ± 76	ND	ND
52			60,8 ± 6,9	>3000	>49
53			73,5 ± 6,8	>3000	>40
54			>1000	ND	ND
55			>3000	ND	ND
56			>3000	ND	ND
57			>1000	ND	ND
58			22,1 ± 3,9	33,0 ± 5,3	ND
WIN-55,212-2			30,2 ± 3,1	16,1 ± 6,0	ND

D'après le tableau 12, 15 composés possèdent une affinité pour le récepteur CB₂ de l'ordre du nanomolaire (composés **V1**, **V5**, **V7 – 10**, **49 – 53**, **V16 – V18**, **58**). Parmi ces composés, le composé **50** présente même une affinité pour le récepteur CB₂ de 9 nM.

Nous pouvons observer que les composés avec un noyau phényle nu en position C-5 (**V2 – V4**) ne donnent aucune affinité pour le récepteur CB₂, ce qui est également le cas avec une chaîne pentyle en C-5 (**V1**). Une affinité pour CB₂ est observée pour les composés possédant un noyau phényle en position C-5 substitué en *ortho* par les chaînes *O*-méthyle (**V5**), *O*-propyle (**V7**), *O*-butyle (**V8**), *O*-pentyle (**V9**) et *O*-hexyle (**V10**), mais pas pour le composé **V6** possédant une chaîne éthyle en position *ortho*. La chaîne éthyle greffée sur le composé **V6** semble trop courte pour donner l'affinité pour CB₂ au composé. Aussi, l'activité du composé **V5**, avec une chaîne *O*-méthyle sur le noyau phényle en position C-5, pourrait s'expliquer par une rotation à 180° de la liaison phényle-isoxazole. Comme présenté sur la figure 148, la chaîne *O*-pentyle du composé **50** est placée dans une large poche hydrophobe proche de la cystéine 288. La chaîne *O*-méthyle pourrait se placer à l'opposé dans une autre poche, ce qui expliquerait cette affinité.

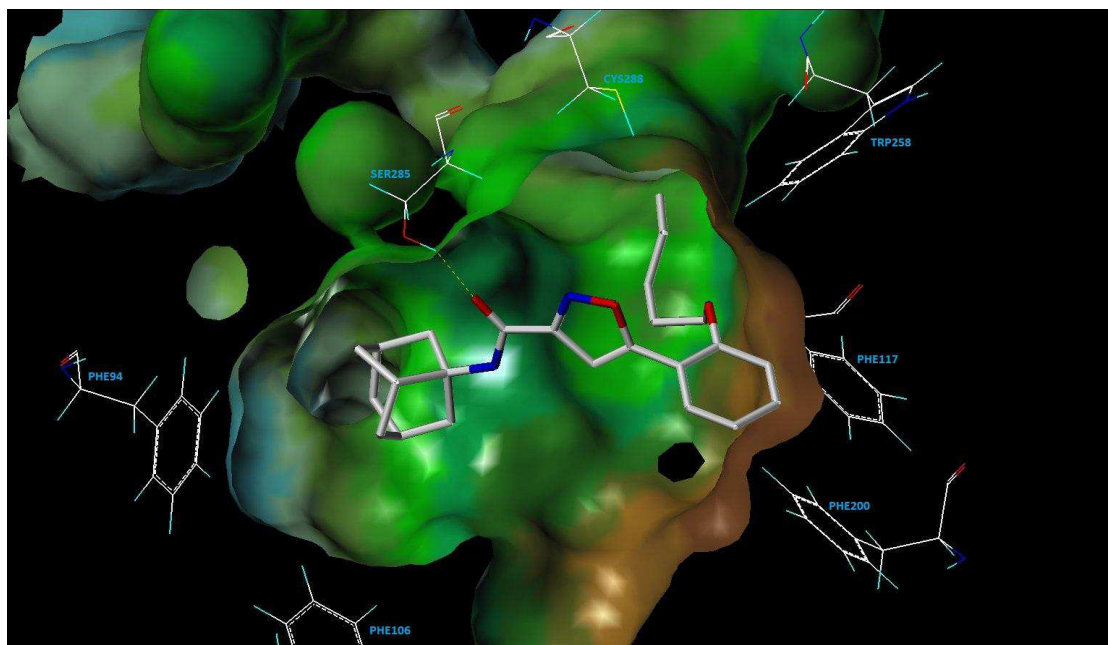


Figure 148. « Docking » du composé **50** dans un modèle activé du récepteur CB₂

Ces observations montrent que la chaîne *O*-alkyle sur le noyau phényle en position C-5 est essentielle à l'affinité pour le récepteur CB₂.

De plus, d'après les résultats obtenus pour les composés **V5** à **V12**, cette chaîne *O*-alkyle doit avoir une longueur comprise entre 5 et 6 atomes de carbone pour présenter la meilleure affinité possible.

Parmi les trois isomères de position portant la chaîne *O*-pentyle sur le noyau phényle, les composés **V13** (en position *meta*) et **V14** (en position *para*) n'ont pas montré d'affinité pour le récepteur CB₂, contrairement au composé **V9** (en position *ortho*) qui possède un K_i d'une valeur de 36 nM. Ainsi, nous pouvons conclure que la chaîne *O*-alkyle essentielle à l'affinité pour CB₂ doit être positionnée en *ortho* du phényle en position C-5.

Les substituants de la fonction carboxamide ont également été modulés. Ainsi, les composés substitués par des groupements aromatiques (composés **54** – **57**) ou le cyclopropyle (composé **V15**) sur la fonction amide n'ont pas présenté d'affinité pour le récepteur CB₂, contrairement aux autres cycles saturés (composés **51** – **53** et **V16** – **V18**) qui ont montré des affinités variant de 23 nM à 600 nM.

Ensuite, des modifications du groupement 1-adamantyle initial ont également été effectuées. Le composé **V9** avec ce groupement 1-adamantyle a présenté une affinité pour le récepteur de 36 nM. Le composé **49**, substitué par le groupement 2-adamantyle sur la fonction amide, et le composé **50**, substitué par le groupement 3-noradamantane, possèdent respectivement une affinité de 60 nM et 9 nM. Aux regards des résultats, un cycle saturé (à l'exception du groupement cyclopropane) substitué sur la fonction carboxamide améliore l'affinité vis-à-vis du récepteur, notamment lorsque ce cycle saturé est un dérivé de l'adamantane (**V9**, **49** et **50**) ou le cyclohexane (**V17**).

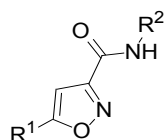
Enfin, les affinités pour le récepteur CB₁ des 13 composés, ayant montré les meilleures affinités vis-à-vis du récepteur CB₂, ont été évaluées (composé **V5**, **V7** – **V10**, **49** – **53**, **V16** – **V17**, **58**). Les résultats sont regroupés dans le même tableau 12.

Parmi ces 13 composés, seul le composé **58** présente une affinité pour CB₁ avec un K_i de 33 nM.

Les 12 autres composés ont montré une sélectivité pour le récepteur aux cannabinoïdes CB₂ vs CB₁.

2. *Activité fonctionnelle des composés vis-à-vis des récepteurs CB₁ et CB₂*

Tableau 13. Activité fonctionnelle des 11 composés les plus affins et sélectifs pour le récepteur CB₂



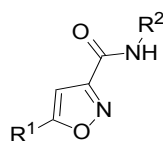
Nom	R ¹	R ²	[³⁵ S]-GTPγS(hCB ₂)	
			CE ₅₀ (nM)	E _{max} (%)
V7			2,21 ± 0,3	144
V8			2,88 ± 0,3	147
V9			2,9 ± 0,3	151
V10			3,4 ± 0,3	157
49			14,8 ± 3,8	270
50			4,8 ± 0,3	234
51			4,4 ± 0,4	184
V16			2,1 ± 0,3	160
V17			1,9 ± 0,3	161
52			11,1 ± 3,4	233
53			1,8 ± 0,3	167
WIN-55,212-2			2,04 ± 0,3	243

La fonctionnalité des 11 composés (composés **V7 – V10, 49 – 53, V16 – V17**) qui se sont révélés affins et sélectifs pour le récepteur CB₂ a été évaluée.

Nous observons que les Emax des composés sont largement supérieures à 100 % (cf. tableau 13) et que les CE₅₀ sont toutes de l'ordre du nanomolaire avec des valeurs variant de 1,8 nM (**53**) à 14,8 nM (**49**). À partir de ces résultats, nous pouvons conclure que ces 11 meilleurs composés, sélectifs pour le récepteur CB₂, sont agonistes de celui-ci.

3. Activité cytotoxique des composés

Tableau 14. Activités cytotoxiques des composés finaux vis-à-vis de cellules HT29



Nom	R ¹	R ²	Cytotoxicité (HT29) à 10µM (%)
V7			8
V8			2
V9			0
V10			17
49			0
50			20
51			46
V16			13
V17			37
52			34
53			17

D'après les résultats (cf. tableau 14), nous constatons que la cytotoxicité de nos 11 meilleurs composés (composés **V7 – V10, 49 – 53, V16 – V17**), évaluée sur la lignée cellulaire HT29, varie de 0 % à 46 % et que seulement 3 composés dépassent les 30 % d'inhibition de la prolifération cellulaire.

Ainsi, nous pouvons affirmer que ces composés de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole sont non-cytotoxiques sur la lignée HT29 d'adénocarcinomes coliques humains. Cependant même si le test de cytotoxicité sur cellules HT29 nous donne une estimation de la toxicité de nos molécules, un test de toxicité sur cellules saines devrait être effectué puisque ces composés ont pour but final de traiter majoritairement des patients atteints de la maladie de Crohn et de la RCH et non du cancer colorectal.

4. Stabilité des composés en présence de microsomes hépatiques

Lors de l'administration par voie orale, un médicament est rapidement assimilé au niveau du foie pour être métabolisé, ce qui diminue fortement son action. Considérant leur bonne affinité pour le récepteur CB₂, leur sélectivité *versus* CB₁ et leur caractère agoniste, les composés **50** et **52** ont été sélectionnés pour une étude de stabilité métabolique.

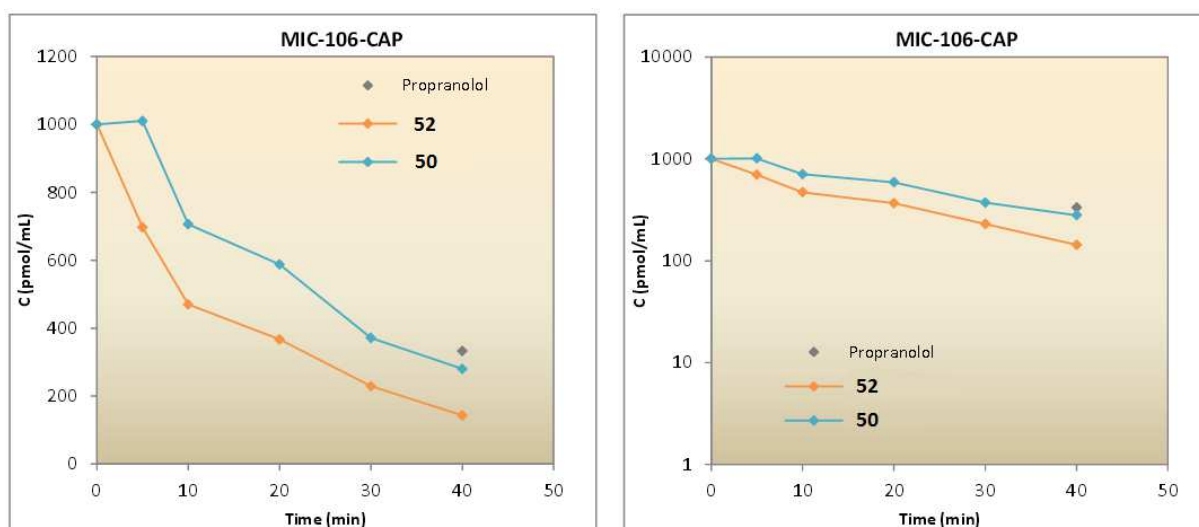


Figure 149. Etude de la stabilité des composés **50** et **52** en milieu hépatique

La figure 149 montre que les composés **50** et **52** sont fortement métabolisés durant les 10 premières minutes. La dégradation des composés tend ensuite à se stabiliser et au bout de 40 min, 28 % de la dose initiale du composé **50** et 14 % de la dose initiale du composé **52** sont encore disponibles. Le propranolol, composé de référence, est métabolisé à hauteur de 67 % au bout de 40 min.

Sur la base de ces graphiques (cf. figure 149), la clairance intrinsèque des composés a été calculée. Ainsi, 104 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ du composé **50** et 173 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ du composé **52** sont éliminés en une minute par 1 mg de protéine microsomale. L'intervalle « normal » de la clairance se situe entre 20 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ et 120 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$. La dégradation du composé **50** est donc considérée comme normale. Contrairement au composé **50**, le composé **52**, dont sa clairance intrinsèque est largement au-dessus de l'intervalle « normal » de clairance, se dégrade beaucoup plus rapidement que la normale.

Les temps de demi-vie des composés **50** et **52** ont également été calculés. Le temps de demi-vie du composé **50** est alors de 21 min et celui du composé **52** de 15 min. Afin de valider l'expérience, l'instabilité non-due aux microsomes hépatiques a été calculée. Ainsi, l'instabilité non-due aux microsomes hépatiques du composé **50** est de 9,9 % et celle du composé **52** de -8 %. Ces valeurs signifient que la dégradation de nos composés est uniquement due aux microsomes hépatiques, puisqu'en leur absence, environ 90 % de la dose initiale du composé **50** et 108% de la dose initiale du composé **52** sont encore disponibles au bout de 40 min.

Les données de stabilité hépatique des composés **50** et **52** sont plus ou moins encourageantes. En effet, les composés sont fortement métabolisés au niveau hépatique et leurs temps de demi-vie restent très courts, même si le composé **50** semble plus stable que le composé **52**.

5. *Activité anti-inflammatoire in vivo des composés 50 et 52*

a. *Evolution de la masse corporelle des souris*

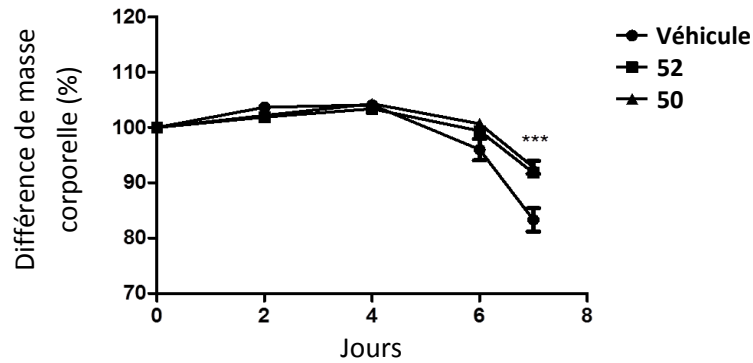


Figure 150. Evolution de la perte de poids des souris

La perte de poids traduit l'état général des animaux. Aussi, nous pouvons voir qu'à partir du 5^{ème} jour d'administration IP du DSS, le poids commence à chuter. Cela signifie que la colite induite au DSS est installée chez les souris.

Comme nous pouvons l'observer sur la figure 150, les courbes de poids des souris ayant reçu le composé **50** ou le composé **52** sont presque identiques et nettement supérieures à la courbe de poids du groupe de souris témoin. En effet, au jour 7, les souris traitées par les composés **50**, **52** ou le véhicule seul, ont montré un poids (relatif au poids mesuré au jour 0) de respectivement $92,8 \pm 1,2 \%$, $91,8 \pm 2,2 \%$ et $83,1 \pm 2,2 \%$. Ainsi, les composés **50** et **52** préviennent la perte de poids de manière significative.

b. Evaluation des dégâts coliques et effet protecteur des composés **50** et **52**

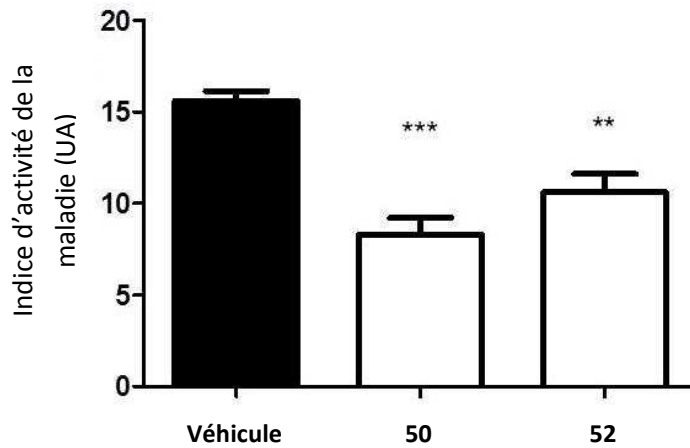


Figure 151. Indices d'activité de la maladie des souris

L'indice d'activité de la maladie (DAI) est calculé selon 3 critères : la perte de poids, la consistance des selles et la présence ou non de sang dans les selles (*cf.* tableau 16 page 263). A partir des DAI indiqués dans la figure 151, nous pouvons remarquer que les souris ayant reçu les composés **50** ou **52** possèdent un DAI significativement plus bas (**50** : $8,3 \pm 0,9$, $p = 0,0004$ et **52** : $10,6 \pm 1,0$, $p = 0,001$, *cf.* figure 151) que les souris n'ayant reçu que les cyclodextrines avec le DSS (véhicule : $15,6 \pm 0,5$). Un autre indicateur de la maladie mesuré est la longueur du côlon des souris, car une colite induite par le DSS entraîne majoritairement un raccourcissement du côlon.

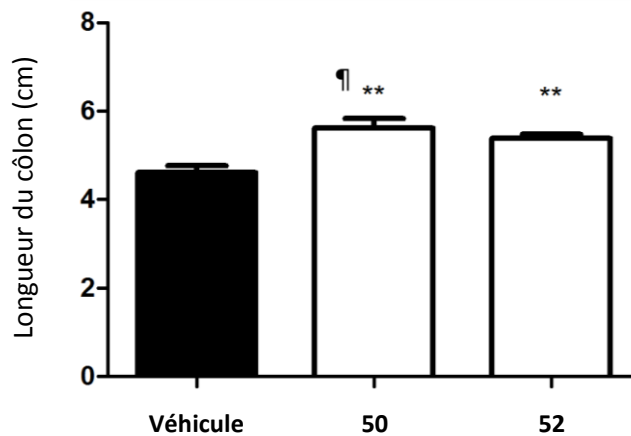


Figure 152. Longueur du côlon des souris

Après sacrifice des souris le jour 7, le côlon est mesuré. Nous avons alors pu observer que les souris traitées avec les composés **50** et **52** présentent un côlon significativement plus long que les souris témoin (véhicule : $4,6 \pm 0,2$ cm ; **50** : $5,6 \pm 0,2$ cm, $p = 0,003$; **52** : $5,4 \pm 0,1$ cm, $p = 0,002$; cf. figure 152).

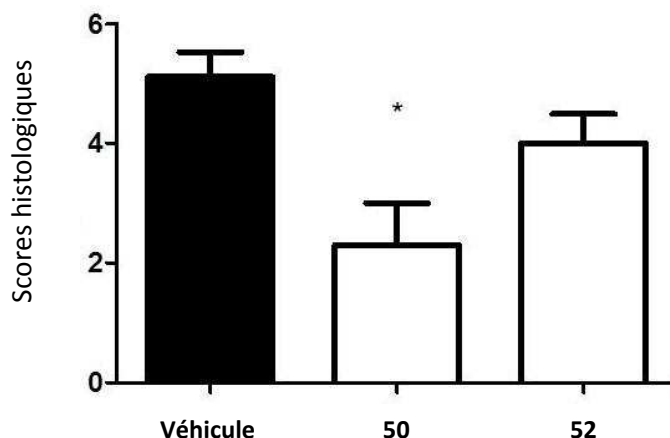


Figure 153. Scores histologiques des souris

De plus, les dommages histologiques du côlon des souris traitées par le véhicule seul, les composés **50** et **52** ont été évalués. Pour cela, un échantillon du côlon localisé précisément 2 cm au-dessus du canal anal est utilisé et évalué selon les critères d'Ameho (scores microscopiques).⁴¹⁸ Le score histologique, de 0 à 6, prend en compte le degré d'inflammation, l'érosion et l'ulcération du côlon, la nécrose ainsi que la profondeur et la surface d'extension des lésions.

De manière analogue à ce qui a pu être observé pour les DAI, les souris n'ayant reçu que le DSS présentent une ulcération colique importante ($5,1 \pm 0,4$, cf. figures 153 et 154). En revanche, celles qui ont été traitées avec le composé **50** ou le composé **52** présentent une diminution significative du score histologique (**50** : $2,3 \pm 0,7$, $p = 0,01$, cf. figures 153 et 154; **52** : $4,0 \pm 0,5$, ns, cf. figures 153 et 154). Ces résultats confirment l'effet protecteur des composés **50** et **52** sur l'inflammation et l'ulcération du côlon.

⁴¹⁸ Ameho, C. K.; Adjei, A. A.; Harrison, E. K.; Takeshita, K.; Morioka, T.; Arakaki, Y.; Ito, E.; Suzuki, I.; Kulkarni, A. D.; Kawajiri, A.; Yamamoto, S. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* **1997**, *41*, 487 - 493.

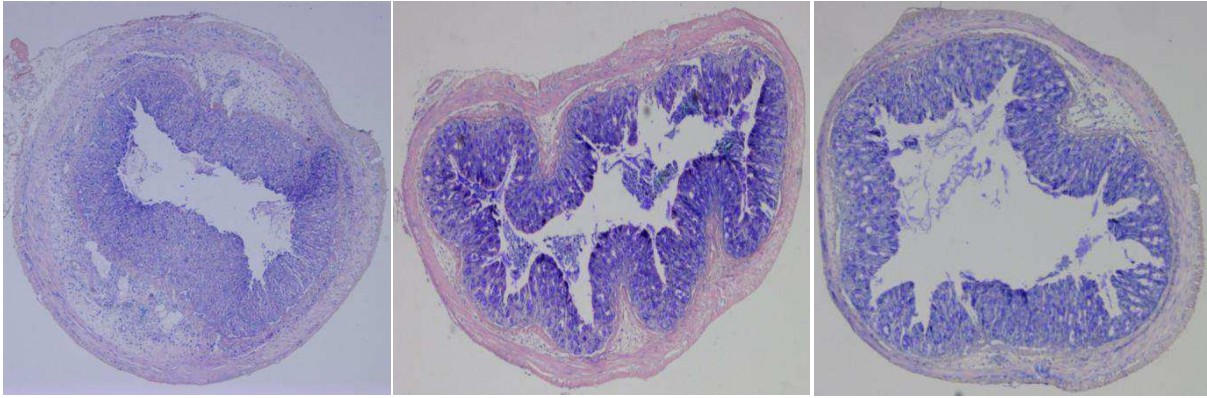
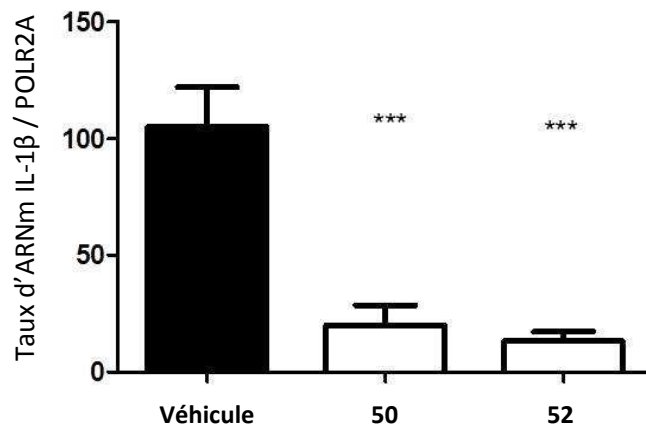
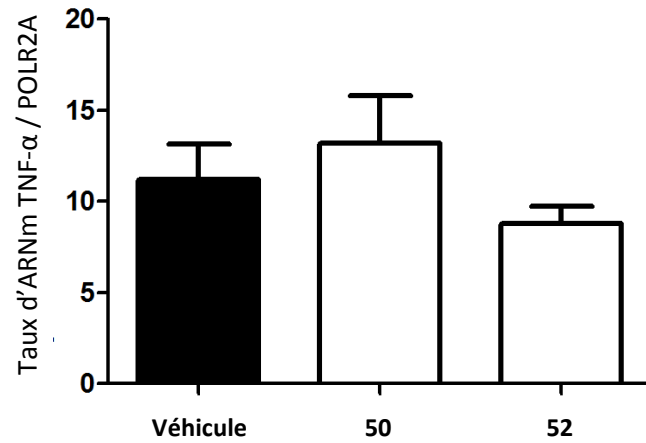


Figure 154. Côlons de souris traitées par le véhicule seul (à gauche), par le composé **50** (au centre) et par le composé **52** (à droite)

c. Quantification des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et Kc



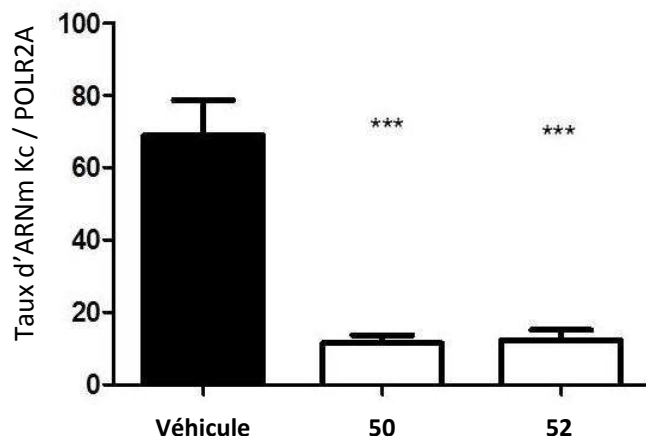


Figure 155. Quantification des ARNm codant pour TNF- α , l'IL-1 β et Kc dans les côlons de souris

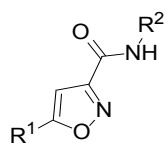
L'effet anti-inflammatoire des composés **50** et **52** a été vérifié par la quantification des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , l'IL-1 β et la chemokine ligand 1 (Kc) par réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps-réel.

Les souris traitées par les composés **50** et **52** n'ont montré aucun effet significatif sur le taux d'ARNm de TNF- α (cf. figure 155). Le niveau d'expression de la protéine IL-1 β a cependant été fortement diminué chez les souris traitées par les composés **50** et **52** (véhicule: $105,1 \pm 17,0$; **50**: $19,9 \pm 8,7$, $p = 0,0003$; **52**: $13,2 \pm 4,2$, $p < 0,0001$, cf. figure 155). Chez ces mêmes souris, le niveau d'expression de Kc a également été fortement réduit (véhicule: $68,9 \pm 9,8$, **50**: $11,5 \pm 2,2$, $p < 0,0001$; **52**: $12,3 \pm 2,8$, $p < 0,0001$, cf. figure 155). Ces résultats pris tous ensemble, démontrent que les composés **50** et **52** inhibent le développement des colites induites au DSS chez les souris.⁴¹⁹

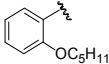

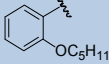

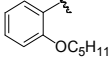

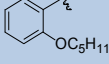

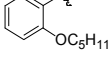

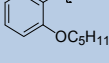

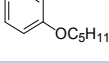

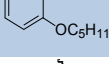

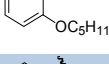

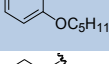

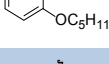

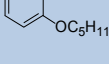

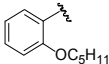
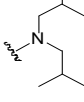
⁴¹⁹ Tourteau, A.; Andrzejak, V.; Body-Malapel, M.; Lemaire, L.; Lemoine, A.; Mansouri, R.; Djouina, M.; Renault, N.; El Bakali, J.; Desreumaux, P.; Muccioli, G. G.; Lambert, D. M.; Chavatte, P.; Rigo, B.; Leleu-Chavain, N.; Millet, R. 3-Carboxamido-5-aryl-isoxazoles as new CB2 agonists for the treatment of colitis. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5383 - 5394.

6. *Activité inhibitrice des composés vis-à-vis de la FAAH*

Tableau 15. Activités inhibitrices des composés **V1** à **V18**, **49** à **58** vis-à-vis de la FAAH



Nom	R ¹	R ²	FAAH CI ₅₀ (μM)
V1			1,68
V2			0,459
V3			4,0
V4			>10
V5			0,912
V6			>10
V7			>10
V8			>10
V9			>10
V10			>10
V11			>10
V12			>10
V13			0,063
V14			0,008
49			>10

Nom	R ¹	R ²	FAAH CI ₅₀ (μM)
50			>10
V15			>10
51			>10
V16			>10
V17			>10
V18			>10
52			5,43
53			2,33
54			>10
55			>10
56			>10
57			>10
58			ND
URB597			0,015

Il a été démontré, dans les MICI, que l'effet anti-inflammatoire dû à l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes est amplifié par les inhibiteurs de la FAAH, qui préviennent la dégradation de l'anandamide.⁴²⁰ Compte-tenu de cette observation et basé sur le fait que les composés de la série C sont conçus à partir d'inhibiteur de la FAAH, nous avons décidé d'évaluer la capacité à inhiber la FAAH de nos composés de la série C.

⁴²⁰ Kunos, G.; Pacher, P.; Cannabinoids cool the intestine. *Nature Medecine* **2004**, *10*, 678 - 679.

L'évaluation de nos 28 composés finaux a révélé que contrairement à ce que nous attendions, la grande majorité des composés ne présente aucune activité inhibitrice envers la FAAH. En effet, d'après le tableau 15, seulement 8 composés (**V1** à **V3**, **V5**, **V13**, **V14**, **52** et **53**) possèdent une CI_{50} inférieure à 10 μ M.

Parmi ces 8 composés, les composés **V13** et **V14**, portant respectivement une chaîne *O*-pentyle en *meta* et *para* du phényle en position C-5, ont montré les meilleures activités inhibitrices de la FAAH avec des K_i de 63 nM et 8 nM. Le composé **V9** avec une chaîne *O*-pentyle en *ortho* du phényle en position C-5 ne présente quant à lui aucune activité inhibitrice vis-à-vis de la FAAH.

Contrairement aux résultats obtenus lors de l'évaluation de l'affinité des composés pour le récepteur CB_2 , la chaîne *O*-pentyle en position *meta* et *para* et non en position *ortho* du phényle en position C-5 est favorable à l'activité inhibitrice de la FAAH.

Par ailleurs, les composés **V2** et **V3**, qui ne possèdent pas d'affinité pour le récepteur CB_2 , présentent une faible activité inhibitrice de la FAAH. Nous pouvons observer que le composé **V2**, avec un groupement 1-adamantyle sur la fonction carboxamide, présente une activité inhibitrice 10 fois supérieure au composé **V3** avec un groupement 2-adamantyle sur la fonction carboxamide. De plus, lorsque le groupement 1-adamantyle est remplacé par un groupement 1-methyladamantyle (composé **V4**), l'activité inhibitrice de la FAAH est perdue.

Enfin, 3 composés agonistes sélectifs du récepteur CB_2 (**V5**, **52** et **53**) inhibent la FAAH à des concentrations modérées (**V5** : CI_{50} = 0,912 μ M ; **52** : CI_{50} = 5,43 μ M ; **53** : CI_{50} = 2,33 μ M). Le composé **V5**, avec un groupement *O*-méthyle sur le phényle, possède une CI_{50} de 0,912 μ M pour la FAAH et un K_i de 70,1 nM pour CB_2 .

CONCLUSION ET PERSPECTIVES



L'objectif de ce travail était de synthétiser de nouveaux inhibiteurs de la FAAH ainsi que de nouveaux agonistes sélectifs du récepteur CB₂, afin de développer de nouvelles séries de composés originaux, d'établir de nouvelles RSA mais aussi d'évaluer leur impact dans un modèle murin de colite. Pour cela, nous avons conçu et développé 2 séries de composés ciblant la FAAH : la série A autour du motif 2-benzoxazolinone et la série B autour du motif 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole ; ainsi qu'une série de composés potentiellement agonistes sélectifs du récepteur CB₂, la série C, également autour du motif 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole.

La série A est constituée de 38 composés, la moitié des composés a été synthétisée au laboratoire et l'autre moitié provient de la chimiothèque du laboratoire de chimie thérapeutique de la Faculté de Pharmacie de Lille. Sur ces 38 composés, seulement 3, les composés **10**, **C9** et **C11**, ont présenté une activité inhibitrice de la FAAH. Malgré le faible nombre de composés actifs sur l'enzyme, plusieurs RSA ont pu être établies. Ainsi, il apparaît qu'une chaîne alkyle d'une longueur au moins égale à 6 carbones substituant l'atome d'azote de la 2-benzoxazolinone soit favorable à l'inhibition de la FAAH, tout comme le groupement éther phénolique, commun aux composés **C9** et **C11**. Aussi, nous envisageons pour la suite de nos recherches de synthétiser l'analogue « 2-benzoxazolinone » de l'URB597 ainsi que d'autres nouveaux composés de type 2-benzoxazolinone où les fonctions benzamide et cyclohexyle de l'URB597 seront modulées alternativement (*cf.* figure 156). Ainsi, nous pourrions conclure sur l'intérêt de cycliser la fonction carbamate de l'URB597.

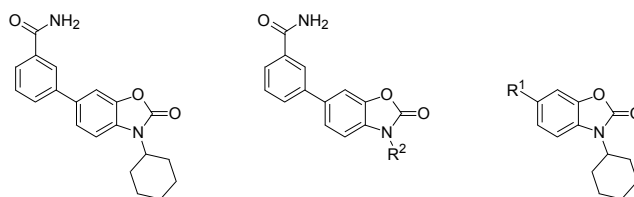


Figure 156. Analogues « 2-benzoxazolinone » de l'URB597

La série B est constituée de 7 composés finaux (**22**, **24**, **27**, **31**, **34**, **40** et **44**) provenant de la modulation de l'hétérocycle central et de la fonction carboxamide de l'**ALIAE202**. Ce dernier avait été synthétisé au laboratoire et il avait été décrit comme un inhibiteur de la FAAH réduisant l'inflammation sur modèle murin de colite induite au TNBS. Sur les 7 composés finaux de la série, 4 (**22**, **24**, **31**, et **34**) ont pu être évalués sur leur capacité à inhiber la FAAH.

Ainsi, nous avons pu établir que l'atome d'hydrogène porté par l'atome d'azote de l'amide est favorable à l'inhibition de la FAAH puisque le composé **22**, analogue *N*-méthylé de l'**ALIAE202**, présente une activité inhibitrice 37 fois plus faible que l'**ALIAE202**. De plus, en comparant le composé **24**, analogue thioamide de l'**ALIAE202**, et l'**ALIAE202**, nous avons mis en évidence que l'atome d'oxygène de la fonction carboxamide était préférable à l'atome de soufre. Par ailleurs, nous avons pu établir des liens entre la position des hétéroatomes de l'hétérocycle central de l'**ALIAE202** et l'activité inhibitrice vis-à-vis de la FAAH. Ainsi, une bonne activité inhibitrice de la FAAH est mesurée lorsque les 2 hétéroatomes sont placés en position 1 et 2 de l'hétérocycle central (composé **31** et **ALIAE202**), contrairement au composé **34**, où l'atome d'azote de l'hétérocycle se situe en position 4. Son activité est 126 fois plus faible que l'**ALIAE202** sur la FAAH. L'évaluation prochaine des 3 composés finaux de la série B restant (composés **27**, **40** et **44**) nous permettra de poursuivre les RSA et de mesurer l'importance de l'hétérocycle central et de la fonction carboxamide sur l'activité FAAH, mais également sur la biodisponibilité des composés. Ainsi, en fonction des données obtenues, nous envisageons de concevoir et synthétiser un nouveau composé « lead » de la série B. Les effets anti-inflammatoires et la stabilité de ce composé seront alors déterminés par une étude *in vivo* sur modèle murin de colite et par une étude de stabilité métabolique.

La série C correspond aux composés agonistes sélectifs du récepteur CB₂. Elle est issue de travaux antérieurs effectués au laboratoire sur des inhibiteurs de la FAAH de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole, travaux qui ont abouti à la découverte du composé **ALIAE202**. La série C est composée de 28 molécules finales (composés **V1 – V18** et **49 – 58**) de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole qui ont été évaluées pharmacologiquement *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, l'évaluation des affinités pour les récepteurs aux cannabinoïdes des composés finaux **V1 – V18** et **49 – 58**) a révélé que 15 des 28 composés possèdent une affinité pour le récepteur CB₂ (composés **V1**, **V5**, **V7 – 10**, **49 – 53**, **V16 – V18**, **58**). Pour les 13 meilleurs composés, l'affinité pour le récepteur CB₁ a également été déterminée et 12 se sont révélés être sélectifs pour le récepteur CB₂ (composés **V1**, **V5**, **V7 – 10**, **49 – 53**, **V16 – V18**). Cette sélectivité est très importante puisque l'activation du récepteur CB₁ apporte des effets psychotropes non envisageables pour le traitement des MICI.

Par ces tests, nous avons constaté qu'une chaîne alkyle de 5 à 6 carbones en position *ortho*, et seulement en position *ortho*, sur le noyau phényle permet d'obtenir la meilleure des affinités pour le récepteur CB₂. Mais également que les groupements aromatiques substitués sur la fonction amide nuisaient à l'affinité pour le récepteur CB₂ alors que les dérivés de l'adamantane (composés **V9**, **49** et **50**) ainsi que les cycles saturés de plus de 4 carbones (composés **51 – 53**, **V16 – V18**) amélioreraient l'affinité.

Les études de fonctionnalité ont permis de déterminer que les composés qui présentent la meilleure affinité pour CB₂ possèdent une activité agoniste pour ce récepteur (composés **V7 – V10**, **49 – 53**, **V16 – V17**). De plus, les mesures d'activité antiproliférative ont révélé une absence de cytotoxicité de ces composés sur la lignée cellulaire HT29.

Les composés **50** et **52** ont ensuite été évalués *in vivo* sur modèle murin de colite induite au DSS. En administrant les composés **50** et **52** par voie IP, lors de l'induction de la colite par le DSS, nous avons pu mettre en évidence la capacité des composés à traiter la colite. En effet, les dommages du côlon ont largement été diminués chez les souris ayant reçu les composés **50** et **52** (côlon plus long, scores histologiques et DAI moins élevés). De plus, les taux des cytokines pro-inflammatoires habituellement sécrétées en cas de colite, IL-1 β et Kc, sont beaucoup plus faibles chez les souris traitées. Le taux de TNF- α des souris n'a cependant pas été impacté par l'administration de l'un ou l'autre composé.

L'étude de la dégradation des composés **50** et **52** en milieu hépatique a également été réalisée. Cette étude a montré que le composé **50** avait une clairance correcte de 104 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ et un temps de demi-vie de 21 min alors que le composé **52** a présenté une clairance au-dessus de la normale de 173 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ et un temps de demi-vie de 15 min. Par ailleurs, après 40 min de contact avec les microsomes, respectivement 90 % et 100 % de la dose initiale des composés **50** et **52** restent disponibles. L'administration par voie orale de ces composés semble donc possible.

Compte-tenu du fait que l'effet anti-inflammatoire dû à l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes soit amplifié par les inhibiteurs de la FAAH dans les MICI, mais aussi puisque la série C provient, à l'origine, de pharmacomodulation d'inhibiteur de la FAAH, nous avons évalué les 28 composés finaux de la série C. L'évaluation de l'activité inhibitrice n'a pas révélé une forte inhibition de l'enzyme contrairement à ce que nous espérons puisque seulement 8 composés (**V1 – V3, V5, V13, V14, 52 et 53**) sur les 28 ont montré une telle activité inhibitrice. Ainsi, nous avons mis en évidence que la chaîne *O*-pentyle portée sur le noyau phényle favorise l'activité inhibitrice de la FAAH lorsque celle-ci se trouve en position *meta* ou *para* (composés **V13** et **V14**) et non en position *ortho* (**V9**). La comparaison des composés **V2** et **V3** nous informe également sur le fait que le groupement 1-adamantyle (**V2**) fixé sur la fonction carboxamide est favorable à l'activité inhibitrice de l'enzyme par rapport au groupement 2-adamantyle (**V3**) ou 1-méthyladamantyle (**V4**).

Il apparaît que les composés **V5, 52 et 53** ont montré à la fois une faible inhibition de la FAAH et un caractère agoniste sélectif du récepteur CB₂. Ainsi, étant donné la forte analogie structurale des composés **V13** et **V14** (inhibiteurs FAAH) avec le composé **V9** (agoniste CB₂), il nous apparaît que la conception de composés mixtes « inhibiteurs FAAH / agonistes sélectifs CB₂ » soit envisageable (cf. figure 157).

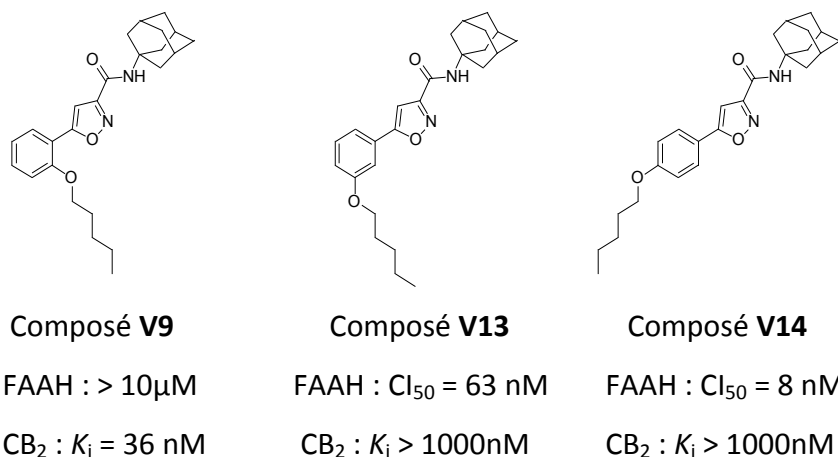


Figure 157. Structure des isomères **V9, V13** et **V14**

Ainsi, à partir des résultats ci-dessus, nous envisageons la conception d'un composé mixte « inhibiteur FAAH / agoniste sélectif CB₂ » possédant deux chaînes *O*-alkyles.

Ces chaînes devraient être en position *ortho* pour garder l'affinité avec le récepteur CB₂ ainsi qu'en position *para* pour conserver l'activité inhibitrice vis-à-vis de la FAAH (cf. figure 158). Ces chaînes ne pourront cependant pas être trop longues car une chaîne *O*-alkyle trop longue en position *para* semble défavorable à l'affinité pour le récepteur CB₂ (cf. figure 148).

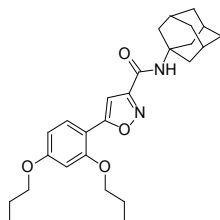


Figure 158. Structure d'un composé potentiellement mixte « inhibiteur FAAH / agoniste sélectif CB₂ »

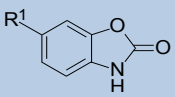
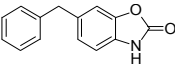
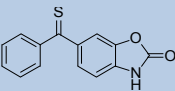
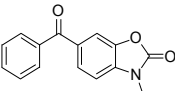
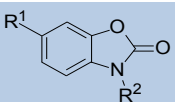
Ainsi, une nouvelle série de composés basés sur la mixité potentielle des composés sera développée. Cette série constituerait une nouvelle série originale à grand potentiel thérapeutique pour le traitement des MICI.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

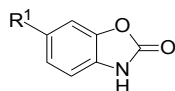


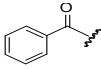
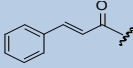
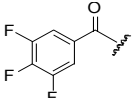
Tous les réactifs et les solvants ont été utilisés sans purification préalable. Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques « Polygram Sil G/UV254 (Macherey-Nagel®) »; les composés ont été détectés sous UV (254 and 366 nm). Le Silica gel 60 230-400 mesh (Merck®) a été utilisé pour les chromatographies sur colonne. Les chromatographies sur couche épaisse ont été effectuées sur « pre-coated TLC-plates SIL G-200 UV₂₅₄ (Macherey-Nagel®) »; les composés ont été extraits de la silice en utilisant un mélange dichlorométhane / méthanol (9 : 1, v / v). Tous les points de fusion ont été déterminés avec un appareil à capillaire Büchi 535® sans correction. Les spectres RMN ¹H, ¹³C et ¹⁹F ont été réalisés sur un spectromètre Brücker® 300 MHz ou sur un spectromètre Varian® 400 MHz. Les déplacements (δ) sont exprimés en ppm relatif au tétraméthylsilane utilisé comme standard interne, les constantes de couplage *J* sont en Hz, et les pics sont désignés selon : s, singulet ; br. s, singulet large ; d, doublet ; t, triplet ; q, quadruplet ; quint, quintuplet ; m, multiplet. Tous les composés ont été analysés par HPLC-MS sur une HPLC combinée à une « Surveyor MSQ (Thermo Electron®) » équipée avec une source APCI. La masse des composés **22**, **24**, **27**, **31**, **34**, **40**, **44**, **49**, **50** et **52** a été obtenue par une HRMS avec « Q Exactive Benchtop LC-MS/MS (Thermo Scientific®) ». Tous les composés testés ont montré une pureté supérieure à 96 % en mode APCI⁺.

I. Synthèse des composés de type 2-benzoxazolinone **1** à **21** –
Série A

Nom	Structures	Page
1 – 3		198 - 201
5		202
7		203
8		204
9 – 21		205 - 218

Synthèse des composés 1 à 3

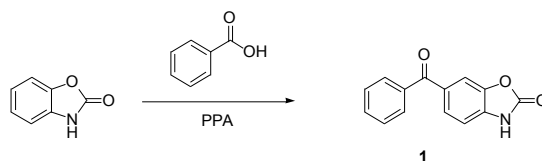


Nom	R ¹	Page
1		199
2		200
3		201

Protocole général de synthèse n°1

Une fois le PPA à 90°C, la benzoxazolinone est ajoutée. Après solubilisation de la benzoxazolinone, l'acide correspondant est ajouté et la solution est chauffée à 130°C pendant 4 heures sous agitation mécanique. Ensuite, la solution est hydrolysée dans de l'eau glacée. Le précipité formé est filtré et lavé avec de l'eau jusqu'à neutralité des eaux de lavage. Le produit désiré est alors recristallisé dans de l'éthanol absolu.

6-Benzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (1)



Réactifs et solvant :

Acide benzoïque	122,12 g.mol ⁻¹	44,4 mmol	5,42 g	2 eq
Benzoxazolinone	135,12 g.mol ⁻¹	22,2 mmol	3,00 g	1 eq
Acide polyphosphorique			40,82 g	

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°1 page 198

Formule brute : C₁₄H₉NO₃

Masse molaire : 239,23 g.mol⁻¹

Rendement : 78 %

Aspect : solide beige

R_f (AcOEt/*n*-heptane 5/5) : 0,34

P_f : 168°C

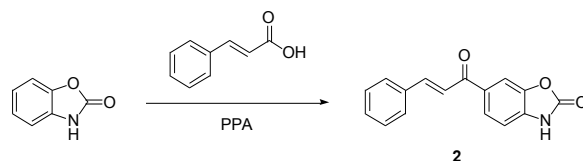
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.94 (br. s, 1H), 7.78 – 7.72 (m, 4H), 7.62 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 195.0 (C), 154.9 (C), 143.5 (C), 137.7 (C), 134.7 (C), 132.2 (CH), 131.4 (C), 129.5 (2CH), 128.3 (2CH), 127.3 (CH), 110.9 (CH), 109.1 (CH).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 240,1 (MH⁺).

6-[(E)-3-Phényl-2-propenoyl]-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (2)



Réactifs et solvant :

Acide <i>trans</i>-cinnamique	148,16 g.mol ⁻¹	44,4 mmol	6,58 g	2 eq
Benzoxazolinone	135,12 g.mol ⁻¹	22,2 mmol	3,00 g	1 eq
Acide polyphosphorique			40,32 g	

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°1 page 198

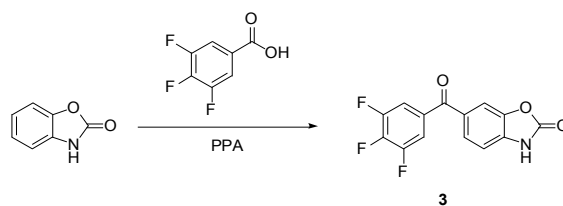
Formule brute : C₁₆H₁₁NO₃ **Masse molaire :** 265,27 g.mol⁻¹ **Rendement :** 75 %
Aspect : solide beige **R_f** (AcOEt/*n*-heptane 5/5) : 0,38 **P_f** : >210°C
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 10.92 (br. s, 1H), 7.87 – 7.83 (m, 3H), 7.66 (m, 2H), 7.52 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.43 (m, 3H), 6.76 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 188.2 (C), 154.3 (C), 145.0 (CH), 142.5 (C), 137.2 (C), 134.8 (C), 133.0 (C), 131.3 (CH), 128.9 (2CH), 128.5 (2CH), 127.2 (CH), 121.2 (CH), 110.1 (CH), 107.8 (CH).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 265,1 (MH⁺).

6-(3,4,5-Trifluorobenzoyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (3)



Réactifs et solvant :

Acide 3,4,5-trifluorobenzoïque	176,10 g.mol ⁻¹	28,4 mmol	5,0 g	2 eq
Benzoxazolinone	135,12 g.mol ⁻¹	14,2 mmol	1,92 g	1 eq
Acide polyphosphorique			43,00 g	

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°1 page 198

Formule brute : C₁₄H₆F₃NO₃ **Masse molaire :** 293,20 g.mol⁻¹ **Rendement :** 5 %
Aspect : solide blanc **Rf (AcOEt/n-heptane 5/5) :** 0,35 **Pf :** >210°C
Recristallisation : éthanol absolu

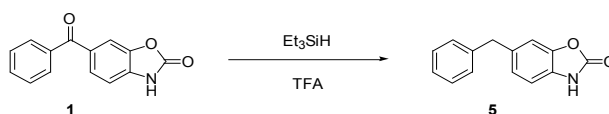
¹H NMR (300 MHz, DMSO-D6) δ (ppm) 12.17 (br. s, 1H), 7.65 (m, 4H), 7.24 (d, J = 8.2 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 191.7 (C), 154.7 (C), 151.3 (ddd, J = 3.1, 10.1, 253.2 Hz, 2CF), 142.8 (dt, J = 15.6, 31.2, 261.0 Hz, CF), 143.1 (C), 135.8 (C), 134.3 (dd, J = 5.3, 10.3 Hz, C), 130.6 (C), 126.1 (CH), 114.9 (dd, J = 6.2, 15.4 Hz, 2CH), 111.3 (CH), 108.3 (CH).

¹⁹F NMR (376 MHz, Acetone-D6) δ (ppm) - 135.11 (bdd, J = 8.2, 19.8 Hz, 2F), - 157.57 (ddt, J = 6.8, 13.6, 19.8 Hz, 1F).

LC-MS (APCI⁺) m/z 294,0 (MH⁺).

6-Benzyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (5)



Réactifs et solvant :

Composé 1	239,23 g.mol ⁻¹	4,18 mmol	1,00 g	1 eq
Triéthylsilane	116,28 g.mol ⁻¹	9,20 mmol	1,50 mL	2,2 eq
Acide trifluoroacétique			25 mL	solvant

Protocole :

Le composé **1** et le triéthylsilane sont mélangés dans 25 mL d'acide trifluoroacétique. La solution est agitée à température ambiante pendant 49 heures. Le mélange est ensuite hydrolysé dans de l'eau glacée et 30 mL de cyclohexane y sont ajoutés. Le précipité formé est alors filtré et lavé au cyclohexane. Le produit désiré est recristallisé dans le cyclohexane.

Formule brute : C₁₄H₁₁NO₂ **Masse molaire :** 225,25 g.mol⁻¹ **Rendement :** 67 %

Aspect : solide blanc **Rf :** aucune tâche visible à 256 ni à 364 nm

Recristallisation : cyclohexane **Pf :** 151°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 11.50 (br. s, 1H), 7.30 – 7.15 (m, 6H), 6.99 (s, 2H), 3.93 (s, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 155.7 (C), 144.2 (C), 140.6 (C), 136.5 (C), 128.8 (2CH), 128.6 (2CH), 127.4 (C), 126.4 (CH), 124.6 (CH), 110.8 (CH), 109.7 (CH), 41.8 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) m/z 226,1 (MH⁺).

6-Thiobenzoyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (7)



Réactifs et solvant :

Composé 1	239,23 g.mol ⁻¹	4,18 mmol	1,00 g	1 eq
Pentasulfure de phosphore	444,48 g.mol ⁻¹	1,25 mmol	0,56 g	0,3 eq
HMDO	162,38 g.mol ⁻¹	10,45 mmol	2,22 mL	2,5 eq
Toluène			15 mL	solvant

Protocole :

Après solubilisation du composé **1** dans le toluène, le mélange est chauffé à 90°C. Ensuite, le pentasulfure de phosphore et l'hexaméthylidisiloxane (HMDO) sont ajoutés et le mélange est chauffé à reflux pendant 2 heures. Un précipité bleu foncé est alors filtré et recristallisé dans l'acétonitrile.

Formule brute : C₁₄H₉NO₂S

Masse molaire : 255,30 g.mol⁻¹

Rendement : 90 %

Aspect : solide bleu

R_f (AcOEt/*n*-heptane 5/5) : 0,49

P_f : >210°C

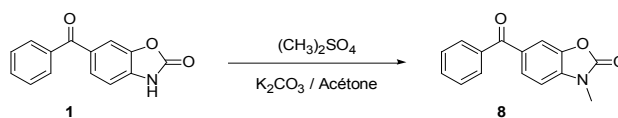
Recristallisation : acétonitrile

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 12.17 (br. s, 1H), 7.66 – 7.56 (m, 4H), 7.53 – 7.45 (m, 3H), 7.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 235.3 (C), 154.3 (C), 147.3 (C), 143.3 (C), 140.7 (C), 135.2 (CH), 131.9 (C), 129.2 (2CH), 128.2 (2CH), 127.1 (CH), 110.6 (CH), 110.3 (CH).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 473,3 (MH⁺).

6-Benzoyl-3-méthyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (8)



Réactifs et solvant :

Composé 1	239,23 g.mol ⁻¹	4,18 mmol	1,00 g	1 eq
Sulfate de diméthyle	126,13 g.mol ⁻¹	10,5 mmol	1,00 mL	2,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	16,7 mmol	2,31 g	4 eq
Acétone			30 mL	solvant

Protocole :

Le composé **1** et le carbonate de potassium sont ajoutés dans 30 mL d'acétone. La solution est ensuite mise sous azote et le sulfate de diméthyle y est introduit. Le mélange est agité à reflux sous azote pendant 6 heures. Ensuite, la solution est neutralisée avec 5 mL de triéthylamine et concentrée à sec sous pression réduite. Finalement, le résidu est extrait au dichlorométhane. Les phases organiques sont lavées à l'eau et séchées sur MgSO₄. Le composé désiré est recristallisé dans l'éthanol absolu.

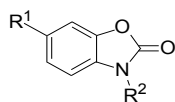
Formule brute : C₁₅H₁₁NO₃ **Masse molaire :** 253,26 g.mol⁻¹ **Rendement :** 72 %
Aspect : solide blanc **R_f** (AcOEt/*n*-heptane 5/5) : 0,48 **P_f** : 144°C
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.78 - 7.73 (m, 4H), 7.62 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.49 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 195.0 (C), 154.5 (C), 142.2 (C), 137.6 (C), 135.5 (C), 132.4 (CH), 132.2 (C), 129.8 (2CH), 128.4 (2CH), 127.5 (CH), 111.5 (CH), 107.5 (CH), 28.4 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 254,2 (MH⁺).

Synthèse des composés 9 à 21

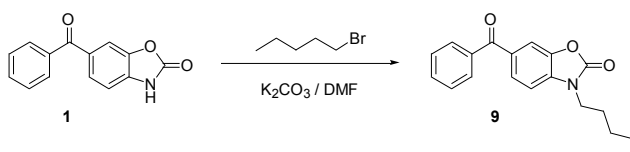


Nom	R ¹	R ²	Page	Nom	R ¹	R ²	Page
9			206	16			213
10			207	17			214
11			208	18			215
12			209	19			216
13			210	20			217
14			211	21			218
15			212				

Protocole général de synthèse n°2 :

Le composé **1** ou le composé **2**, ainsi que le carbonate de potassium, sont ajoutés à 20 mL de DMF. Une fois à 80°C, le dérivé bromé est ajouté à la solution. Ensuite, le mélange est agité à reflux pendant 4 heures. Après que la solution se soit refroidie, le carbonate de potassium est filtré et la solution est concentrée à sec sous pression réduite. Enfin, le composé désiré est recristallisé dans l'éthanol absolu.

6-Benzoyl-3-pentyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (9)



Réactifs et solvant :

Composé 1	239,23 g.mol ⁻¹	4,18 mmol	1,00 g	1 eq
1-Bromopentane	151,05 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	800 µL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	0,89 g	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

Formule brute : C₁₉H₁₉NO₃

Masse molaire : 309,37 g.mol⁻¹

Rendement : 99 %

Aspect : solide blanc

R_f (AcOEt/*n*-heptane 5/5) : 0,62

P_f : 57°C

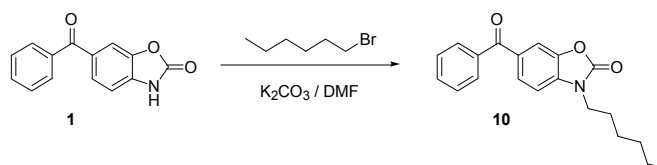
Recristallisation: éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.79 - 7.72 (m, 4H), 7.62 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.83 (quint, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.41 (m, 4H), 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 195.0 (C), 154.5 (C), 142.3 (C), 137.7 (C), 135.1 (C), 132.4 (CH), 132.1 (C), 129.8 (2CH), 128.4 (2CH), 127.4 (CH), 111.8 (CH), 107.6 (CH), 42.7 (CH₂), 28.8 (CH₂), 27.5 (CH₂), 22.2 (CH₂), 13.9 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 310,2 (MH⁺).

6-Benzoyl-3-hexyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (10)



Réactifs et solvant :

Composé 1	239,23 g.mol ⁻¹	4,18 mmol	1,00 g	1 eq
1-Bromohexane	165,08 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	880 µL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	0,87 g	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

Formule brute : C₂₀H₂₁NO₃

Masse molaire : 323,40 g.mol⁻¹

Rendement : 30 %

Aspect : solide blanc

R_f (AcOEt/n-heptane 5/5) : 0,65

P_f : 65°C

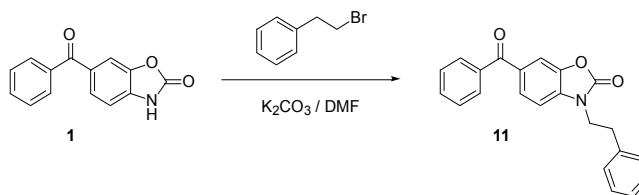
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.79 - 7.72 (m, 4H), 7.62 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.82 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.37 (m, 6H), 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 195.0 (C), 154.5 (C), 142.3 (C), 137.6 (C), 135.1 (C), 132.4 (CH), 132.1 (C), 129.8 (2CH), 128.4 (2CH), 127.4 (CH), 111.8 (CH), 107.6 (CH), 42.7 (CH₂), 31.3 (CH₂), 27.8 (CH₂), 26.3 (CH₂), 22.5 (CH₂), 14.0 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 324,2 (MH⁺).

6-Benzoyl-3-phenéthyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (11)



Réactifs et solvant :

Composé 1	239,23 g.mol ⁻¹	4,18 mmol	1,00 g	1 eq
1-Bromo-2-phényléthane	185,06 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	0,86 mL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	0,87 g	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant

Protocole:

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

Formule brute : C₂₂H₁₇NO₃

Masse molaire : 343,39 g.mol⁻¹

Rendement : 90 %

Aspect : solide blanc

R_f (AcOEt/*n*-heptane 5/5) : 0,64

P_f : 136°C

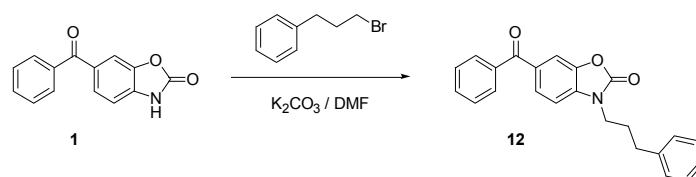
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.76 (m, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.62 (m, 2H), 7.51 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.23 (m, 3H), 6.75 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.12 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.11 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 195.0 (C), 154.3 (C), 142.1 (C), 137.6 (C), 137.2 (C), 134.9 (C), 132.4 (CH), 132.0 (C), 129.8 (2CH), 128.9 (2CH), 128.8 (2CH), 128.4 (2CH), 127.3 (CH), 127.1 (CH), 111.7 (CH), 107.5 (CH), 44.2 (CH₂), 34.1 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 344,1 (MH⁺).

6-Benzoyl-3-phénylpropyl-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (12)



Réactifs et solvant :

Composé 1	239,23 g.mol ⁻¹	4,18 mmol	1,00 g	1 eq
1-Bromo-3-phénylpropane	199,09 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	0,95 mL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	0,87 g	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

Formule brute : C₂₃H₁₉NO₃

Masse molaire : 357,41 g.mol⁻¹

Rendement : 63 %

Aspect : solide blanc

R_f (AcOEt/*n*-heptane 5/5) : 0,65

P_f : 97°C

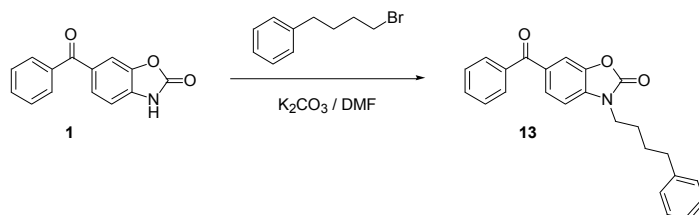
Recristallisation: éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.72 (m, 4H), 7.63 (m, 1H), 7.52 (m, 2H), 7.34-7.19 (m, 5H), 6.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.18 (quint, *J* = 7.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 195.0 (C), 154.4 (C), 142.3 (C), 140.2 (C), 137.6 (C), 134.9 (C), 132.4 (CH), 132.2 (C), 129.8 (2CH), 128.6 (2CH), 128.4 (2CH), 128.3 (2CH), 127.4 (CH), 126.4 (CH), 111.8 (CH), 107.5 (CH), 42.1 (CH₂), 32.8 (CH₂), 29.0 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 358,1 (MH⁺).

6-Benzoyl-3-(4-phénylbutyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (13)



Réactifs et solvant :

Composé 1	239,23 g.mol ⁻¹	4,18 mmol	1,00 g	1 eq
1-Bromo-4-phénylbutane	213,12 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	1,10 mL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	0,87 g	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

Formule brute : C₂₄H₂₁NO₃

Masse molaire : 371,44 g.mol⁻¹

Rendement : 90 %

Aspect : solide blanc

R_f (AcOEt/n-heptane 5/5) : 0,67

Pf : 98°C

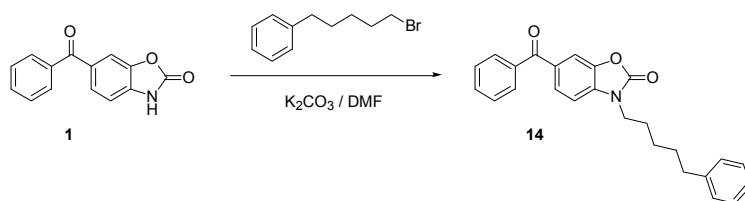
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.76 (m, 4H), 7.62 (m, 1H), 7.51 (m, 2H), 7.31 (m, 2H), 7.20 (m, 3H), 6.99 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.70 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.74 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 195.0 (C), 154.4 (C), 142.3 (C), 141.4 (C), 137.6 (C), 134.9 (C), 132.4 (CH), 132.1 (C), 129.8 (2CH), 128.4 (6CH), 127.4 (CH), 126.0 (CH), 111.7 (CH), 107.6 (CH), 42.4 (CH₂), 35.2 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.2 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 372,1 (MH⁺).

6-Benzoyl-3-(5-phénylpentyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (14)



Réactifs et solvant :

Composé 1	239,23 g.mol ⁻¹	4,18 mmol	1,00 g	1 eq
1-Bromo-5-phénylpentane	227,15 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	1,16 mL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	0,87 g	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

Formule brute : C₂₅H₂₃NO₃

Masse molaire : 385,47 g.mol⁻¹

Rendement : 97 %

Aspect : solide blanc

R_f (AcOEt/*n*-heptane 5/5) : 0,69

P_f : 64°C

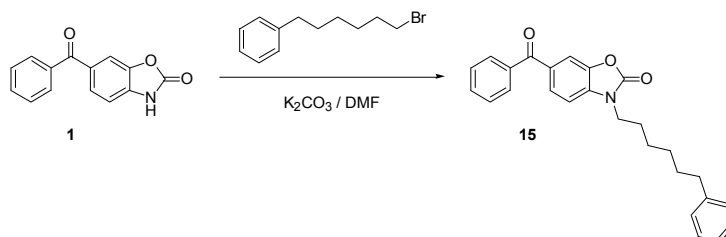
Recristallisation : cyclohexane

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.73 – 7.62 (m, 5H), 7.56 (m, 2H), 7.44 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.23 (m, 2H), 7.14 (m, 3H), 3.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.54 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.74 (quint, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.60 (quint, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.33 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 195.0 (C), 154.4 (C), 142.3 (C), 142.0 (C), 137.6 (C), 135.0 (C), 132.4 (CH), 132.1 (C), 129.8 (2CH), 128.5 (2CH), 128.4 (4CH), 127.4 (CH), 125.8 (CH), 111.8 (CH), 107.5 (CH), 42.6 (CH₂), 35.6 (CH₂), 30.8 (CH₂), 27.7 (CH₂), 26.2 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 386,1 (MH⁺).

6-Benzoyl-3-(6-phénylhexyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (15)



Réactifs et solvant :

Composé 1	239,23 g.mol ⁻¹	4,18 mmol	1,00 g	1 eq
1-Bromo-6-phénylhexane	241,17 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	1,26 mL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	6,27 mmol	0,87 g	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

Formule brute : C₂₆H₂₅NO₃

Masse molaire : 399,49 g.mol⁻¹

Rendement : 83 %

Aspect : solide blanc

R_f (AcOEt/*n*-heptane 5/5) : 0,72

P_f : 89°C

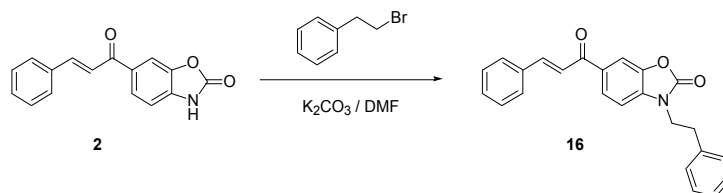
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 7.73 – 7.62 (m, 5H), 7.56 (m, 2H), 7.44 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.24 (m, 2H), 7.15 (m, 3H), 3.86 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.54 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.54 (m, 2H), 1.33 (m, 4H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 195.0 (C), 154.4 (C), 142.4 (C), 142.3 (C), 137.6 (C), 135.0 (C), 132.4 (CH), 132.1 (C), 129.8 (2CH), 128.4 (4CH), 128.3 (2CH), 127.4 (CH), 125.7 (CH), 111.8 (CH), 107.5 (CH), 42.6 (CH₂), 35.8 (CH₂), 31.2 (CH₂), 28.7 (CH₂), 27.7 (CH₂), 26.5 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 400,2 (MH⁺).

3-Phénéthyl-6-[(E)-3-phényl-2-propenoyl]-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (16)



Réactifs et solvant :

Composé 2	265,27 g.mol ⁻¹	3,77 mmol	1,00 g	1 eq
1-Bromo-2-phényléthane	185,06 g.mol ⁻¹	5,65 mmol	770 µL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	5,65 mmol	0,78 g	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

Formule brute : C₂₄H₁₉NO₃

Masse molaire : 369,43 g.mol⁻¹

Rendement : 32 %

Aspect : solide orange

R_f (AcOEt/n-heptane 5/5) : 0,58

P_f : 175°C

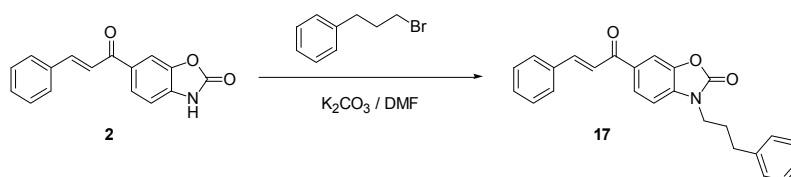
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.85 (m, 3H), 7.66 (m, 2H), 7.51 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.44 (m, 3H), 7.30 (m, 2H), 7.22 (m, 3H), 6.76 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.12 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.12 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 188.2 (C), 154.3 (C), 145.0 (CH), 142.5 (C), 137.2 (C), 135.1 (C), 134.8 (C), 133.0 (C), 130.7 (CH), 129.0 (2CH), 128.9 (2CH), 128.8 (2CH), 128.5 (2CH), 127.2 (CH), 125.4 (CH), 121.4 (CH), 110.1 (CH), 107.8 (CH), 44.3 (CH₂), 34.2 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 370,1 (MH⁺).

6-[(E)-3-Phényl-2-propenoyl]-3-(3-phénylpropyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (17)



Réactifs et solvant :

Composé 2	265,27 g.mol ⁻¹	3,77 mmol	1,00 g	1 eq
1-Bromo-3-phénylpropane	199,09 g.mol ⁻¹	5,65 mmol	860 µL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	5,65 mmol	0,78 g	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

Formule brute : C₂₅H₂₁NO₃

Masse molaire : 383,45 g.mol⁻¹

Rendement : 44 %

Aspect : solide beige

R_f (AcOEt/*n*-heptane 5/5) : 0,66

P_f : 145°C

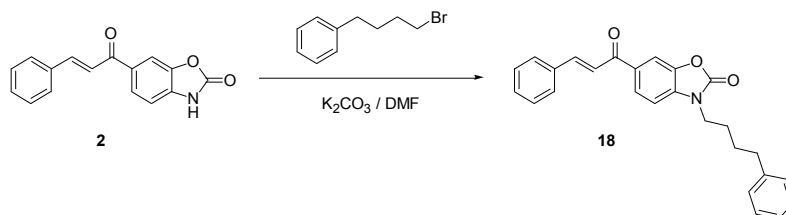
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.95 (dd, *J* = 1.5, 8.2 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.68 (m, 2H), 7.53 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.45 (m, 3H), 7.32 (m, 2H), 7.22 (m, 3H), 6.95 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.18 (quint, *J* = 7.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 188.2 (C), 154.4 (C), 145.1 (CH), 142.7 (C), 140.2 (C), 135.1 (C), 134.8 (C), 133.1 (C), 130.7 (CH), 129.0 (2CH), 128.6 (2CH), 128.5 (2CH), 128.3 (2CH), 126.4 (CH), 125.5 (CH), 121.3 (CH), 110.2 (CH), 107.8 (CH), 42.1 (CH₂), 32.8 (CH₂), 29.0 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 384,2 (MH⁺).

3-(4-Phénylbutyl)-6-[(E)-3-phényl-2-propenoyl]-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (18)



Réactifs et solvant :

Composé 2	265,27 g.mol ⁻¹	3,77 mmol	1,00 g	1 eq
1-Bromo-4-phénylbutane	213,12 g.mol ⁻¹	5,65 mmol	995 µL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	5,65 mmol	0,78 g	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

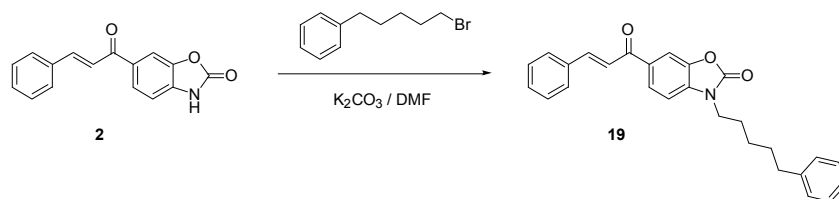
Formule brute : C₂₆H₂₃NO₃ **Masse molaire :** 397,48 g.mol⁻¹ **Rendement :** 69 %
Aspect : solide jaune **R_f (AcOEt/n-heptane 5/5) :** 0,48 **P_f :** 130°C
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.96 (dd, *J* = 1.5, 8.2 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.68 (m, 2H), 7.53 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.45 (m, 3H), 7.31 (m, 2H), 7.20 (m, 3H), 7.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.70 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.74 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 188.2 (C), 154.4 (C), 145.1 (CH), 142.7 (C), 141.4 (C), 135.2 (C), 134.8 (C), 133.1 (C), 130.7 (CH), 129.0 (2CH), 128.5 (4CH), 128.4 (2CH), 126.0 (CH), 125.5 (CH), 121.3 (CH), 110.2 (CH), 107.8 (CH), 42.5 (CH₂), 35.2 (CH₂), 28.3 (CH₂), 27.2 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) m/z 398,1 (MH⁺).

3-(5-Phénylpentyl)-6-[(E)-3-phényl-2-propenoyl]-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (19)



Reagents and starting materials :

Composé 2	265,27 g.mol ⁻¹	3,77 mmol	1,00 g	1 eq
1-Bromo-5-phénylpentane	227,15 g.mol ⁻¹	5,65 mmol	1,05 mL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	5,65 mmol	0,78 g	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

Formule brute : C₂₇H₂₅NO₃

Masse molaire : 411,51 g.mol⁻¹

Rendement : 71 %

Aspect : solide jaune

R_f (AcOEt/n-heptane 5/5) : 0,74

P_f : 136°C

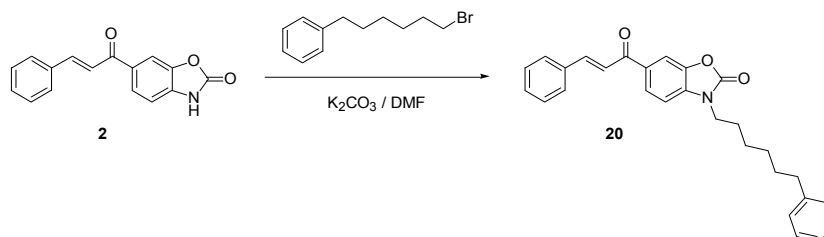
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.98 (dd, *J* = 1.5, 8.2 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.68 (m, 2H), 7.55 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.45 (m, 3H), 7.29 (m, 2H), 7.18 (m, 3H), 7.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.63 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.84 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.71 (quint, *J* = 7.9 Hz, 2H), 1.46 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 188.2 (C), 154.4 (C), 145.1 (CH), 142.7 (C), 142.0 (C), 135.2 (C), 134.8 (C), 133.1 (C), 130.7 (CH), 129.0 (2CH), 128.5 (2CH), 128.4 (4CH), 125.8 (CH), 125.5 (CH), 121.3 (CH), 110.1 (CH), 107.8 (CH), 42.6 (CH₂), 35.7 (CH₂), 30.9 (CH₂), 27.7 (CH₂), 26.2 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 412,2 (MH⁺).

3-(6-Phénylhexyl)-6-[(E)-3-phényl-2-propenoyl]-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (20)



Réactifs et solvant :

Composé 2	265,27 g.mol ⁻¹	3,77 mmol	1,00 g	1 eq
1-Bromo-6-phénylhexane	241,17 g.mol ⁻¹	5,65 mmol	1,14 mL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	5,65 mmol	0,78 g	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

Formule brute : C₂₈H₂₇NO₃

Masse molaire : 425,53 g.mol⁻¹

Rendement : 51 %

Aspect : solide jaune

Rf (AcOEt/n-heptane 5/5) : 0,49

Pf : 119°C

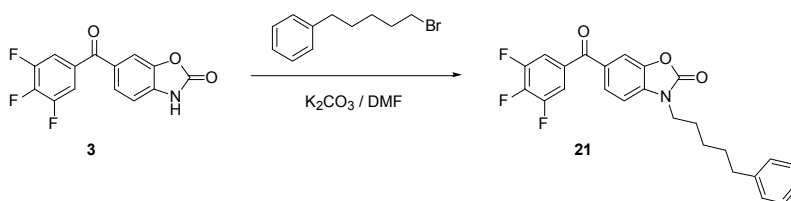
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.97 (dd, *J* = 1.5, 8.2 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.54 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.45 (m, 3H), 7.28 (m, 2H), 7.18 (m, 3H), 7.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.61 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.82 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.64 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.42 (m, 4H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 188.2 (C), 154.4 (C), 145.0 (CH), 142.7 (C), 142.4 (C), 135.2 (C), 134.8 (C), 133.1 (C), 130.7 (CH), 129.0 (2CH), 128.5 (2CH), 128.4 (2CH), 128.3 (2CH), 125.7 (CH), 125.5 (CH), 121.3 (CH), 110.1 (CH), 107.8 (CH), 42.6 (CH₂), 35.8 (CH₂), 31.2 (CH₂), 28.7 (CH₂), 27.7 (CH₂), 26.5 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 426,2 (MH⁺).

3-(5-Phénylpentyl)-6-(3,4,5-trifluorobenzoyl)-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-2-one (21)



Réactifs et solvant :

Composé 3	293,20 g.mol ⁻¹	0,65 mmol	190 mg	1 eq
1-Bromo-5-phénylpentane	227,15 g.mol ⁻¹	0,97 mmol	180 µL	1,5 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	0,97 mmol	134 mg	1,5 eq
DMF			4 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°2 page 205

Formule brute : C₂₅H₂₀F₃NO₃ **Masse molaire :** 439,44 g.mol⁻¹ **Rendement :** 74 %
Aspect : solide jaune **R_f (AcOEt/n-heptane 5/5) :** 0,73 **P_f :** 107°C
Recristallisation : éthanol absolu

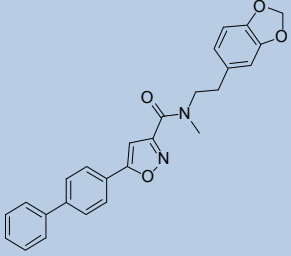
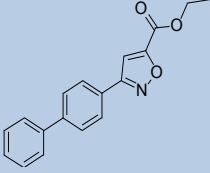
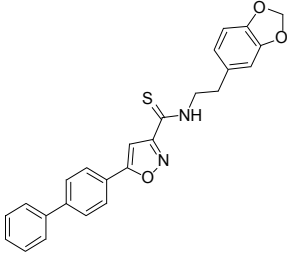
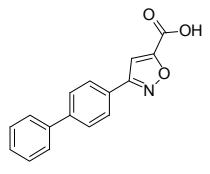
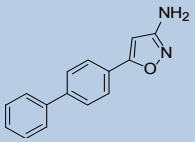
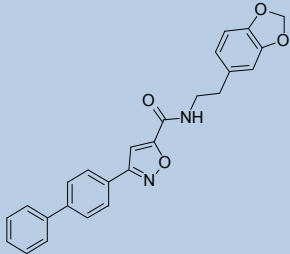
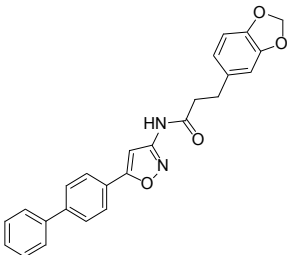
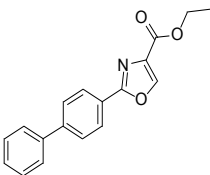
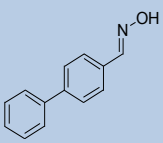
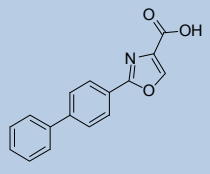
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.67 (dd, *J* = 1.5, 7.2 Hz, 2H), 7.45 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.30 - 7.26 (m, 2H), 7.21 - 7.15 (m, 3H), 7.04 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.85 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.71 (quint, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.46 (quint, *J* = 7.7 Hz, 2H).

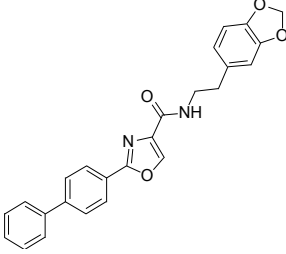
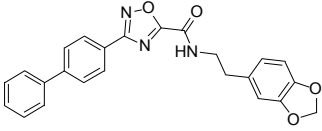
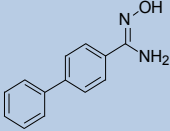
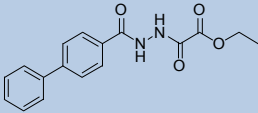
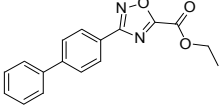
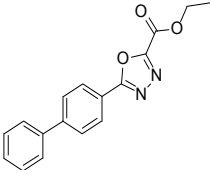
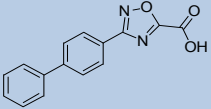
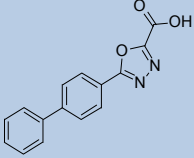
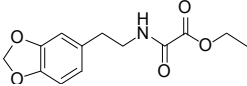
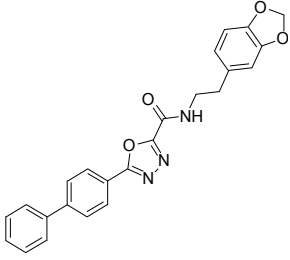
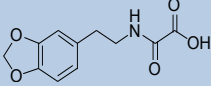
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 191.2 (C), 154.2 (C), 151.0 (ddd, *J* = 3.1, 10.1, 253.2 Hz, 2CF), 142.7 (dt, *J* = 15.6, 31.2, 261.0 Hz, CF), 142.6 (C), 142.0 (C), 135.7 (C), 133.1 (dd, *J* = 5.3, 10.3 Hz, C), 130.6 (C), 128.4 (4CH), 127.3 (CH), 125.9 (CH), 114.4 (dd, *J* = 6.2, 15.4 Hz, 2CH), 111.5 (CH), 107.7 (CH), 42.6 (CH₂), 35.7 (CH₂), 30.9 (CH₂), 27.7 (CH₂), 26.2 (CH₂).

¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ (ppm) - 131.96 (dd, *J* = 6.9, 20.5 Hz, 2F), - 153.13 (m, 1F).

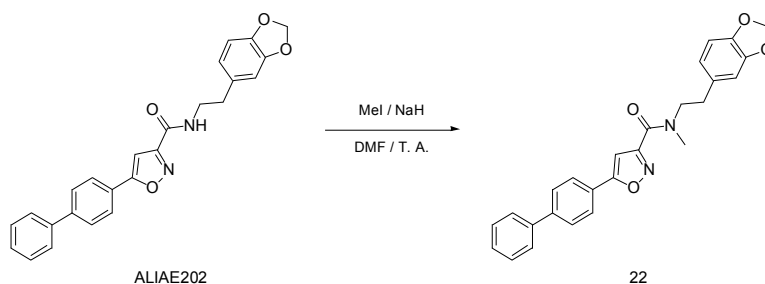
LC-MS (APCI⁺) *m/z* 440,2 (MH⁺).

II. Synthèse des composés de type 3-carboxamido-5-aryl-isoxazole **22** à **44** – Série B

Nom	Structure	Page	Nom	Structure	Page
22		221	29		227
24		222	30		228
26		223	31		229
27		224	32		231
28		226	33		232

Nom	Structure	Page	Nom	Structure	Page
34		233	40		240
35		235	41		241
36		236	42		242
37		237	43		243
38		238	44		244
39		239			

N3-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)éthyl]-N3-méthyl-5-(4-biphényl)-3-isoxazolecarboxamide (22)



Réactifs et solvant :

ALIAE202	412,44 g.mol ⁻¹	0,36 mmol	150 mg	1 eq
Iodure de méthyle	141,94 g.mol ⁻¹	0,90 mmol	56 µL	2,5 eq
Hydruure de sodium	23,99 g.mol ⁻¹	0,90 mmol	22 mg	2,5 eq
DMF			15 mL	solvant

Protocole :

Une solution d'ALIAE202 et d'hydruure de sodium dans 15 mL de DMF est agitée sous azote à température ambiante. Après 45 min, l'iodure de méthyle est ajouté et le mélange est agité pendant 5 heures sous azote à température ambiante. La solution est ensuite concentrée à sec sous pression réduite et le résidu est extrait au dichlorométhane. Les phases organiques sont lavées à l'eau et séchées sur MgSO₄. Le composé désiré est recristallisé dans l'éthanol absolu

Formule brute : C₂₆H₂₂N₂O₄ **Masse molaire :** 426,46 g.mol⁻¹ **Rendement :** 52%
Aspect : solide blanc **Rf** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,23 **Pf :** 113°C
Recristallisation : éthanol absolu

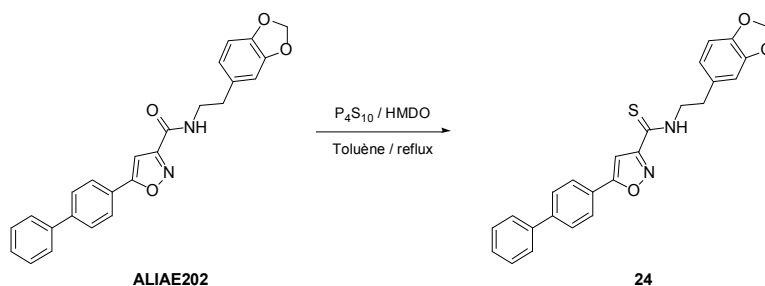
¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 7.97 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.76 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.50 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.43 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.86 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.72 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.98 (s, 2H), 3.66 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.08 (s, 3H), 2.78 (t, J = 7.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 169.3 (C), 160.9 (C), 159.8 (C), 147.8 (C), 146.2 (C), 142.6 (C), 139.4 (C), 133.0 (C), 129.6 (2CH), 128.6 (CH), 127.9 (2CH), 127.3 (2CH), 126.8 (2CH), 125.6 (C), 122.2 (CH), 109.6 (CH), 108.6 (CH), 101.2 (CH₂), 101.2 (CH), 52.3 (CH₂), 34.3 (CH₃), 32.7 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) m/z 427,1 (MH⁺).

HRMS (FTMS + p ESI Full ms) m/z 427,16488 (MH⁺).

N3-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-3-isoxazolecarbothioamide (24)



Réactifs et solvant :

ALIAE202	412,44 g.mol ⁻¹	0,36 mmol	150 mg	1 eq
Pentaseulfure de phosphore	444,48 g.mol ⁻¹	1,09 mmol	485 mg	3 eq
Hexaméthylidisiloxane (HMDO)	162,38 g.mol ⁻¹	0,91 mmol	195 µL	2,5 eq
Toluene			15 mL	solvant

Protocole :

A une solution du composé **ALIAE202** dans 15 mL de toluène à 90°C, sont ajoutés le pentaseulfure de phosphore et l'hexaméthylidisiloxane. La solution est agitée à reflux pendant 2 heures. Ensuite, le pentaseulfure de phosphore est filtré et la solution est neutralisée par 2 mL de triéthylamine. Enfin, la solution est extraite au dichlorométhane, les phases organiques sont lavées à l'eau et séchées sur MgSO₄. Le produit désiré est ensuite recristallisé dans le dichlorométhane.

Formule brute : C₂₅H₂₀N₂O₃S **Masse molaire :** 428,50 g.mol⁻¹ **Rendement :** 26%
Aspect : solide jaune **Rf** (cyclohexane/AcOEt = 7/3) : 0,548 **Pf :** 177°C
Recristallisation : dichlorométhane

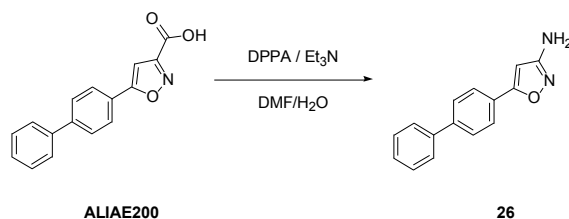
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.63 (s, 1H), 7.88 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.65 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.49 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.42 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.81 – 6.72 (m, 3H), 5.97 (s, 2H), 4.06 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 3.01 (t, J = 7.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 169.8 (C), 149.8 (C), 147.7 (C), 146.2 (C), 142.7 (2C), 139.4 (C), 132.3 (C), 129.6 (2CH), 128.7 (CH), 127.9 (2CH), 127.3 (2CH), 126.9 (2CH), 125.7 (C), 122.0 (CH), 109.5 (CH), 108.7 (CH), 102.3 (CH₂), 101.2 (CH), 47.4 (CH₂), 32.8 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) m/z 429,1 (MH⁺).

HRMS (FTMS + p ESI Full ms) m/z 429,12678 (MH⁺).

5-(4-Biphényl)-3-isoxazolyl-amine (26)



Réactifs et solvant :

ALIAE200	265,26 g.mol ⁻¹	1,96 mmol	520 mg	1 eq
Azide de diphénylphosphoryle	275,20 g.mol ⁻¹	2,94 mmol	650 µL	1,5 eq
Et₃N	101,19 g.mol ⁻¹	2,94 mmol	412 µL	1,5 eq
DMF			20 mL	solvant
H₂O			5 mL	

Protocole :

Une solution d'ALIAE200, d'azide de diphénylphosphoryle et de triéthylamine dans 20 mL de DMF est agitée pendant 3 heures à température ambiante sous azote. Ensuite, 5 mL d'eau distillée sont ajoutés et la solution est agitée pendant 1 heure à 100°C. Le DMF est évaporé sous pression réduite et le résidu est extrait à l'AcOEt. Les phases organiques sont lavées avec une solution aqueuse de NaHCO₃ à 10 %, puis filtrées sur Celite®. Le filtrat est lavé 3 fois à la saumure et séché sur MgSO₄. Enfin, l'AcOEt est évaporé sous pression réduite.

Formule brute : C₁₅H₁₂N₂O

Masse molaire : 236,28 g.mol⁻¹

Rendement : 55%

Aspect : solide blanc

R_f (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,23

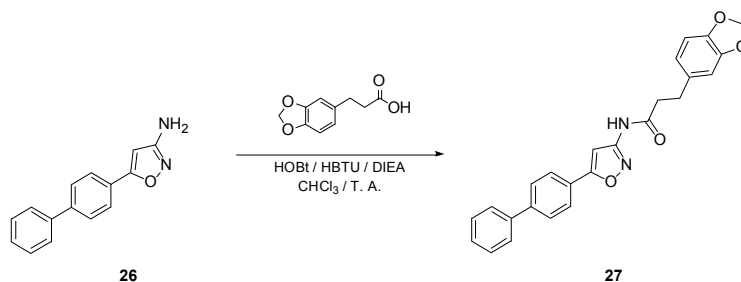
P_f : 143°C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.48 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 169.6 (C), 160.8 (C), 159.9 (C), 142.7 (C), 139.4 (C), 129.6 (2CH), 127.9 (CH), 127.3 (2CH), 126.9 (2CH), 125.7 (2CH), 101.3 (CH).

LC-MS (APCI⁺) m/z 237,1 (MH⁺).

N1-(5-(4-Biphényl)-3-isoxazolyl)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)propanamide (27)



Réactifs et solvant :

Composé 26	236,28 g.mol ⁻¹	0,99 mmol	235 mg	1,2 eq
Acide 3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-propionique	194,19 g.mol ⁻¹	0,82 mmol	159 mg	1 eq
HOBt	135,12 g.mol ⁻¹	0,41 mmol	55 mg	0,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	1,23 mmol	466 mg	1,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	1,64 mmol	284 µL	2 eq
Chloroforme			25mL	solvant

Protocole :

Une solution d'acide 3-benzo[1,3]dioxol-5-yl-propionique, de *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA), de 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) et d'hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (HBTU) dans 25 mL de chloroforme anhydre est agitée pendant 45 min à température ambiante. Le composé **26** est ensuite ajouté, et la solution est agitée à température ambiante pendant 24 heures supplémentaires. La solution est filtrée et lavée successivement avec une solution aqueuse de NaOH 0,5N, puis avec une solution aqueuse de HCl 1N et de l'eau. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite pour donner une huile brune. Le résidu est purifié par chromatographie sur couche épaisse (CCE) avec l'éluant cyclohexane / AcOEt 7:3 (v/v). Enfin, le composé désiré est recristallisé dans l'heptane.

Formule brute : C₂₅H₂₀N₂O₄ **Masse molaire :** 412,44 g.mol⁻¹ **Rendement :** 0,5%
Aspect : solide blanc **Rf** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,49
Recristallisation : *n*-heptane

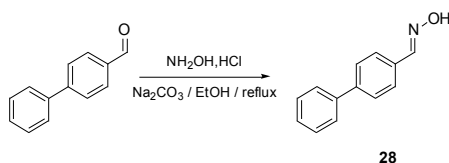
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.05 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.49 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.71 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.95 (s, 1H), 3.00 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.72 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 169.9 (C), 161.6 (C), 158.1 (C), 147.8 (C), 146.2 (C), 143.2 (C), 140.1 (C), 133.7 (C), 129.1 (C), 128.9 (2CH), 128.0 (CH), 127.6 (2CH), 127.1 (2CH), 126.2 (2CH), 121.2 (CH), 108.9 (CH), 108.3 (CH), 100.9 (CH₂), 93.9 (CH), 39.1 (CH₂), 30.8 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) m/z 413,1 (MH⁺).

HRMS (FTMS + p ESI Full ms) m/z 413,14935 (MH⁺).

4-Biphénylcarboxime (28)



Réactifs et solvant :

Biphényl-4-carboxaldéhyde	182,22 g.mol ⁻¹	21,95 mmol	4,00 g	1 eq
Chlorhydrate d'hydroxylamine	69,49 g.mol ⁻¹	50,94 mmol	3,54 g	2,3 eq
Na₂(CO₃)₂	165,95 g.mol ⁻¹	28,08 mmol	4,66 g	1,3 eq
Ethanol			150 mL	solvant

Protocole :

Une solution de biphényl-4-carboxaldéhyde, de chlorhydrate d'hydroxylamine et de carbonate de sodium dans 150 mL d'éthanol est agitée à reflux pendant 18 heures. Ensuite, le carbonate de sodium est filtré et l'éthanol est évaporé sous pression réduite. Le solide résultant est repris dans le dichlorométhane et la solution est lavée à l'eau plusieurs fois. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄ et concentrée à sec sous pression réduite.

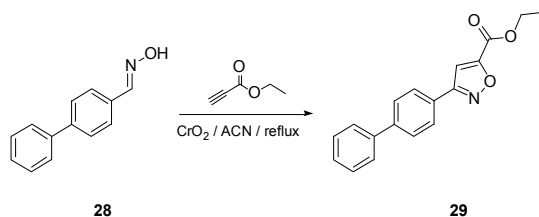
Formule brute : C₁₃H₁₁NO **Masse molaire :** 197,23 g.mol⁻¹ **Rendement :** quantitatif
Aspect : solide blanc **R_f** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,63 **P_f** : 126°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 11.27 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.72 - 7.66 (m, 6H), 7.47 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.37 (t, J = 7.3 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 150.1 (C), 142.8 (C), 140.3 (C), 130.9 (C), 128.9 (2CH), 127.8 (CH), 127.5 (4CH), 127.1 (2CH).

LC-MS (APCI⁺) m/z 198,1 (MH⁺).

3-(4-Biphényl)-5-isoxazolecarboxylate d'éthyle (29)



Réactifs et solvant :

Composé 28	197,23 g.mol ⁻¹	17,75 mmol	3,5 g	1 eq
Propiolate d'éthyle	98,1 g.mol ⁻¹	53,25 mmol	5,2 mL	3 eq
CrO₂	83,99 g.mol ⁻¹	177,46 mmol	14,3 g	10 eq
Acétonitrile			110 mL	solvant

Protocole :

Une solution de composé **28**, de propiolate d'éthyle et de dioxyde de chrome dans 110 mL d'acétonitrile est agitée à reflux pendant 2 heures. Ensuite, le dioxyde de chrome est filtré sur Celite® et lavé à l'AcOEt. Enfin, le filtrat est concentré à sec sous pression réduite et le composé désiré est recristallisé dans l'éthanol absolu.

Formule brute : C₁₈H₁₅NO₃ **Masse molaire :** 293,33 g.mol⁻¹ **Rendement :** 40%

Aspect : solide blanc **R_f** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,65 **P_f** : 107°C

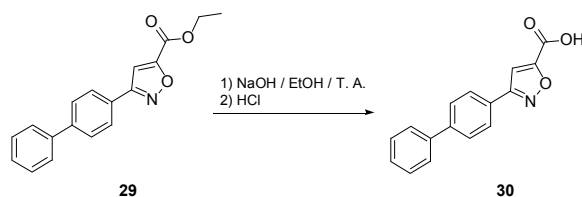
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 4.49 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.46 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 162.7 (C), 161.0 (C), 156.8 (C), 143.4 (C), 140.1 (C), 129.0 (2CH), 128.1 (C), 128.0 (2CH), 127.8 (2CH), 127.3 (2CH), 127.1 (CH), 107.4 (CH), 62.4 (CH₂), 14.2 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 294,1 (MH⁺).

Acide 3-(4-biphényl)-5-isoxazolecarboxylique (30)



Réactifs et solvant :

Composé 29	293,32 g.mol ⁻¹	6,82 mmol	2,00 g	1 eq
NaOH	40 g.mol ⁻¹	68,25 mmol	2,73 g	10 eq
Ethanol			100 mL	solvant

Protocole :

L'hydroxyde de sodium est ajouté lentement à une solution de composé **29** dans 100 mL d'éthanol à 95 %. La solution est agitée à température ambiante pendant 24 heures. Puis, l'éthanol est évaporé sous pression réduite, le résidu est acidifié (HCl 1N, pH 2) et extrait à l'AcOEt. Les phases organiques sont ensuite lavées à l'eau et la saumure, puis séchées sur MgSO₄, et enfin, évaporées sous pression réduite pour donner l'acide carboxylique **30**.

Formule brute : C₁₆H₁₁NO₃

Masse molaire : 265,27 g.mol⁻¹

Rendement : 76%

Aspect : solide blanc

R_f (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,05

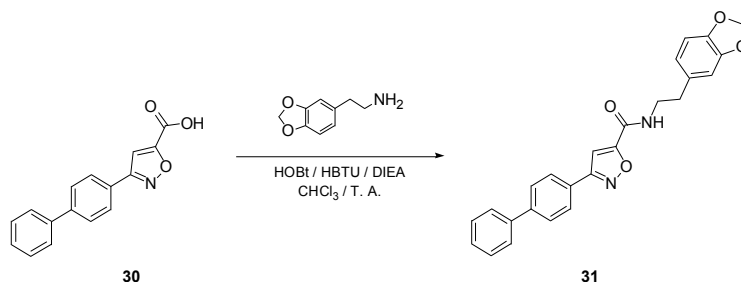
P_f : 201°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 13.49 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.74 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.42 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 167.6 (C), 162.3 (C), 158.2 (C), 146.3 (C), 139.3 (C), 133.3 (C), 130.6 (2CH), 129.6 (2CH), 129.5 (2CH), 127.8 (2CH), 127.2 (CH), 108.0 (CH).

LC-MS (APCI⁺) m/z 266,1 (MH⁺).

N5-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)éthyl]-3-(4-biphényl)-5-isoxazolecarboxamide (31)



Réactifs et solvant :

Composé 30	266,25 g.mol ⁻¹	4,88 mmol	1,3 g	1 eq
Chlorhydrate de 3,4-méthylènedioxyphényl-éthylamine	201,65 g.mol ⁻¹	5,86 mmol	1,18 g	1,2 eq
HOBt	135,12 g.mol ⁻¹	2,44 mmol	0,34 g	0,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	7,32 mmol	2,77 g	1,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	21,96 mmol	3,80 mL	4,5 eq
Chloroforme			70 mL	solvant

Protocole :

Une solution de composé **30**, de DIEA, d'HOBt et de HBTU dans 70 mL de chloroforme anhydre est agitée pendant 45 min à température ambiante. Le chlorhydrate de 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine est ensuite ajouté, et la solution est agitée à température ambiante pendant 24 heures supplémentaires. La solution est filtrée et lavée successivement avec une solution aqueuse de NaOH 0,5N, puis avec une solution aqueuse de HCl 1N et de l'eau. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite pour donner une huile brune. Le résidu est purifié par chromatographie sur couche épaisse (CCE) utilisant un éluant cyclohexane / AcOEt 7:3 (v/v). Enfin, le composé désiré est recristallisé dans l'heptane.

Formule brute : C₂₅H₂₀N₂O₄

Masse molaire : 412,44 g.mol⁻¹

Rendement : 79%

Aspect : solide blanc

R_f (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0.38

P_f : 205°C

Recristallisation : *n*-heptane

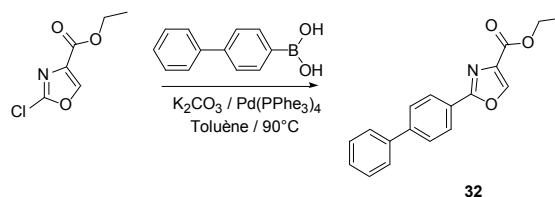
¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 8.36 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.51 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.42 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.71 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.96 (s, 2H), 3.47 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D6) δ (ppm) 164.8 (C), 162.7 (C), 156.0 (C), 147.7 (C), 146.1 (C), 142.7 (C), 139.6 (C), 133.4 (C), 129.5 (2CH), 128.5 (CH), 127.9 (2CH), 127.8 (2CH), 127.3 (2CH), 125.7 (C), 122.0 (CH), 109.5 (CH), 108.6 (CH), 105.0 (CH), 101.1 (CH₂), 40.1 (CH₂), 34.8 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) m/z 413,2 (MH⁺).

HRMS (FTMS + p ESI Full ms) m/z 413,14883 (MH⁺).

2-(4-Biphényl)-1,3-oxazole-4-carboxylate d'éthyle (32)



Réactifs et solvant :

2-Chloro-1,3-oxazole-4-carboxylate d'éthyle	175,57 g.mol ⁻¹	2,85 mmol	500 mg	1 eq
Acide 4-biphénylboronique	198,03 g.mol ⁻¹	3,14 mmol	621 mg	1,1 eq
K₂CO₃ 2M	138,21 g.mol ⁻¹	6,28 mmol	3,14 mL	2,2 eq
Pd(PPh₃)₄	1155,56 g.mol ⁻¹	0,11 mmol	126 mg	0,04 eq
Toluène			30 mL	solvant

Protocole :

Une solution de 2-chloro-1,3-oxazole-4-carboxylate d'éthyle, d'acide 4-biphénylboronique, de palladium triphénylphosphine et de carbonate de potassium dans 30 mL de toluène est agitée à 90°C pendant 2h30. Le toluène est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu est extrait à l'AcOEt. Les phases organiques sont lavées avec une solution de NaOH 2M et de saumure. Les phases organiques sont ensuite séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous pression réduite. Enfin, le composé obtenu est recristallisé dans une solution de dichlorométhane / éther de pétrole (1/9).

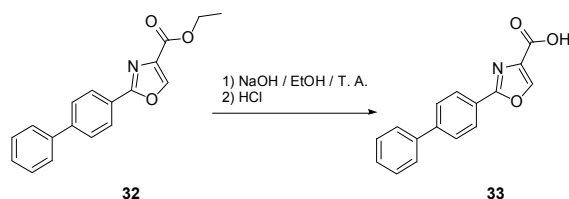
Formule brute : C₁₈H₁₅NO₃ **Masse molaire :** 293,33 g.mol⁻¹ **Rendement :** 48%
Aspect : solide beige **Rf** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,64 **Pf :** 118°C
Recristallisation : dichlorométhane / éther de pétrole (1/9)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.30 (s, 1H), 8.20 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.48 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.40 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 4.45 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.43 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 162.4 (C), 161.4 (C), 143.9 (C), 143.7 (CH), 139.9 (C), 134.8 (C), 128.9 (2CH), 128.0 (CH), 127.5 (2CH), 127.4 (2CH), 127.1 (2CH), 125.2 (C), 61.4 (CH₂), 14.3 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) m/z 294,2 (MH⁺).

Acide 2-(4-biphényl)-1,3-oxazole-4-carboxylique (33)



Réactifs et solvant :

Composé 32	293,32 g.mol ⁻¹	6,14 mmol	1,80 g	1 eq
NaOH	40,00 g.mol ⁻¹	61,4 mmol	2,46 g	10 eq
Ethanol			150 mL	solvant

Protocole :

L'hydroxyde de sodium est ajouté lentement à une solution de composé **32** dans 150 mL d'éthanol 95 %. La solution est agitée à température ambiante pendant 24 heures. Puis, l'éthanol est évaporé sous pression réduite, le résidu est acidifié (HCl 1N, pH 2) et extrait à l'AcOEt. Les phases organiques sont ensuite lavées à l'eau et la saumure, puis séchées sur MgSO₄, et enfin, évaporées sous pression réduite pour donner l'acide carboxylique **33**.

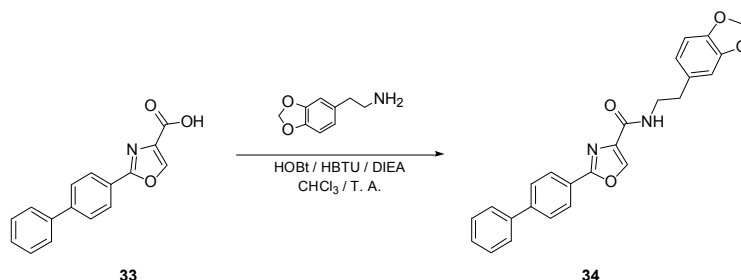
Formule brute : C₁₆H₁₁NO₃ **Masse molaire :** 265,26 g.mol⁻¹ **Rendement :** 94%
Aspect : solide blanc **R_f** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,66 **P_f** : >210°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 13.18 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.50 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.41 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 162.5 (C), 161.5 (C), 145.9 (CH), 143.1 (C), 139.4 (C), 135.1 (C), 129.6 (2CH), 128.7 (CH), 127.9 (2CH), 127.4 (2CH), 127.3 (2CH), 125.6 (C).

LC-MS (APCI⁺) m/z 266,1 (MH⁺).

N4-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)éthyl]-2-(4-biphényl)-1,3-oxazole-4-carboxamide (34)



Réactifs et solvant :

Composé 33	265,26 g.mol ⁻¹	0,49 mmol	130 mg	1 eq
Chlorhydrate de 3,4-méthylènedioxyphényl-éthylamine	201,65 g.mol ⁻¹	0,59 mmol	119 mg	1,2 eq
HOBt	135,12 g.mol ⁻¹	0,25 mmol	34 mg	0,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	0,74 mmol	280 mg	1,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	2,21 mmol	385 µL	4,5 eq
Chloroforme			20 mL	solvant

Protocole :

Une solution de composé **33**, de DIEA, d'HOBt et de HBTU dans 20 mL de chloroforme anhydre est agitée pendant 45 min à température ambiante. L'amine appropriée est ensuite ajoutée, et la solution est agitée à température ambiante pendant 24 heures supplémentaires. La solution est filtrée et lavée successivement avec une solution aqueuse de NaOH 0,5N, puis avec une solution aqueuse de HCl 1N et de l'eau. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite pour donner une huile brune. Le résidu est purifié par chromatographie sur couche épaisse (CCE) utilisant un éluant cyclohexane / AcOEt 7:3 (v/v). Enfin, le composé désiré est recristallisé dans l'heptane.

Formule brute : C₂₅H₂₀N₂O₄ **Masse molaire :** 412,14 g.mol⁻¹ **Rendement :** 48%
Aspect : solide blanc **R_f** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,28 **P_f** : 153°C
Recristallisation : n-heptane

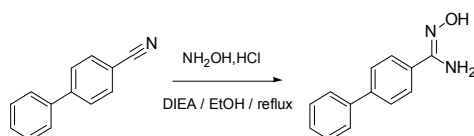
¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 8.70 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.10 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.76 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.51 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.42 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.69 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.96 (s, 2H), 3.46 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.78 (t, J = 7.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D6) δ (ppm) 160.8 (C), 160.2 (C), 147.7 (C), 146.0 (C), 143.0 (C), 142.4 (CH), 139.3 (C), 137.9 (C), 133.6 (C), 129.6 (2CH), 128.7 (CH), 127.9 (2CH), 127.3 (2CH), 127.2 (2CH), 125.7 (C), 122.0 (CH), 109.4 (CH), 108.6 (CH), 101.1 (CH₂), 40.1 (CH₂), 35.3 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) m/z 413,1 (MH⁺).

HRMS (FTMS + p ESI Full ms) m/z 413,14899 (MH⁺).

N-Hydroxy-biphényl-4-carboxamide (35)



Réactifs et solvant :

4-Cyanobiphényle	179,22 g.mol ⁻¹	12,72 mmol	2,28 g	1 eq
Chlorhydrate d'hydroxylamine	69,49 g.mol ⁻¹	25,44 mmol	1,77 g	2 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	25,44 mmol	8,7 mL	2 eq
Ethanol			100 mL	solvant

Protocole :

Une solution de 4-cyanobiphényle, de chlorhydrate d'hydroxylamine et de DIEA dans l'éthanol est agitée à reflux pendant 18 heures. L'éthanol est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu est extrait au dichlorométhane. Les phases organiques sont lavées à l'eau et séchées sur MgSO₄. Enfin, le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite pour donner le composé **35** désiré.

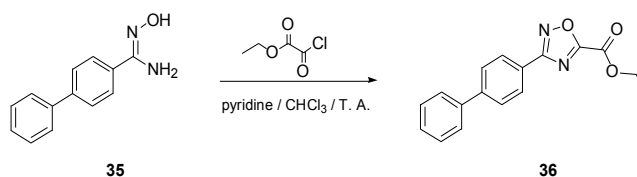
Formule brute : C₁₃H₁₂N₂O **Masse molaire :** 212,25 g.mol⁻¹ **Rendement :** quantitatif
Aspect : Solide blanc **R_f** (cyclohexane/AcOEt 4/6) : 0,62 **P_f** : 181°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 9.68 (s, 1H), 7.77 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.48 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.37 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 5.85 (s, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 151.0 (C), 140.9 (C), 140.0 (C), 132.8 (C), 129.4 (2CH), 128.1 (CH), 127.1 (2CH), 126.8 (2CH), 126.4 (2CH)

LC-MS (APCI⁺) m/z 213,2 (MH⁺).

3-(4-Biphényl)-1,2,4-oxadiazole-5-carboxylate d'éthyle (36)



Réactifs et solvant :

Composé 35	212,25 g.mol ⁻¹	27,80 mmol	5,90 g	1 eq
Chlorure d'éthylalyle	136,54 g.mol ⁻¹	83,39 mmol	9,29 mL	3 eq
Pyridine	79,10 g.mol ⁻¹	27,80 mmol	2,24 mL	1 eq
Chloroforme			250 mL	solvant

Protocole :

A une solution de composé **35** et de pyridine dans 250 mL de chloroforme, est ajouté le chlorure d'éthylalyle pendant 30 min. Le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant 18 heures. Ensuite, la solution est lavée par une solution aqueuse de NaOH 0,5N puis la phase organique est séchée sur MgSO₄. Enfin, le chloroforme est évaporé sous pression réduite et le composé désiré est recristallisé dans l'éthanol absolu.

Formule brute : C₁₇H₁₄N₂O₃ **Masse molaire :** 294,30 g.mol⁻¹ **Rendement :** 60%

Aspect : Solide blanc **Rf** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,55 **Pf :** 83°C

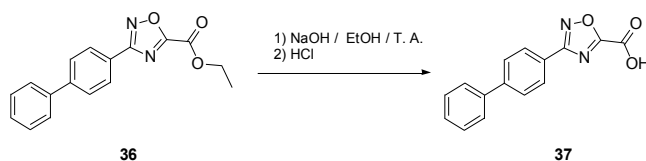
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.41 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.60 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.52 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 169.3 (C), 166.6 (C), 154.2 (C), 144.6 (C), 140.0 (C), 129.0 (2CH), 128.2 (2CH), 128.1 (CH), 127.6 (2CH), 127.2 (2CH), 124.4 (C), 64.0 (CH₂), 14.1 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 295,2 (MH⁺).

Acide 3-(4-biphényl)-1,2,4-oxadiazole-5-carboxylique (37)



Réactifs et solvant :

Composé 36	294,31 g.mol ⁻¹	2,04 mmol	600 mg	1 eq
NaOH	40,00 g.mol ⁻¹	20,39 mmol	815 mg	10 eq
Ethanol		100 mL		solvant

Protocole :

L'hydroxyde de sodium est ajouté lentement à une solution de composé **36** dans 100 mL d'éthanol à 95 %. La solution est agitée à température ambiante pendant 24 heures. Puis, l'éthanol est évaporé sous pression réduite, le résidu est acidifié (HCl 1N, pH 2) et extrait à l'AcOEt. Les phases organiques sont ensuite lavées à l'eau et à la saumure, puis séchées sur MgSO₄, et enfin, évaporées sous pression réduite pour donner l'acide carboxylique **37**.

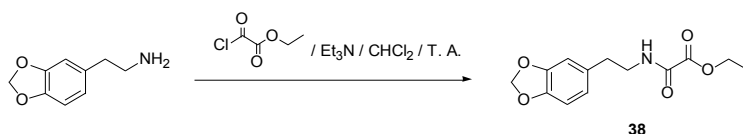
Formule brute : C₁₅H₁₀N₂O₃ **Masse molaire :** 266,25 g.mol⁻¹ **Rendement :** 75%
Aspect : solide blanc **Rf** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,80 **Pf :** 77°C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.23 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.75 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.52 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.47 (t, J = 7.3 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 190.7 (C), 162.3 (C), 145.1 (C), 138.7 (C), 133.3 (C), 129.7 (2CH), 129.2 (2CH), 128.1 (2CH), 127.6 (2CH), 119.3 (C), 110.5 (CH).

LC-MS (APCI⁺) m/z 267,2 (MH⁺).

N-(2-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-éthyl)-oxalamate d'éthyle (38)



Réactifs et solvant :

Chlorhydrate de 3,4-méthylènedioxyphényl-éthylamine	201,65 g.mol ⁻¹	15,08 mmol	3,04 g	1 eq
Chlorure d'éthylloxalyle	136,54 g.mol ⁻¹	16,59 mmol	1,85 mL	1,1 eq
Triéthylamine	101,19 g.mol ⁻¹	67,86 mmol	9,45 mL	4,5 eq
Dichlorométhane			50 mL	solvant

Protocole :

La triéthylamine et le chlorhydrate de 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine sont dissous dans 50 mL de dichlorométhane. La solution est alors refroidie à 0°C et le chlorure d'éthylloxalyle est ajouté pendant 10 min. Le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant 2h15. La solution est lavée avec une solution aqueuse de NaHCO₃ à 10 % puis la phase organique est séchée sur MgSO₄. Enfin, le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite et le composé obtenu est recristallisé dans l'éthanol absolu.

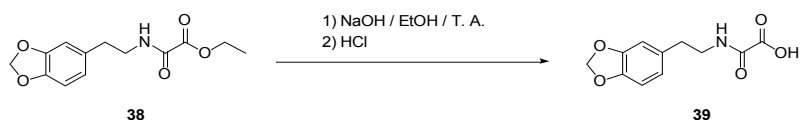
Formule brute : C₁₃H₁₅NO₅ **Masse molaire :** 265,27 g.mol⁻¹ **Rendement :** 71%
Aspect : solide beige **R_f** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,24 **P_f :** 127°C
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.14 (br. s, 1H), 6.76 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.69 – 6.63 (m, 2H), 5.95 (s, 2H), 4.34 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.56 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.79 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.38 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 160.7 (C), 156.5 (C), 148.0 (C), 146.4 (C), 131.8 (C), 121.6 (CH), 109.0 (CH), 108.5 (CH), 101.0 (CH₂), 63.2 (CH₂), 41.2 (CH₂), 35.0 (CH₂), 14.0 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) m/z 266,0 (MH⁺).

Acide *N*-(2-benzo[1,3]dioxol-5-yl-éthyl)-oxalamique (39)



Réactifs et solvant :

Composé 38	265,27 g.mol ⁻¹	4,96 mmol	800 mg	1 eq
NaOH	40,00 g.mol ⁻¹	49,66 mmol	4,58 g	10 eq
EtOH			100 mL	solvant

Protocole :

L'hydroxyde de sodium est ajouté lentement à une solution de composé **38** dans 100 mL d'éthanol 95 %. La solution est agitée à température ambiante pendant 24 heures. Puis, l'éthanol est évaporé sous pression réduite, le résidu est acidifié (HCl 1N, pH 2) et extrait à l'AcOEt. Les phases organiques sont ensuite lavées à l'eau et à la saumure, puis séchées sur MgSO₄, et enfin, évaporées sous pression réduite pour donner l'acide carboxylique **39**.

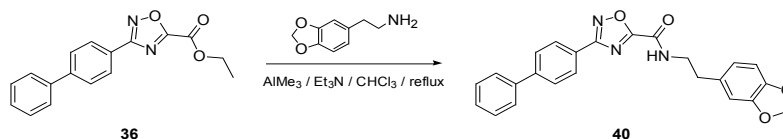
Formule brute : C₁₁H₁₁NO₅ **Masse molaire :** 237,21 g.mol⁻¹ **Rendement :** 54%
Aspect : solide orange **R_f** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,05 **P_f** : 135°C
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.33 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.69 – 6.63 (m, 2H), 5.96 (s, 2H), 3.59 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.81 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 159.8 (C), 157.5 (C), 148.2 (C), 146.8 (C), 131.2 (C), 121.8 (CH), 109.0 (CH), 108.7 (CH), 101.2 (CH₂), 41.9 (CH₂), 35.0 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 238,1 (MH⁺).

N5-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)éthyl]-3-(4-biphényl)-1,2,4-oxadiazole-5-carboxamide (40)



Réactifs et solvant :

Composé 36	294,31 g.mol ⁻¹	0,85 mmol	250 mg	1 eq
Chlorhydrate de 3,4-méthylènedioxyphényl-éthylamine	201,65 g.mol ⁻¹	1,10 mmol	222 mg	1,3 eq
AlMe₃ 25% m/m dans hexane	72,09 g.mol ⁻¹	1,10 mmol	555 µL	1,3 eq
EtN₃	101,19 g.mol ⁻¹	2,55 mmol	355 µL	3 eq
CHCl₃			20 mL	solvant

Protocole :

Le triéthylaluminium est ajouté à une solution de chlorhydrate de 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine et de triéthylamine dans le chloroforme. Après 30 min à température ambiante, le composé **36** est ajouté puis le mélange est agité à reflux pendant 5 heures. Ensuite, la solution est lavée à l'eau et par une solution aqueuse d'HCl 1N. Puis le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner une huile brune. L'huile est alors purifiée par CCE (cyclohexane/EtOAc 75:35, v/v).

Formule brute : C₂₄H₁₉N₃O₄ **Masse molaire :** 413,44 g.mol⁻¹ **Rendement :** 2%
Aspect : solide blanc **Rf** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,47 **Pf :** 168°C

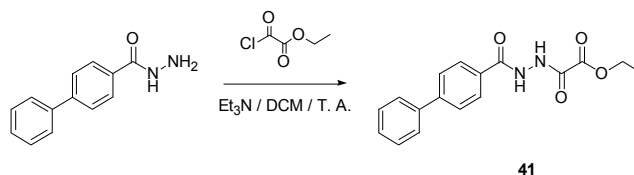
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.17 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.74 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.50 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.41 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.82 - 6.71(m, 3H), 5.97 (s, 2H), 3.75 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 2.92 (t, J = 7.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 174.4 (C), 168.6 (C), 153.0 (C), 148.1 (C), 146.6 (C), 144.6 (C), 139.9 (C), 131.6 (C), 129.0 (2CH), 128.1 (CH), 128.0 (2CH), 127.7 (2CH), 127.2 (2CH), 124.5 (C), 121.7 (CH), 109.0 (CH), 108.6 (CH), 101.1 (CH₂), 41.3 (CH₂), 35.1 (CH₂).

LC-MS (APCI⁺) m/z 414,1 (MH⁺).

HRMS (FTMS + p ESI Full ms) m/z 414,14424 (MH⁺).

[N'-(Biphényl-4-carbonyl)-hydrazino]-oxo-acétate d'éthyle (41)



Réactifs et solvant :

4-Biphénylhydrazide	212,25 g.mol ⁻¹	11,8 mmol	2,50 g	1 eq
Chlorure d'éthyloxyale	136,54 g.mol ⁻¹	12,96 mmol	1,44 mL	1,1 eq
Et₃N	101,19 g.mol ⁻¹	21,2 mmol	3,00 mL	2 eq
Dichlorométhane			50 mL	solvant

Protocole :

La triéthylamine et la 4-biphénylhydrazide sont dissous dans 50 mL de dichlorométhane. La solution est alors refroidie à 0°C et le chlorure d'éthyloxyale est ajouté pendant 10 min. Le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant 2h15. Après la réaction, la solution est lavée avec une solution aqueuse de NaHCO₃ à 10 % puis la phase organique est séchée sur MgSO₄. Enfin, le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite et le composé obtenu est recristallisé dans l'éthanol absolu.

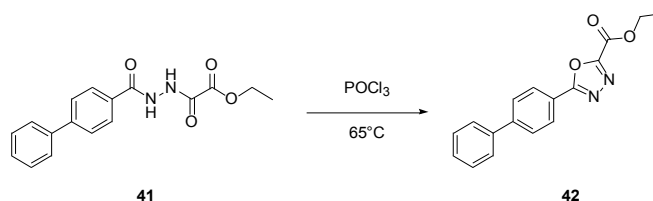
Formule brute : C₁₇H₁₆N₂O₄ **Masse molaire :** 312,32 g.mol⁻¹ **Rendement :** 56%
Aspect : solide jaune **Rf** (cyclohexane/AcOEt 5/5) : 0,18 **Pf :** 142°C
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.21 (br. s, 2H), 7.94 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.64 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.45 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.38 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 4.35 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.39 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 164.8 (C), 156.1 (C), 146.1 (C), 142.6 (C), 142.2 (C), 130.0 (C), 129.7 (2CH), 128.1 (2CH), 127.3 (2CH), 126.9 (2CH), 121.5 (CH), 55.2 (CH₂), 17.9 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) m/z 313,1 (MH⁺).

5-(4-Biphényl)-1,3,4-oxadiazole-2-carboxilate d'éthyle (42)



Réactifs et solvant :

Composé 41	312,32 g.mol ⁻¹	4,80 mmol	1,5 g	1 eq
Oxychlorure de phosphore	153,33 g.mol ⁻¹		25 mL	excès

Protocole :

Le composé **41** est mis en solution dans 25 mL d'oxychlorure de phosphore puis le mélange est chauffé à reflux pendant 5 heures. Ensuite, l'oxychlorure de phosphore est évaporé sous pression réduite et le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol absolu.

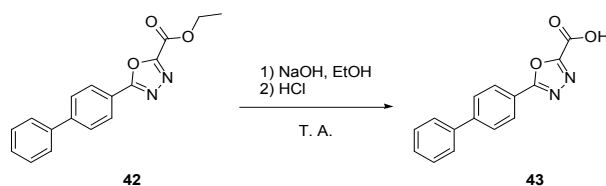
Formule brute : C₁₇H₁₄N₂O₃ **Masse molaire :** 294,30 g.mol⁻¹ **Rendement :** 69%
Aspect : solide jaune **Rf** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,36 **Pf :** 194°C
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.50 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.43 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.58 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.51 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 165.3 (C), 156.4 (C), 154.0 (C), 144.4 (C), 138.6 (C), 129.0 (2CH), 128.4 (C), 127.7 (2CH), 127.6 (2CH), 126.8 (2CH), 121.3 (CH), 56.1 (CH₂), 18.4 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 295,2 (MH⁺).

Acide 5-(4-biphényl)-1,3,4-oxadiazole-2-carboxylique (43)



Réactifs et solvant :

Composé 36	294,31 g.mol ⁻¹	1,70 mmol	500 mg	1 eq
NaOH	40,00 g.mol ⁻¹	16,99 mmol	710 mg	10 eq
Ethanol		100 mL		solvant

Protocole :

L'hydroxyde de sodium est ajouté lentement à une solution de composé **36** dans 150 mL d'éthanol 95 %. La solution est agitée à température ambiante pendant 24 heures. Puis, l'éthanol est évaporé sous pression réduite, le résidu est acidifié (HCl 1N, pH 2) et extrait à l'AcOEt. Les phases organiques sont ensuite lavées à l'eau et la saumure, puis séchées sur MgSO₄, et enfin, évaporées sous pression réduite pour donner l'acide carboxylique **43**.

Formule brute : C₁₅H₁₀N₂O₃

Masse molaire : 266,25 g.mol⁻¹

Rendement : 70%

Aspect : Solide beige

R_f (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,39

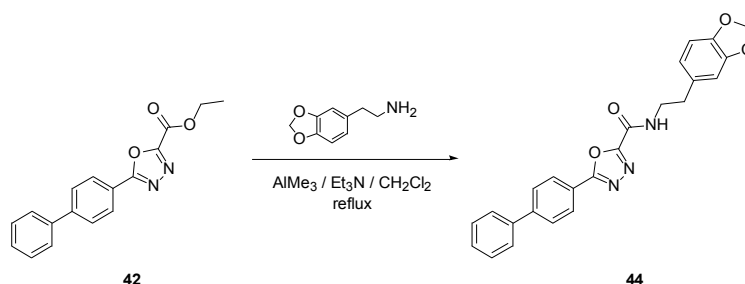
P_f : 113°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 9.36 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.52 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.44 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 164.9 (C), 159.9 (C), 154.6 (C), 143.4 (C), 139.0 (C), 129.1 (2CH), 128.4 (C), 128.2 (2CH), 126.9 (2CH), 126.7 (2CH), 122.1 (CH).

LC-MS (APCI⁺) m/z 267,2 (MH⁺).

N2-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)éthyl]-5-(4-biphényl)-1,3,4-oxadiazole-2-carboxamide (44)



Réactifs et solvant :

Composé 42	294,30 g.mol ⁻¹	1,70 mmol	500 mg	1 eq
Chlorhydrate de 3,4-méthylènedioxyphényl-éthylamine	201,65 g.mol ⁻¹	2,21 mmol	446 mg	1,3 eq
AlMe₃ 25% m/m dans l'hexane	72,09 g.mol ⁻¹	2,21 mmol	926 µL	3 eq
Et₃N	101,19 g.mol ⁻¹	5,10 mmol	710 µL	1,3 eq
Dichlorométhane			40 mL	solvant

Protocole :

Le triéthylaluminium est ajouté à une solution de chlorhydrate de 3,4-méthylènedioxyphényléthylamine et de triéthylamine dans le chloroforme. Après 30 min à température ambiante, le composé **42** est ajouté puis le mélange est agité à reflux pendant 5 heures. Ensuite, la solution est lavée à l'eau et par une solution aqueuse d'HCl 1N. Puis le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner une huile brune. L'huile est alors purifiée par CCE (cyclohexane/EtOAc 75:35, v/v). Enfin, le composé désiré est recristallisé dans l'heptane.

Formule brute : C₂₄H₁₉N₃O₄ **Masse molaire :** 413,44 g.mol⁻¹ **Rendement :** 17%
Aspect : solide blanc **Rf** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,37 **Pf :** 183°C
Recristallisation : n-heptane

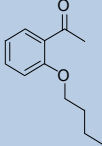
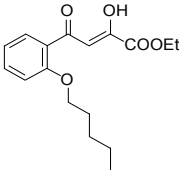
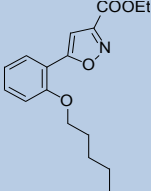
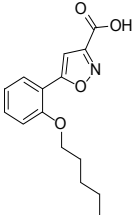
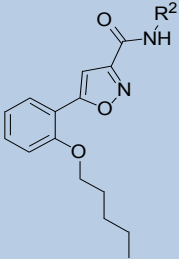
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.23 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.50 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.43 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.79 - 6.69 (m, 3H), 5.96 (s, 2H), 3.74 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 2.90 (t, J = 7.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 166.5 (C), 158.4 (C), 153.3 (C), 148.0 (C), 146.5 (C), 145.4 (C), 139.6 (C), 131.7 (C), 129.0 (2CH), 128.4 (CH), 128.0 (2CH), 127.8 (2CH), 127.2 (2CH), 121.7 (CH), 121.6 (C), 109.0 (CH), 108.6 (CH), 101.0 (CH₂), 41.2 (CH₂), 35.2 (CH₂).

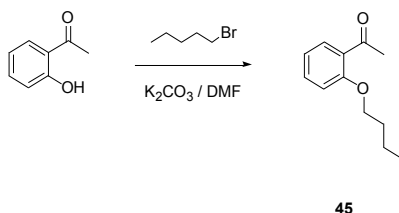
LC-MS (APCI⁺) m/z 414,2 (MH⁺).

HRMS (FTMS + p ESI Full ms) m/z 414,14471 (MH⁺).

III. Synthèse des composés de type 3-carboxamido-5-aryl-
isoxazole **45** à **58** – Série C

Nom	Structure	Page
45		246
46		247
47		248
48		249
49 – 58		250 - 260

1-(2-Pentyloxyphényl)éthanone (45)



Réactifs et solvant :

1-(2-Hydroxyphényl)éthanone	136,15 g.mol ⁻¹	73,4 mmol	10 g	1 eq
1-Bromopentane	151,05 g.mol ⁻¹	80,7 mmol	12,20 mL	1,1 eq
K₂CO₃	138,21 g.mol ⁻¹	110 mmol	15,20 g	1,5 eq
DMF			60 mL	solvant

Protocole :

Une solution d'hydroxyacétophénone, de carbonate de potassium et de 1-bromopentane dans 60 mL de DMF est agitée à reflux pendant 16 heures. A la fin de la réaction, la solution est refroidie jusqu'à température ambiante puis le DMF est évaporé sous pression réduite. Ensuite, le résidu est repris dans 50 mL d'une solution aqueuse de NaOH 1N, puis est extrait à l'AcOEt. Les phases organiques sont lavées à l'eau et séchées sur MgSO₄. L'AcOEt est ensuite évaporé sous pression réduite et le produit obtenu est recristallisé dans l'éthanol absolu.

Formule brute : C₁₃H₁₈O₂

Masse molaire : 206,28 g.mol⁻¹

Rendement : 95%

Aspect : solide blanc

Rf (cyclohexane/AcOEt ; 7/3) : 0,55

Pf : 30°C

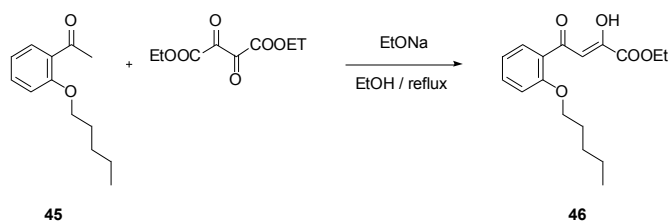
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 7.57 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.48 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.04 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 1.75 (m, 2H), 1.44 - 1.23 (m, 4H), 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 199.1 (C), 159.3 (C), 131.9 (CH), 127.8 (CH), 120.6 (CH), 115.6 (C), 112.0 (CH), 69.1 (CH₂), 31.5 (CH₃), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 22.4 (CH₂), 14.0 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 207,1 (MH⁺).

2-Hydroxy-4-oxo-4-(2-pentoxyphényl)-2-butenoate d'éthyle (46)



Réactifs et solvant :

Composé 45	206,28 g.mol ⁻¹	73,1 mmol	15,09 g	1 eq
Oxalate de diéthyle	146,14 g.mol ⁻¹	146,3 mmol	19,85 mL	2 eq
Sodium	22,99 g.mol ⁻¹	146,3 mmol	3,36 g	2 eq
Ethanol			180 mL	solvant

Protocole :

Le composé **45** et l'oxalate de diéthyle, dilués dans 30 mL d'éthanol absolu, sont ajoutés goutte à goutte dans une solution à 50°C sous agitation mécanique d'éthanolate de sodium, fraîchement préparée à partir de 3,36 g de sodium et de 180 mL d'éthanol absolu. La solution est alors chauffée à reflux pendant 2 heures. Puis, le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est ensuite repris pendant 1 heure dans 150 mL d'une solution aqueuse d'HCl 1N. La solution est ensuite extraite à l'AcOEt et lavée à l'eau. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous pression réduite. Enfin, le résidu est repris dans le cyclohexane pour donner le composé **46**.

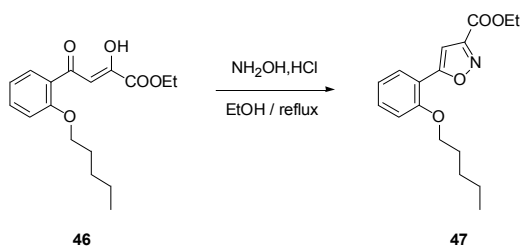
Formule brute : C₁₇H₂₂O₅ **Masse molaire :** 306,35 g.mol⁻¹ **Rendement :** quantitatif
Aspect : solide marron **Rf** (cyclohexane/AcOEt ; 8/2) : 0,59 **Pf :** 106°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 10.68 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.81 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.23 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.28 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.13 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.35 (m, 7H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 191. (C), 159.3 (C), 158.1 (C), 157.3 (C), 132.1 (CH), 127.6 (CH), 120.5 (CH), 115.6 (C), 112.1 (CH), 101.4 (CH), 69.1 (CH₂), 61.4 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 22.4 (CH₂), 14.1 (CH₃), 14.0 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 307,3 (MH⁺).

5-(2-Pentyloxyphényl)-isoxazole-3-carboxylate d'éthyle (47).



Réactifs et solvant :

Composé 46	306,35 g.mol ⁻¹	73,1 mmol	22,40 g	1 eq
Chlorhydrate d'hydroxylamine	69,49 g.mol ⁻¹	73,1 mmol	5,08 g	1 eq
EtOH			160 mL	solvant

Protocole :

Une solution de composé **46** et de chlorhydrate d'hydroxylamine dans 160 mL d'éthanol absolu est agitée à reflux pendant 2 heures. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite puis, le résidu est purifié par chromatographie Flash (cyclohexane/AcOEt 8:2, v/v). Enfin, le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol absolu.

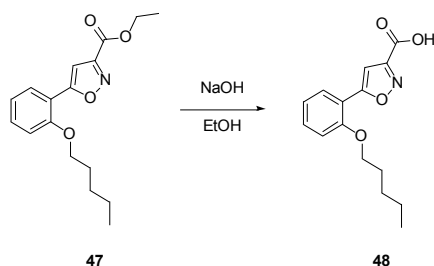
Formule brute : C₁₇H₂₁NO₄ **Masse molaire :** 303,35 g.mol⁻¹ **Rendement :** 85%
Aspect : solide blanc **Rf** (cyclohexane/AcOEt 7/3) : 0,61 **Pf :** 59°C
Recristallisation : éthanol absolu

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D6) δ (ppm) 7.91 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.13 - 7.11 (m, 2H), 4.38 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.16 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.49 - 1.31 (m, 7H), 0.92 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D6) δ (ppm) 169.7 (C), 159.6 (C), 158.0 (C), 151.6 (C), 132.2 (CH), 127.7 (CH), 120.5 (CH), 115.7 (C), 112.3 (CH), 88.7 (CH), 69.1 (CH₂), 61.5 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 22.4 (CH₂), 14.0 (CH₃), 13.9 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 304,1 (MH⁺).

Acide 5-(2-pentyloxyphényl)-isoxazole-3-carboxylique (48)



Réactifs et solvant :

Composé 47	303,35 g.mol ⁻¹	50,63 mmol	15,36 g	1 eq
NaOH	39,99 g.mol ⁻¹	506,33 mmol	20,25 g	10 eq
Ethanol			250 mL	solvant

Protocole :

L'hydroxyde de sodium est ajouté lentement à une solution contenant le composé **47** dans 250 mL d'éthanol à 95 %. La solution est agitée à température ambiante pendant 24 heures. Puis, l'éthanol est évaporé sous pression réduite. Le résidu est acidifié (HCl 1N, pH 2) et extrait à l'AcOEt. Les phases organiques sont ensuite lavées à l'eau et à la saumure, puis séchées sur MgSO₄, et enfin, évaporées sous pression réduite pour donner l'acide carboxylique **48**.

Formule brute : C₁₅H₁₇NO₄

Masse molaire : 275,30 g.mol⁻¹

Rendement : 86%

Aspect : solide blanc

R_f (cyclohexane/AcOEt ; 5/5) : 0,69

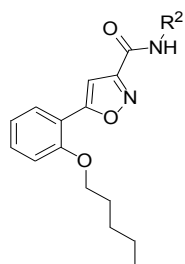
P_f : 129°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 12.78 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.48 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.10 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 4.16 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.81 (m, 2H), 1.48 - 1.33 (m, 4H), 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 170.3 (C), 160.3 (C), 157.4 (C), 152.6 (C), 132.1 (CH), 127.6 (CH), 120.9 (CH), 115.5 (C), 112.3 (CH), 89.6 (CH), 69.1 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 22.4 (CH₂), 14.0 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) m/z 276,3 (MH⁺).

Synthèse des composés 49 à 58

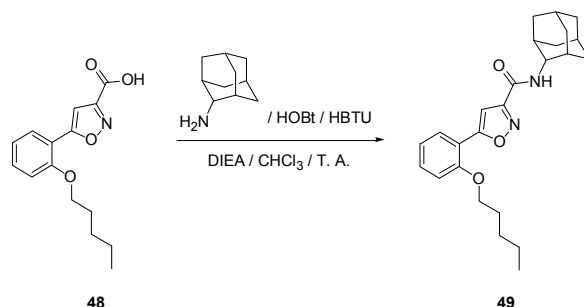


Nom	R ²	Page	Nom	R ²	Page
49		251	54		256
50		252	55		257
51		253	56		258
52		254	57		259
53		255	58		260

Protocole général de synthèse n°3

Une solution de composé **48**, de DIEA, d'HOBt et de HBTU dans le chloroforme anhydre est agitée pendant 45 min à température ambiante. L'amine appropriée est ensuite ajoutée, et la solution est agitée à température ambiante pendant 24 heures. La solution est filtrée et lavée successivement avec une solution aqueuse de NaOH 0,5N, puis avec une solution aqueuse de HCl 1N et de l'eau. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite pour donner une huile brune. Le résidu est purifié par chromatographie sur couche épaisse (CCE) à l'aide d'un mélange cyclohexane / AcOEt 7:3 (v/v) comme éluant. Enfin, le composé désiré est recristallisé dans l'heptane.

***N*-(2-Adamantyl)-5-(2-pentoxyphényl)-isoxazole-3-carboxamide (49)**



Réactifs et solvant :

Composé 48	275,30 g.mol ⁻¹	0,73 mmol	150 mg	1 eq
Chlorhydrate de 2-adamantanamine	187,71 g.mol ⁻¹	0,87 mmol	164 mg	1,2 eq
HOBT	135,12 g.mol ⁻¹	0,36 mmol	49 mg	0,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	1,09 mmol	413 mg	1,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	2,18 mmol	375 µL	3 eq
Chloroforme			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°3 page 250

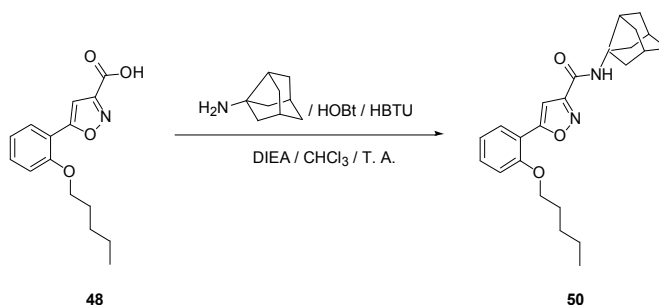
Formule brute : C₂₅H₃₂N₂O₃ **Masse molaire :** 408,53 g.mol⁻¹ **Rendement :** 32%
Aspect : solide blanc **R_f** (cyclohexane/AcOEt ; 7/3) : 0,81 **P_f** : 68°C
Recristallisation : *n*-heptane

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.97 (dd, *J* = 1.7, 7.9 Hz, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.19 (br. s, 1H), 7.08 – 6.99 (m, 2H), 4.26 (m, 1H), 4.12 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.07 (br. s, 2H), 1.95 – 1.90 (m, 10H), 1.78 (br. s, 2H), 1.72 (br. s, 1H), 1.68 (br. s, 1H), 1.52 – 1.38 (m, 4H), 0.95 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 167.8 (C), 159.5 (C), 158.4 (C), 155.9 (C), 131.6 (CH), 127.6 (CH), 120.6 (CH), 115.9 (C), 112.1 (CH), 103.0 (CH), 68.7 (CH₂), 53.53 (CH), 37.5 (CH₂), 37.1 (2CH₂), 31.9 (2CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.2 (2CH), 27.1 (2CH), 22.4 (CH₂), 14.0 (CH₃).

HRMS (FTMS + *p* ESI Full ms) *m/z* 409,24811 (MH⁺).

N-(3-Noradamantyl)-5-(2-pentoxyphényl)-isoxazole-3-carboxamide (50)



Réactifs et solvant :

Composé 48	275,30 g.mol ⁻¹	0,73 mmol	150 mg	1 eq
Chlorhydrate de 3-noradamantanamine	173,68 g.mol ⁻¹	7,99 mmol	139 mg	1,1 eq
HOBT	135,12 g.mol ⁻¹	0,36 mmol	49 mg	0,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	1,09 mmol	413 mg	1,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	13,7 mmol	2,4 mL	19 eq
Chloroforme			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°3 page 250

Formule brute : C₂₄H₃₀N₂O₃

Masse molaire : 394,51 g.mol⁻¹

Rendement : 56%

Aspect : solide blanc

Rf (cyclohexane/AcOEt ; 7/3) : 0,79

Pf : 101°C

Recristallisation : *n*-heptane

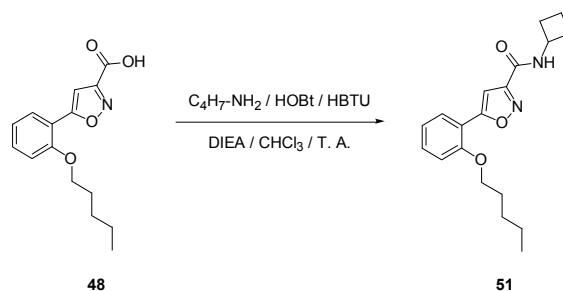
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.97 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.04 (m, 3H), 4.11 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.60 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 2.34 (br. s, 2H), 2.22 (m, 2H), 2.14 – 2.01 (m, 4H), 1.93 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.70 – 1.59 (m, 4H), 1.49 – 1.35 (m, 4H), 0.95 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 167.7 (C), 159.8 (C), 158.8 (C), 155.9 (C), 131.6 (CH), 127.6 (CH), 120.6 (CH), 115.9 (C), 112.1 (CH), 102.8 (CH), 68.7 (CH₂), 65.0 (C), 48.6 (2CH₂), 43.7 (CH), 43.3 (2CH₂), 37.4 (2CH), 34.7 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.1 (CH₂), 22.4 (CH₂), 14.0 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 395,1 (MH⁺).

HRMS (FTMS + *p* ESI Full *ms*) *m/z* 395,23193 (MH⁺).

N-Cyclobutyl-5-(2-pentoxyphényl)-isoxazole-3-carboxamide (51)



Réactifs et solvant :

Composé 48	275,30 g.mol ⁻¹	0,73 mmol	200 mg	1 eq
Cyclobutylamine	71,12 g.mol ⁻¹	0,80 mmol	68 µL	1,1 eq
HOBt	135,12 g.mol ⁻¹	0,36 mmol	49 mg	0,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	1,09 mmol	413 mg	1,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	1,45 mmol	255 µL	2 eq
Chloroforme			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°3 page 250

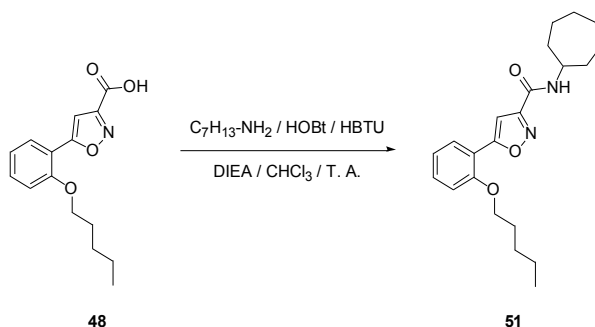
Formule brute : C₁₉H₂₄N₂O₃ **Masse molaire :** 328,40 g.mol⁻¹ **Rendement :** 77%
Aspect : solide blanc **Rf** (cyclohexane/AcOEt ; 7/3) : 0,67 **Pf :** 131°C
Recristallisation : n-heptane

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.97 (dd, *J* = 1.7, 7.9 Hz, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.08 – 6.96 (m, 3H), 4.59 (quint, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.11 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.43 (m, 2H), 2.07 – 1.75 (m, 6H), 1.50 – 1.40 (m, 4H), 0.95 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 167.8 (C), 159.1 (C), 158.3 (C), 155.9 (C), 131.7 (CH), 127.6 (CH), 120.6 (CH), 115.9 (C), 112.1 (CH), 103.0 (CH), 68.7 (CH₂), 44.7 (CH), 31.1 (2CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 22.4 (CH₂), 15.3 (CH₂), 14.0 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) m/z 329,2 (MH⁺).

N-Cycloheptyl-5-(2-pentoxyphényl)-isoxazole-3-carboxamide (52)



Réactifs et solvant :

Composé 48	275,30 g.mol ⁻¹	0,55 mmol	150 mg	1 eq
Cycloheptylamine	113,20 g.mol ⁻¹	0,60 mmol	77 µL	1,1 eq
HOBt	135,12 g.mol ⁻¹	0,27 mmol	37 mg	1,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	0,82 mmol	310 mg	0,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	1,09 mmol	190 µL	2 eq
Chloroforme			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°3 page 250

Formule brute : C₂₂H₃₀N₂O₃ **Masse molaire :** 370,48 g.mol⁻¹ **Rendement :** 32%
Aspect : solide blanc **Rf** (cyclohexane/AcOEt ; 7/3) : 0,74 **Pf :** 109°C
Recristallisation : *n*-heptane

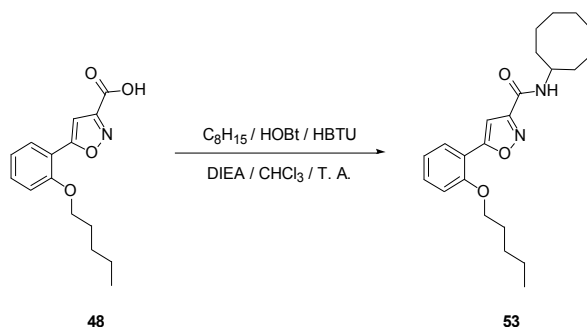
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.96 (dd, *J* = 1.7, 7.9 Hz, 1H), 7.40 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.04 (m, 2H), 6.80 (br. s, 1H), 4.17 (br. s, 1H), 4.11 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.04 (m, 2H), 1.92 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.71 – 1.58 (m, 8H), 1.55 – 1.37 (m, 6H), 0.95 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 167.7 (C), 159.5 (C), 158.1 (C), 155.9 (C), 131.6 (CH), 127.6 (CH), 120.6 (CH), 115.9 (C), 112.1 (CH), 103.0 (CH), 68.7 (CH₂), 50.6 (CH), 34.9 (2CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.1 (2CH₂), 24.1 (2CH₂), 22.4 (CH₂), 14.0 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 371,3 (MH⁺).

HRMS (FTMS + *p* ESI Full *ms*) *m/z* 371,23216 (MH⁺).

N-Cyclooctyl-5-(2-pentoxyphényl)-isoxazole-3-carboxamide (53)



Réactifs et solvant :

Composé 48	275,30 g.mol ⁻¹	0,73 mmol	200 mg	1 eq
Cyclooctylamine	127,20 g.mol ⁻¹	0,80 mmol	112 µL	1,1 eq
HOBt	135,12 g.mol ⁻¹	0,36 mmol	49 mg	0,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	1,09 mmol	413 mg	1,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	2,18 mmol	375 µL	3 eq
Chloroforme			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°3 page 250

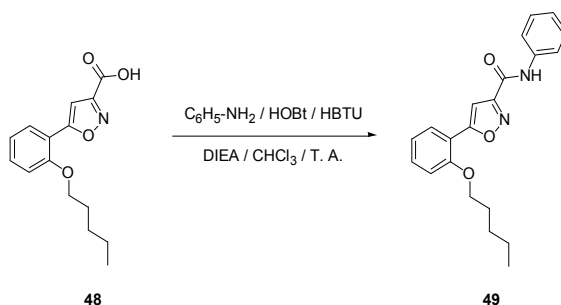
Formule brute : C₂₃H₃₂N₂O₃ **Masse molaire :** 384,51 g.mol⁻¹ **Rendement :** 43%
Aspect : solide blanc **Rf** (cyclohexane/AcOEt ; 7/3) : 0,72 **Pf :** 104°C
Recristallisation : *n*-heptane

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.97 (dd, *J* = 1.7, 7.9 Hz, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.06 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.25 – 4.17 (m, 1H), 4.12 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.00 – 1.88 (m, 4H), 1.75 – 1.59 (m, 12H), 1.52 – 1.38 (m, 4H), 0.96 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 167.7 (C), 159.5 (C), 158.1 (C), 155.9 (C), 131.6 (CH), 127.6 (CH), 120.6 (CH), 115.9 (C), 112.1 (CH), 103.0 (CH), 68.7 (CH₂), 49.6 (CH), 32.1 (2CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.2 (2CH₂), 25.5 (CH₂), 23.7 (2CH₂), 22.4 (CH₂), 14.0 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 385,6 (MH⁺).

5-(2-Pentoxyphényl)-*N*-phényl-isoxazole-3-carboxamide (54)



Réactifs et solvant :

Composé 48	275,30 g.mol ⁻¹	0,55 mmol	150 mg	1 eq
Aniline	93,13 g.mol ⁻¹	0,60 mmol	55 µL	1,1 eq
HOBt	135,12 g.mol ⁻¹	0,27 mmol	37 mg	0,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	0,82 mmol	310 mg	1,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	1,09 mmol	190 µL	2 eq
Chloroforme			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°3 page 250

Formule brute : C₂₁H₂₂N₂O₃

Masse molaire : 350,41 g.mol⁻¹

Rendement : 19%

Aspect : solide blanc

R_f (cyclohexane/AcOEt ; 7/3) : 0,70

P_f : 95°C

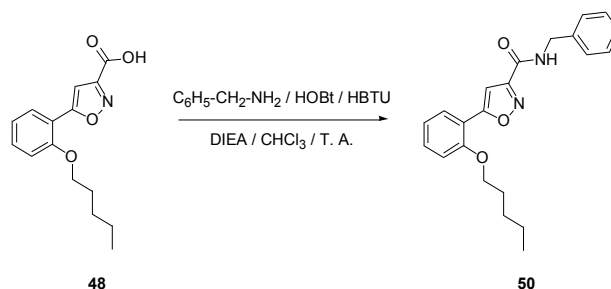
Recristallisation : *n*-heptane

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.60 (br. s, 1H), 8.00 (dd, *J* = 1.7, 7.9 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.42 (m, 3H), 7.31 (s, 1H), 7.22 – 7.02 (m, 3H), 4.15 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.96 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.53 – 1.40 (m, 4H), 0.97 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 168.4 (C), 159.4 (C), 157.1 (C), 156.0 (C), 137.2 (C), 131.9 (CH), 129.2 (2CH), 127.7 (CH), 124.9 (CH), 120.6 (CH), 120.0 (2CH), 115.7 (C), 112.1 (CH), 103.0 (CH), 68.7 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 22.4 (CH₂), 14.0 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 351,2 (MH⁺).

N-Benzyl-5-(2-pentoxyphényl)-isoxazole-3-carboxamide (55)



Réactifs et solvant :

Composé 48	275,30 g.mol ⁻¹	0,55 mmol	150 mg	1 eq
Benzylamine	107,15 g.mol ⁻¹	0,60 mmol	66 µL	1,1 eq
HOBt	135,12 g.mol ⁻¹	0,27 mmol	37 mg	0,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	0,82 mmol	310 mg	1,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	1,09 mmol	190 µL	2 eq
Chloroforme			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°3 page 250

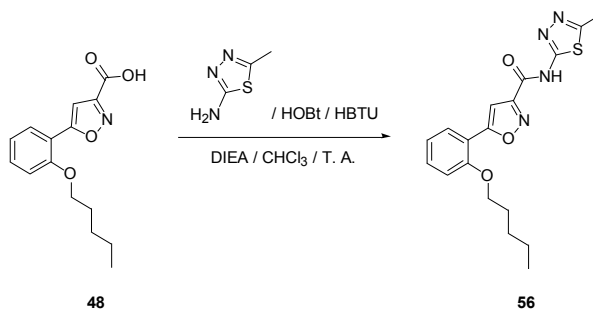
Formule brute : C₂₂H₂₄N₂O₃ **Masse molaire :** 364,44 g.mol⁻¹ **Rendement :** 74%
Aspect : solide blanc **Rf** (cyclohexane/AcOEt ; 7/3) : 0,64 **Pf :** 118°C
Recristallisation : n-heptane

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.96 (dd, *J* = 1.7, 7.9 Hz, 1H), 7.44 – 7.30 (m, 6H), 7.24 (s, 1H), 7.17 (br. s, 1H), 7.04 (m, 2H), 4.66 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.12 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.93 (quint, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.52 – 1.38 (m, 4H), 0.96 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 167.9 (C), 159.3 (C), 159.0 (C), 155.9 (C), 137.5 (C), 131.7 (CH), 128.8 (2CH), 127.9 (2CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 120.6 (CH), 115.8 (C), 112.1 (CH), 103.0 (CH), 68.7 (CH₂), 43.5 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 22.4 (CH₂), 14.0 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) m/z 365,2 (MH⁺).

N-(5-Méthyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-5-(2-pentoxyphényl)-isoxazole-3-carboxamide (56)



Réactifs et solvant :

Composé 48	275,30 g.mol ⁻¹	0,55 mmol	150 mg	1 eq
5-Méthyl-1,3,4-thiadiazole-2-amine	115,15 g.mol ⁻¹	0,60 mmol	69 mg	1,1 eq
HOBT	135,12 g.mol ⁻¹	0,27 mmol	37 mg	0,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	0,82 mmol	310 mg	1,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	1,09 mmol	190 µL	2 eq
Chloroforme			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°3 page 250

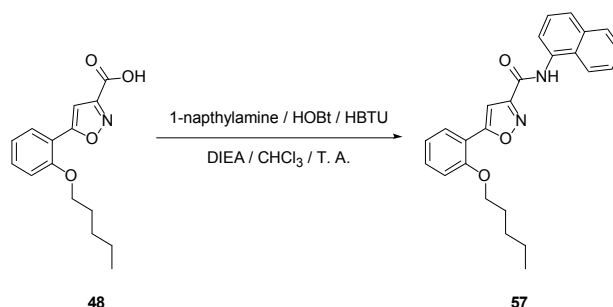
Formule brute : C₁₈H₂₀N₄O₃S **Masse molaire :** 372,44 g.mol⁻¹ **Rendement :** 24%
Aspect : solide blanc **Rf** (cyclohexane/AcOEt ; 7/3) : 0,21 **Pf :** 73°C
Recristallisation : n-heptane

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 10.20 (br. s, 1H), 8.02 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.46 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.10 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.15 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.77 (s, 3H), 1.95 (quint, J = 7.1 Hz, 2H), 1.54 – 1.38 (m, 4H), 0.97 (t, J = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 169.1 (C), 161.0 (C), 157.6 (C), 157.2 (C), 156.8 (C), 156.0 (C), 132.2 (CH), 127.7 (CH), 120.7 (CH), 115.3 (C), 112.1 (CH), 102.8 (CH), 68.7 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 22.4 (CH₂), 15.4 (CH₃), 14.0 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) m/z 373,1 (MH⁺).

(Naphthalen-1-yl)-5-(2-pentyloxy-phényl)-isoxazole-3-carboxamide (57)



Réactifs et solvant :

Composé 48	275,30 g.mol ⁻¹	0,99 mmol	275 mg	1 eq
1-Naphtylamine	143,19 g.mol ⁻¹	1,10 mmol	157 mg	1,1 eq
HOBt	135,12 g.mol ⁻¹	0,50 mmol	68 mg	0,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	1,50 mmol	568 mg	1,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	2,0 mmol	346 µL	2 eq
Chloroforme			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°3 page 250

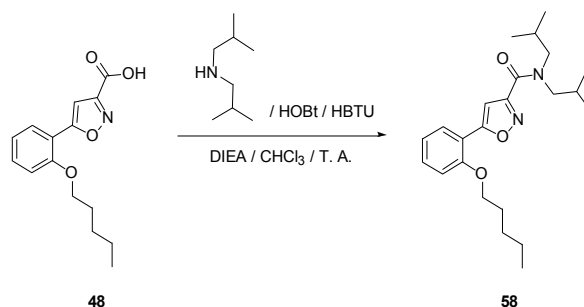
Formule brute : C₂₅H₂₄N₂O₃ **Masse molaire :** 400,47 g.mol⁻¹ **Rendement :** 25%
Aspect : solide violet **Rf** (cyclohexane/AcOEt ; 5/5) : 0,87 **Pf :** 89°C
Recristallisation : *n*-heptane

¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm) 10.88 (s, 1H), 8.02 – 7.95 (m, 3H), 7.90 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.60 – 7.49 (m, 4H), 7.25 – 7.19 (m, 2H), 7.14 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.16 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.83 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.50 – 1.29 (m, 4H), 0.98 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 168.6 (C), 159.3 (C), 157.1 (C), 156.3 (C), 137.3 (C), 136.8 (C), 130.7 (CH), 128.4 – 127.8 (4CH), 125.4 (CH), 123.2 (CH), 122.7 (CH), 120.8 (CH), 117.0 (CH), 115.8 (C), 112.1 (CH), 110.4 (C), 103.0 (CH), 68.9 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.3 (CH₂), 22.5 (CH₂), 14.0 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 401,1 (MH⁺).

***N,N*-Diisobutyl-5-(2-pentoxyphényl)-isoxazole-3-carboxamide (58)**



Réactifs et solvant :

Composé 48	275,30 g.mol ⁻¹	0,73 mmol	200 mg	1 eq
Diisobutylamine	129,25 g.mol ⁻¹	0,80 mmol	140 µL	1,1 eq
HOBt	135,12 g.mol ⁻¹	0,36 mmol	49 mg	0,5 eq
HBTU	379,25 g.mol ⁻¹	1,09 mmol	413 mg	1,5 eq
DIEA	129,25 g.mol ⁻¹	1,45 mmol	255 µL	2 eq
Chloroforme			20 mL	solvant

Protocole :

Voir le protocole général de synthèse n°3 page 250

Formule brute : C₂₃H₃₄N₂O₃ **Masse molaire :** 386,54 g.mol⁻¹ **Rendement :** 25%
Aspect : huile jaune **R_f** (cyclohexane/AcOEt ; 7/3) : 0,54

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.99 (dd, *J* = 1.8, 7.9 Hz, 1H), 7.39 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.05 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.01 – 6.98 (m, 2H), 4.10 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.50 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.40 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.16 (m, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.90 (m, 3H), 1.51 – 1.35 (m, 4H), 0.99 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), 0.93 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 166.2 (C), 162.2 (C), 159.9 (C), 155.9 (C), 131.5 (CH), 127.7 (CH), 120.6 (CH), 115.9 (C), 112.0 (CH), 104.4 (CH), 68.6 (CH₂), 56.0 (CH₂), 53.0 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.3 (CH₂), 27.5 (CH), 26.4 (CH), 22.4 (CH₂), 20.2 (2CH₃), 19.8 (2CH₃), 14.0 (CH₃).

LC-MS (APCI⁺) *m/z* 387,2 (MH⁺).

IV. Test de fonctionnalité au [³⁵S]-GTPγS

Les tests ont été effectués à 30°C dans des tubes contenant 10 µg de membrane dans 500 µL (volume final) de tampon (20 mM Hepes, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 % d'albumine de sérum bovin, pH 7,4) plus 30 µM de GDP. Ce test est initié par l'ajout de [³⁵S]-GTPγS (0,1 nM, concentration finale). Après 1 heure à 30°C, l'incubation est stoppée et les solutions sont rapidement filtrées sur « Unifilter-96 GF/B glass fiber » et lavées 20 fois au tampon froid. Ensuite, 60 µL de liquide scintillant sont ajoutés sur chaque puits de la plaque filtrante. Enfin après 30 min au froid, la radioactivité sur la plaque filtrante a été mesurée à l'aide du « TopCount NXT™ Microplate Scintillation Counter » (PerkinElmer). Le (R)-(+)-WIN 55,212-2 (cf. figure 143) a été utilisé comme composé agoniste de référence des récepteurs CB₁ et CB₂. Les tests ont été effectués en « triplicate ». La liaison non-spécifique a été mesurée en présence de 100 µM de Gpp(NH)p. Les résultats sont exprimés en EC₅₀ (nM) et E_{max}. La valeur de l'EC₅₀ a été évaluée par régression non linéaire *via* le programme « GraphPad prism 5.0 » (GraphPad Software, San Diego).

V. Culture cellulaire et test de prolifération cellulaire

Les cellules cancéreuses du côlon (HT29) sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ dans un milieu DMEM + Glutamax-I (Gibco) plus 10 % de sérum de fœtus bovin, de pénicilline (100 IU/mL), et de streptomycine (100 µg/mL). Lors du test de prolifération cellulaire, les cellules sont mises en plaques 96-puits en « triplicate » (3000 cellules/puit) puis incubées pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite incubées dans des milieux de culture qui contiennent différentes concentrations de composés à tester, ceux-ci étant dissous dans moins de 0,1 % de DMSO. Après 72 heures, la prolifération cellulaire est estimée par test colorimétrique au MTS.

VI. Les animaux

Les souris mâles C57BL6, âgées de 7 semaines, proviennent de chez « JANVIER Laboratory » (Le Genest St. Isle, France). Les animaux ont été maintenus dans des conditions stériles. Ils ont eu accès à de l'eau standard du robinet et à de la nourriture *ad libitum*. Tous les animaux ont été approuvés par le programme local d'éthique et de protection animale, et sont en accord avec la convention européenne sur la protection des animaux destinés à la recherche.

VII. Induction et détermination du score de la colite

La colite a été induite avec le DSS 2,5 % w/v (masse moléculaire 35 - 50 kDa), dissous dans l'eau distillée et stérile, donnée à volonté pendant 7 jours. Les solutions de DSS sont refaites tous les 2 jours. La masse corporelle a été déterminée régulièrement. Au 7^{ème} jour, l'indice d'activité de la maladie (DAI) a été mesuré en additionnant les scores de la variation de la masse corporelle, de la consistance des selles et des saignements rectaux, déterminés selon le tableau 16. Les saignements rectaux ont été mesurés par « ColoScreen III Lab Pack » (Elitech). Le DAI est compris entre 0 (bonne santé) et 18 (très forte activité de la colite).

Tableau 16. Détermination de l'indice d'activité de la maladie dans un modèle de colite induite au DSS

Score	Perte de poids	Consistance des selles	Saignements
0	Pas de perte de poids	Boulettes bien-formées	Pas de sang par test « Hemocult »
1	Perte de poids de 1 - 5%		
2	6-10%	Selles semi-formées qui n'adhèrent pas à l'anus	« Hemocult » positif
3	11-15%		
4	16-20%	Selles semi-formées qui adhèrent à l'anus	Traces de sang visibles dans les selles
5	21-25%		
6	Plus de 25%	Selles liquides qui adhèrent à l'anus	Saignement rectal brut

VIII. Analyses histopathologiques

Les sections de côlon, préservées à la formaline, sont enrobées de paraffine selon les techniques standards. Les sections longitudinales de 4 µm d'épaisseur sont imbibées avec du « May Grünwald Giemsa » et examinées à l'aveugle. Les lésions histologiques ont été déterminées en utilisant un score quantifiant l'intensité de l'infiltration de cellules inflammatoires (score 0 - 3) et les dommages causés aux tissus (score 0 - 3). Concrètement, la présence occasionnelle de cellules inflammatoires dans le lamina propria est scorée à 0, un nombre plus important de cellules inflammatoires dans la lamina propria à 1, la confluence des cellules inflammatoires étendues à la sous-muqueuse à 2, et l'extension transmurale de l'infiltration à 3. Pour les dommages aux tissus, les scores sont déterminés selon : pas de dommage aux muqueuses, 0 ; lésions lymphoépithéliales, 1; érosion de la surface de la muqueuse ou ulcération focale, 2; dommage étendu à la muqueuse et extension aux structures profondes de la paroi intestinale, 3. Le score histologique combiné varie de 0 (pas de changement) à 6 (infiltrations extensives et dommages aux tissus).

IX. Extraction de l'ARN et qPCR en temps-réel

L'ARN total a été extrait d'échantillons de côlon avec le kit « NucleoSpin RNAII » (Macherey-Nagel). L'ADNc a été préparé avec le kit « High Capacity cDNA Archive » et la qPCR en temps-réel a été effectuée à l'aide de « SyBrGreen » (Applied Biosystems). Enfin, l'ARN polymérase II (PolR2A) a été utilisée comme gène référence et les séquences primaires sont listées dans le tableau 17 ci-dessous.

Tableau 17. Séquences primaires utilisées pour l'étude

Nom	Séquence nucléotidique	Séquence nucléotidique inverse
mPolR2A	CCCACAACCAGCTATCCTCAA	GGTGCTGTGGGTACGGATACA
mTnf- α	CCACCACGCTCTTCTGTCTA	GAGGCCATTTGGGAACTTCT
mIL-1 β	AGCTCTCCACCTCAATGGAC	AGGCCACAGGTATTTTGTCG
mKc	GGCGCCTATCGCCAATG	CTGGATGTTCTTGAGGTGAATCC

X. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées par les tests U de Mann et Whitney, à l'exception de la variation de la masse corporelle pour laquelle un test « Two-way RM ANOVA » a été utilisé.

Développement de nouveaux ligands sélectifs des récepteurs CB₂ et de nouveaux inhibiteurs de la fatty acid amide hydrolase dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupant notamment la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, touchent plus de 2,2 millions de personnes en Europe d'après l'EFCCA. La région Nord Pas-de-Calais est particulièrement touchée par ces affections et les traitements disponibles pour ces pathologies demeurent coûteux et peu nombreux. Plusieurs études ont récemment montré l'intérêt du système endocannabinoïde comme cible thérapeutique dans le traitement des MICI. Ce système comprend deux récepteurs aux cannabinoïdes CB₁ et CB₂, des ligands endogènes comme l'anandamide et le 2-arachidonoylglycérol, ainsi que des protéines de biosynthèse et de dégradation de ces ligands. L'anandamide et des agonistes sélectifs du récepteur CB₂, comme le JWH-133, ont notamment présenté une diminution de l'inflammation du côlon dans des modèles murins de colite. Nous avons alors envisagé la conception, la synthèse et l'évaluation pharmacologique de nouveaux agonistes sélectifs du récepteur CB₂ et de nouveaux inhibiteurs de la FAAH, l'enzyme de dégradation de l'anandamide. Ainsi, deux séries d'inhibiteurs de la FAAH (séries A et B) et une série d'agonistes sélectifs du récepteur CB₂ (série C) ont été développées. Les séries A et B ont révélé de nouveaux inhibiteurs de la FAAH actifs au nanomolaire et ont permis l'établissement de nouvelles relations structure-activité. La série C a permis la découverte des composés **50** et **52**, deux agonistes sélectifs du récepteur CB₂. Dans un modèle murin de colite induite au DSS, les souris traitées avec les composés **50** et **52** ont montré une forte réduction de l'inflammation et une diminution des taux de cytokines IL-1 β et Kc confirmant que le récepteur CB₂ est une cible thérapeutique de choix pour le traitement des MICI.

Mots clés : MICI, récepteur CB₂, FAAH, système endocannabinoïde.

Development of new CB₂-selective receptor ligands and new inhibitors of the fatty acid amide hydrolase in the treatment of inflammatory bowel diseases

Inflammatory bowel diseases (IBD), mainly including the Crohn's disease and the ulcerative colitis, affect more than 2.2 million people in Europe according to EFCCA. The Nord Pas-de-Calais region is particularly affected by these diseases and available treatments remain expensive and limited. Several recent studies have shown the interest of the endocannabinoid system as a therapeutic target in the treatment of IBD. This system consists in two cannabinoid receptors, CB₁ and CB₂, endogeneous ligands as anandamide and 2-arachidonoylglycerol, as well as enzymes involved in biosynthesis and degradation of these ligands. Anandamide and CB₂-selective receptor agonists, such as JWH-133, reduce inflammation in murine models of colitis. Therefore, we decided to design, synthesize and evaluate new CB₂-selective receptor agonists and new FAAH inhibitors, the anandamide-degradation enzyme. Thus, two series of inhibitors of FAAH (series A and B) and a series of CB₂-selective receptor agonists (series C) have been developed. Series A and B have revealed new nanomolar FAAH inhibitors and allowed the establishment of new structure-activity relationships. Series C led to the discovery of compounds **50** and **52**, two CB₂-selective receptor agonists. In a mouse model of DSS-induced colitis, mice treated with compounds **50** and **52** have shown a significant reduction of inflammation and a decrease in IL-1 β and Kc levels, confirming that the CB₂ receptor is an attractive therapeutic target for the treatment of IBD.

Keywords: IBD, CB₂ receptor, FAAH, endocannabinoid system.