



HAL
open science

Conception, développement et synthèse de ligands du TSPO dans le but de traiter les maladies neurodégénératives

François Hallé

► **To cite this version:**

François Hallé. Conception, développement et synthèse de ligands du TSPO dans le but de traiter les maladies neurodégénératives. Autre. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAF054 . tel-01340864

HAL Id: tel-01340864

<https://theses.hal.science/tel-01340864>

Submitted on 2 Jul 2016

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
UMR7200 – Laboratoire d’Innovation Thérapeutique

THÈSE présentée par :

François HALLÉ

soutenue le : **3 décembre 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l’université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie Organique / Chimie Biologique et Thérapeutique

**Conception, développement et
synthèse de ligands du TSPO dans le
but de traiter les maladies
neurodégénératives**

THÈSE dirigée par :

BIHEL Frédéric

Chargé de recherches CNRS, Université de Strasbourg

SCHMITT Martine

Chargé de recherches CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

AUCAGNE Vincent

Chargé de recherches CNRS, CNRS Orléans

DALLEMAGNE Patrick

Professeur, Université de Caen

AUTRES MEMBRES DU JURY :

LACAPÈRE Jean-Jacques

Directeur de recherches CNRS, Université Pierre et Marie Curie

MIESCH Michel

Directeur de recherches CNRS, Université de Strasbourg

Table des matières

Table des matières.....	1
Remerciements.....	8
Abréviations.....	10
Partie A - Introduction au TSPO	14
1. Présentation du TSPO.....	15
1.1. Historique.....	15
2. Fonction du TSPO.....	17
2.1. Localisation.....	17
2.2. Structure de la protéine TSPO seule	17
2.3. Structure du complexe actif.....	20
2.4. Translocation du cholestérol – effet des neurostéroïdes.....	21
2.5. L’allopregnalone, un neurostéroïde aux effets prometteurs	23
3. Implication physiologique du TSPO	24
3.1. Une fonction décrite mais un rôle fortement débattu	24
3.2. Ligands endogènes du TSPO	25
4. Niveaux d’expression du TSPO lors de troubles neuropsychiatriques⁵³.....	27
4.1. Lésions du système nerveux périphérique	27
4.2. Lésions cérébrales.....	27
4.3. Maladies neurodégénératives.....	28
4.4. Tumeurs cérébrales.....	28
4.5. Troubles psychiatriques	28
5. Les ligands du TSPO et leurs utilisations.....	29
5.1. Ligands par famille chimique ⁹⁸	29
5.1.1. Benzodiazépines	29
5.2. (Iso)quinoline carboxamide.....	30
5.3. Benzothiazépines	30
5.4. Benzoxazépines.....	31
5.5. Phenoxyphenyl acétamide.....	31

5.6. Indole acétamide et dérivés.....	32
5.7. Imidazopyridines	33
5.8. Pyrazolopyrimidines.....	34
5.9. Benzoxazine.....	34
5.10. Purines - XBD173.....	35
5.10.1. Etudes cliniques du XBD-173 ¹²⁰	35
6. Utilisation des ligands TSPO en thérapeutique.....	36
6.1. Neuroinflammation ⁵³	36
6.2. Lésions du système nerveux périphérique	37
6.3. Lésions cérébrales	38
6.4. Maladies neurodégénératives.....	38
6.5. Tumeurs cérébrales.....	39
6.6. Troubles Psychiatriques	40
7. Le « paradoxe » fonctionnel du TSPO : un enjeu pour le développement thérapeutique	40
8. Conclusion.....	41
Objectifs.....	42
Partie B - Développement de ligands du TSPO comme agents neuroprotecteurs.....	46
1. Objectifs	47
2. Les imidazo[1,2-c]quinazolinones développées par le Dr. Mustapha Abarghaz .	47
2.1. Concept	47
2.2. Synthèse des imidazo[1,2-c]quinazolin-5-ones.....	48
2.3. Etude RSA autours des imidazo[1,2-c]quinazolinones.....	49
2.4. Etudes fonctionnelles des imidazo[1,2-c]quinazolin-2-ones	51
2.4.1. Synthèse du Ro5-4864.....	52
2.4.2. Synthèse du XBD-173	52
2.4.3. Synthèse du SSR-180,575	53
2.4.4. Mesure de la production de prégnénolone	54

2.4.5. Effets des ligands de TSPO sur l'activité mitochondriale en conditions normales ou pathologiques (modèle Alzheimer).....	58
2.4.5.1. Généralités sur la mitochondrie ¹⁶⁷	58
2.4.5.2. Impact de la maladie d'Alzheimer sur la respiration mitochondriale.....	59
2.4.5.3. Effets des ligands TSPO sur la respiration mitochondriale.....	60
2.4.5.4. Effets sur la réponse au stress oxydant.....	62
2.5. Propriétés physico-chimiques.....	65
2.6. Dérivés de phénylalanine.....	68
2.6.1. Introduction.....	68
2.6.2. Synthèse et Etudes des RSA.....	69
2.6.2.1. Modification de la partie C-terminale.....	69
2.6.2.2. Modification partie N-terminale.....	71
2.6.2.3. Modifications sur la chaîne latérale.....	71
2.6.1. Solubilité.....	72
2.6.2. Conclusion et perspectives.....	72
2.7. Séquence DBI, retour aux peptides.....	73
2.7.1. Synthèse de peptides modifiés.....	74
2.8. Dihydroquinolinones.....	76
3. Conclusions et perspectives.....	79
Partie C - TSPO2 et malaria.....	81
1. Introduction.....	82
1.1. Le paludisme ¹⁹³	82
1.2. TSPO2 et Erythrocytes.....	83
1.3. TSPO2 et <i>P. falciparum</i>	85
2. Effet des ligands du TSPO sur les GR infectés au <i>P. falciparum</i>.....	85
2.1. Effet de l'infection sur l'affinité du Ro5-4864 et SSR-180,575.....	86
2.2. Les ligands du TSPO inhibent la croissance du parasite.....	86
2.2.1. Ligands de référence.....	86
2.2.2. Ligands du laboratoire.....	87
2.3. Les ligands du TSPO modulent le transport de la ZnPPiX.....	88

2.4. L'accumulation de Zn-PPIX induit une production de ROS.....	88
2.5. Discussion.....	89
3. Conclusion.....	89
Partie D - Méthodologie de synthèse des 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-ones	90
1. Introduction – Etat de l'art.....	91
1.1. Méthodes racémiques	91
1.2. Méthodes respectant la chiralité.....	93
1.3. Objectifs	93
1.4. Réaction de Buchwald-Hartwig.....	94
2. Développement de la réaction en phase liquide	96
2.1. Préparation du substrat	96
2.2. Screening des conditions.....	97
2.3. Racémisation.....	103
2.4. Scope de la réaction	104
3. Transfert vers la phase solide	107
3.1. Première mise au point.....	107
3.2. Deuxième mise au point	113
Partie E - Benzodiazépines dans l'inhibition de la PDE5.....	116
1. Introduction : généralités sur les Phosphodiésterases.....	117
2. Du TSPO aux PDEs.....	119
2.1. Analyses et stratégies.....	121
2.2. Modifications sur les 1,4-Benzodiazépin-2-ones	121
2.2.1. Méthodes générales de synthèse	122
2.2.1.1. Exploration des substituants en position 1 (Nord)	122
2.2.1.2. Exploration des substituants en position Sud et Ouest	123
2.2.2. Résultats	125
2.3. 2,3-benzodiazépin-4-ones.....	129
2.3.1. Synthèses	129

2.3.2. Résultats des 2,3-benzodiazépin-4-ones	130
2.4. Conclusion sur la RSA autour du Ro5-4864.....	131
Partie F - Zolpidem et fluorophore	133
1. Introduction.....	134
1.1. Fluorescence	134
1.2. FRET.....	136
1.3. Technologie HTRF® de CisBio Assays	136
2. Conception du ligand – Zolpidem et CBR	137
3. Stratégie et synthèses	138
3.1. Fluorophores utilisés.....	138
3.2. Bras espaceurs.....	139
3.3. Linker et Fluorophore en position 6.....	140
3.4. Synthèse – linker en position 4'	143
3.5. Synthèse – linker en position amide.....	144
4. Résultats et conclusion.....	146
Conclusion générale.....	147
Annexe 1 : Synthèse sur support solide.....	150
1. Généralités sur la synthèse sur support solide	151
1.1. Matrice	151
1.2. Groupement fonctionnel	151
1.3. Stratégie de synthèse.....	152
2. Méthode utilisée au laboratoire.....	152
2.1. Couplage peptidique	153
2.2. Lavages	153
2.3. Suivi des réactions.....	153
2.4. Déprotection	154
2.5. Clivage	154
Annexe 2 : Test ELISA.....	155

1. Principe du test ELISA - Prénénolone.....	156
2. Protocole expérimental.....	157
Annexe 3 : RMN 2D.....	158
Partie expérimentale	161
Bibliographie.....	229

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR7200) dans l'équipe de chimie biologique intégrative et dirigée par Mr. Frédéric Bihel et Mme Martine Schmitt et financée par une allocation du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche.

Je tiens tout d'abord à remercier Mr Frédéric Bihel, qui, par sa patience, sa disponibilité et son organisation, a pris à cœur l'encadrement de ce travail et a su me prodiguer la bonne philosophie depuis le début de ces 3 ans. Je tiens aussi à remercier Mme Martine Schmitt pour son expertise et ses conseils éclairés qu'elle a su me prodiguer tout au long de ces 3 années.

Je voudrai également remercier Mr Jean-Jacques Bourguignon pour sa curiosité, sa jeunesse et son imagination, essentielles pour la passion qui l'anime.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma reconnaissance envers les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : Mr. Vincent Aucagne, Mr. Patrick Dallemagne, Mr. Jean-Jacques Lacapère et Mr. Michel Miesch.

Je remercie vivement Mme Anne Eckert, qui a su me faire confiance pour la réalisation de certaines expérimentations dans son laboratoire ainsi que sa doctorante, Imane Lejri, qui a réalisée de nombreuses expériences présentées dans ce rapport et a su m'apporter ses conseils et son expertise biologique quand elle m'a accueilli à Bale.

Je remercie Mr. Mariano Ostuni, qui a ouvert une nouvelle voie d'exploration de nos ligands du TSPO et sa doctorante Irene Marginedas, qui a réalisé de nombreuses expériences avec ces ligands.

Je remercie également Mr. Guy Mensah, Mr. Christian Klein pour leur accueil au sein du laboratoire.

Je remercie tous les membres du consortium NeuroRhine qui ont pu travailler avec nous durant ces 3 ans.

Je remercie aussi particulièrement Marie, la super stagiaire qui m'a bien aidé à la fin de ce travail.

Je remercie avec plaisir les personnes rencontrées au laboratoire pour leur disponibilité, leur bonne humeur (enfin ça dépend) et, surtout, la patience de leurs oreilles : Alexandra, Christelle, Christophe, Claire, Claude, Emilie, Hassan, Hussein, Jacques, Maud, Patrick, Pedro, Rémi, Séverine, Yann, Songlin et ceux que j'ai oublié avec qui j'ai pu passer du temps à la fac. Je remercie également tous les membres de l'UMR 7200 avec qui j'ai échangé durant ces 3 ans au sein de la fac.

Merci à Elsa, les parents, les sœurs, les cousines, les cousins, la famille, les amis et les potes.

On n'est pas tout seuls.

Abréviations

a.a.	acide aminé
Ac	Acétyle
Ac ₂ O	anhydride acétique
AcOEt, EtOAc	acétate d'éthyle
AcOH	acide acétique
ACBD	Acyl-CoA-binding domain-containing protein
ACh	Acétylcholine
ACTH	Adrénocorticotrophine
AMPA	acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP α	Alloprégnanolone
APP	Amyloid Precursor Protein
Ar	Aryle
ARN	Acide RiboNucléique
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BINAP	2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyle
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonate
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate
Br ₂	Dibrome
Bu	Butyle
BTPP	(<i>tert</i> -Butylimino)tris(pyrrolidino)phosphorane
n-BuOH	<i>n</i> -butanol
cat.	catalytique
°C	degrés Celsius
CBR	Central Benzodiazepine Receptor
Cbz	Carboxybenzyle
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CEA	Commisariat à l'Énergie Atomique
CNG	Cyclic nucleotide Gated Ion Channel
CRAC	Cholesterol Recognition Aminoacid Consensus
DA	Dopamine
DCM	Dichlorométhane
Dbz	dibenzylidèneacétone
DBI	Diazepam Binding Inhibitor
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DIEA	N,N-Diisopropyléthylamine
DME	1,2-diméthoxyéthane
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EAE	encéphalomyélite allergique expérimentale
EDCI	N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride
Eq	équivalent
Et ₂ O	Ether diéthylique
EtOH	Ethanol

Fmoc	9-fluorénylméthoxycarbone
FRET	Förster resonance energy transfert
GABA	Acid Gamma aminobutyrique
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
h	heure(s)
HATU	1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HBA	H-Bond Acceptor
HBD	H-Bond Donnor
hPROT	Human Protein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass spectroscopy
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice Médiane
IMM	Inner Mitochondrial Membrane
iPrOH	iso-Propanol
kDa	kilodalton
K _i	Constante d'inhibition
K-O	Knock-Out
LCMS	Liquid chromatography mass spectroscopy
LCR	liquide cérébro-spinal
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
Min	Minutes
MW	Molecular Weight
mw	Micro-waves
mPROT	Murin Protein
MPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
MsCl	Chlorure de mésyle
NA	Noradrénaline
NaH	Hydruure de Sodium
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	Protoxyde d'azote
ODN	octadécaneuropeptide
OMM	Outer Mitochondrial membrane
PAP7	PBR-Associated Protein
PBR	Peripheral Benzodiazepine Receptor
PDE	Phosphodiesterase
PEG	Polyéthylène glycol
Ph	Phényle
PIFA	phenyliodine bis(trifluoroacetate)
PKAR1 α	cAMP-dependent protein kinase
PPh ₃	triphénylphosphine
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
RSA	Relations Structure Activité
RSS	Relations Structure Sélectivité
rt	Room temperature

SEP	Sclérose en plaques
SEM	Standard Error of the Mean
SNC	Système Nerveux Central
scc	Cholesterol side-chain cleavage
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
TA	Température ambiante
tBu	<i>Tert</i> -butyle
TEA	Triéthylamine
Tf	Triflate
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tetrahydrofurane
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
Ts	Tosyle
TSPO	Translocator Protein 18kDa
TTN	triakontatetraneuropeptide
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel

Liste des acides aminés

Acide glutamique	Glu	E
Acide Aspartique	Asp	D
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Partie A - Introduction au TSPO

1. Présentation du TSPO

1.1. Historique

La première observation du TSPO (pour Translocator Protein 18kDa), a été effectuée par Braestrup et Squires en 1977.¹ A cette époque, la recherche du site de fixation et du mécanisme d'action des benzodiazépines était en plein essor. Les auteurs cherchaient à localiser la fixation du diazépam en effectuant des études d'affinité sur des homogénats issus de différents organes de rat. Les auteurs ont utilisé du Diazépam (1), du Clonazépam (2) et du Ro5-4864 (3) (Figure 1).

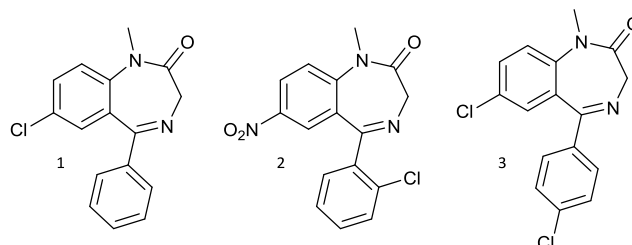


Figure 1 : Diazépam (1), Clonazépam (2) et Ro5-4864 (3)

Le Diazépam et le Clonazépam sont des benzodiazépines très actives sur l'anxiété et le Ro5-4864 (4'-Chlorodiazépam) est considéré comme presque inactif. La capacité du Clonazépam et du Ro5-4864 à déplacer le [³H]Diazépam a été testée sur des homogénats de membranes du cerveau et sur les mitochondries issues de reins, de foie et de poumons de rat (Tableau 1).

Tissu	IC ₅₀ (nM)	
	Clonazépam	Ro5-4864
Reins	2900±600	4.7±0.3
Foie	5080	4.1
Poumons	7900	4.8
Cerveau	5.0	163000

Tableau 1 : Déplacement spécifique du [³H]Diazépam dans différents tissus

On observe une forte affinité du Clonazépam pour les homogénats membranaires du cerveau tandis que le Ro5-4864 présente une forte affinité pour les mitochondries issues des tissus périphériques. On a une différence très marquée entre le site de fixation central localisé au niveau des membranes et le site de fixation périphérique localisé, lui, au niveau mitochondrial. Il s'agit en fait de la première observation du récepteur « périphérique » aux benzodiazépines, maintenant appelé « Translocator Protein 18kDa » (TSPO).²

Après ces observations, plusieurs équipes ont utilisé la même méthode de déplacement du [³H]Diazépam ou du [³H]Ro5-4864 pour déterminer les différentes zones d'expression de ce récepteur périphérique aux benzodiazépines. La présence du TSPO a donc été établie dans un premier temps dans le cœur,³ les mastocytes,⁴ les plaquettes⁵ et dans le cerveau.^{6,7} Depuis, on en a également trouvé au niveau du tractus digestif, du foie, des glandes surrénales et au niveau des cellules hématopoïétiques et lymphatiques.⁸

Les récepteurs « centraux » et « périphériques » dans le cerveau sont assez distincts, tant du point de vue de la distribution, de la localisation intracellulaire que de l'effet physiologique. Le récepteur périphérique semble être une entité dont la fonction physiologique est distincte du récepteur central.⁹ En effet, après avoir identifié ce récepteur périphérique aux benzodiazépines, son implication physiologique reste toujours à démontrer. Pour cela, plusieurs équipes ont travaillé sur le développement de ligands spécifiques du TSPO pour évaluer la pertinence physiologique de ce récepteur.

Le PK-11195 (4) a été le premier ligand spécifique du TSPO présentant une structure primaire différente du châssis benzodiazépine.^{10,11}

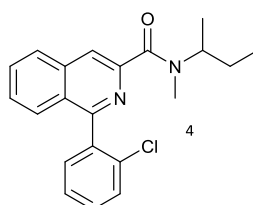


Figure 2 : Structure du PK-11195 (4)

L'étude de binding *in vivo* de Le Fur *et al.* a permis de démontrer la présence du TSPO dans plusieurs zones du cerveau de souris comme le striatum, le cortex, le cervelet, le mésencéphale, l'hypothalamus, la médulla ainsi que l'hippocampe. Cette étude n'a néanmoins pas permis l'observation d'effets physiologiques dus à l'activation du récepteur périphérique aux benzodiazépines.

Les premières recherches de l'implication physiologique de ce récepteur ont débuté par l'identification de ses zones d'expression. Plusieurs équipes ont ainsi utilisé des méthodes autoradiographiques qui permettent, après marquage spécifique à l'aide de ligands tritiés comme le [³H]Ro5-4864 et le [³H]PK-11195, de localiser les organes exprimant une forte densité de TSPO.¹²⁻¹⁴ La plus forte concentration de TSPO est retrouvée au niveau des glandes surrénales, suivi de tissus glandulaires comme les glandes salivaires, les testicules et les ovaires. On ne peut cependant généraliser aux tissus glandulaires car on ne retrouve qu'une faible concentration de TSPO dans le pancréas ou l'hypophyse. D'autres tissus, sans spécificité glandulaire, comme l'épithélium nasal, les poumons et les reins expriment aussi le TSPO à des niveaux moyens.

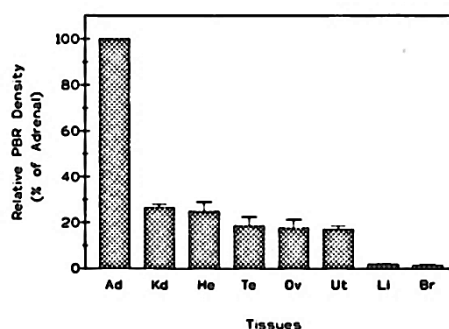


Figure 3 : Distribution relative de la capacité maximale de fixation membranaire du [³H]PK-11195¹⁵

Ad, surrénale; Kd, rein; He, cœur; Te, testicules; Ov, Ovaires; Ut, utérus; Li, Foie; Br, Cerveau.

Des études ont montré que l'administration de benzodiazépines comme le diazépam avait des effets sur la libération d'hormones de croissance, de l'ACTH, de la prolactine, de la LH et des hormones stéroïdes dont la testostérone.¹⁶⁻¹⁹ Ces résultats indiquent une action directe des benzodiazépines sur les fonctions surrénaliennes médiée par le TSPO, généralisable à la production des stéroïdes endogènes.

Pour résumer, le TSPO est une protéine ubiquitaire particulièrement enrichie dans les tissus impliqués dans la synthèse des stéroïdes (voir figure 3). Cette distribution semble en accord avec son rôle important dans la synthèse des stéroïdes endogènes.¹⁵ On le retrouve également dans le SNC, où son expression est limitée aux cellules gliales.

2. Fonction du TSPO

2.1. Localisation

Au niveau subcellulaire, on retrouve le TSPO majoritairement dans la membrane externe (OMM) de la mitochondrie, plus spécialement au niveau des zones de contact entre la membrane interne (IMM) et la membrane externe.²⁰ L'association du TSPO avec le « Mitochondrial Permeability Transition Pore » (MPTP) n'est pas démontrée mais on sait que les ligands TSPO régulent le MPTP. Il reste à déterminer si le TSPO fait partie intégrante du complexe MPTP, possède un rôle actif dans le complexe ou alors présente une association passive avec le MPTP.²¹ On retrouve également le TSPO au niveau des membranes d'autres organites cellulaires. L'équipe de Venturini *et al.*²² a montré la présence du TSPO dans des fractions nucléaires de tissus sains et cancéreux de foie humain. Sa présence a également été démontrée par Hardwick *et al.*²³ au niveau des fractions péri-nucléaires et nucléaires dans des cellules cancéreuses. D'autres groupes ont également identifié l'expression du TSPO sur les érythrocytes et sur les membranes cellulaires de cellules adrénocorticales.^{24,25}

2.2. Structure de la protéine TSPO seule

Le TSPO 18kDa fait partie d'un complexe protéique de 240kDa²⁶ qui est localisé dans les zones de contact entre l'OMM et IMM de la mitochondrie. Dans cette première partie, nous nous concentrerons sur la structure propre du TSPO 18kDa et dans une seconde partie, nous nous intéresserons à l'agencement du complexe protéique transmembranaire.

En 1989, Sprengel *et al.*²⁷ ont réussi à identifier et cloner la séquence d'ADN encodant le TSPO. Ils ont ainsi pu en déduire la séquence protéique du TSPO. Cette protéine est constituée de 169 acides aminés et possède un poids moléculaire d'environ 18 kDa. Cette traduction du code génétique est en accord avec les différentes observations²⁸ faites en amont et établissant le poids moléculaire de la protéine liant le photomarqueur PK-14105 dans les 17-18 kDa. Après avoir décodé la séquence, une analyse hydropathique a permis de mettre en évidence la présence de 5 régions transmembranaires. Le modèle décrit à cette époque a depuis été confirmé et légèrement modifié, notamment en ce qui concerne la taille des domaines transmembranaires.²⁹

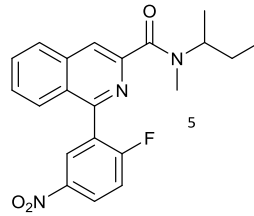


Figure 4 : Structure du photomarqueur PK-14105 (5)

Plusieurs équipes ont réussi à surexprimer une forme recombinante et fonctionnelle du TSPO^{30,31} mais comme il s'agit d'une protéine membranaire, il est très difficile de réussir à la cristalliser et sa structure 3D n'a pu être élucidée qu'avec des mesures de dichroïsme circulaire et de Résonance Magnétique Nucléaire. Tout récemment, l'équipe de Jaremko *et al.*³² a publié la structure 3D du TSPO en présence du ligand PK-11195, résolue grâce à ces deux technologies. La structure tertiaire de cette protéine est extrêmement dynamique et, d'après Jaremko *et al.*, la forme tertiaire du TSPO est stabilisée sous forme de canal transmembranaire.

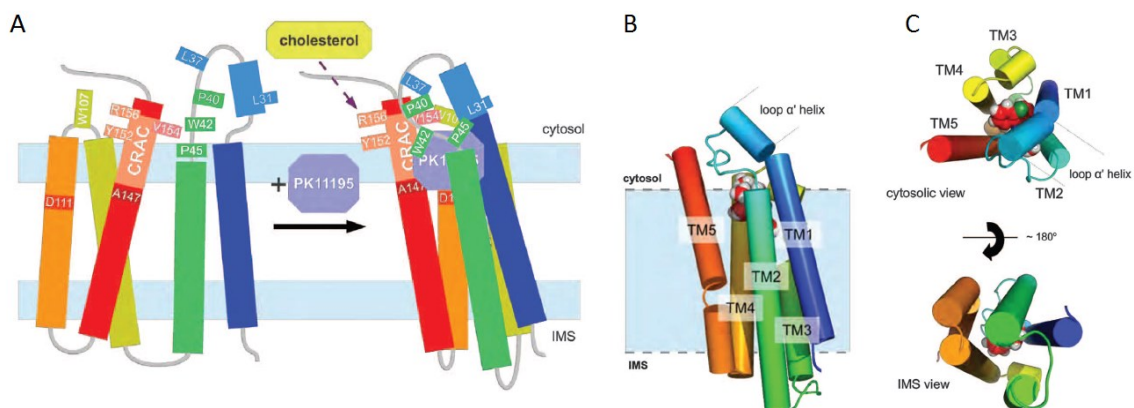


Figure 5 : (A) Structure dynamique de la fixation du PK-11195 sur le TSPO en représentation schématique ;

(B) Représentation en cylindre du complexe avec le plus bas niveau d'énergie ;

(C) Vue du cytosol ou de l'espace intermembranaire du complexe mTSPO-PK-11195.³²

De précédentes études, utilisant la RMN et la microscopie avaient déjà expérimentalement mis en évidence l'existence de ces 5 domaines transmembranaires sous la forme d'hélices α et avaient permis d'interpréter une structure secondaire et tertiaire du mTSPO (TSPO murin) recombinant.³³ Une autre équipe a, quant à elle, réussi à déterminer la structure 3D du TSPO bactérien indiquant que l'agencement des 5 hélices transmembranaires forme une « sorte » de canal. Ils ont également montré l'organisation quaternaire de la protéine recombinante isolée sous forme d'homodimères.³⁴

La partie C-terminale se trouve dans le cytoplasme tandis que la partie N-terminale se trouve dans l'espace intermembranaire. En partie C-terminale du domaine TM5, on retrouve le CRAC pour « Cholesterol Recognition Aminoacid Consensus ». ³⁵ Des expériences de reconstruction *in vitro* et des études de RMN ont montré que le cholestérol se fixait avec une affinité nanomolaire à cette séquence.^{31,33,36} Ces données montrent que ce domaine joue un rôle important dans la prise en charge

du cholestérol pour le transporter du cytosol vers l'IMM. Les acides aminés importants de ce motif sont la Tyrosine 153 et l'Arginine 156.

Mouse PBR	147-AT VL NY YV WRD NS
Rat PBR	147-AT ML NY YV WRD NS
Human PBR	147-AT TL NY CV WRD N
Bovine PBR	147-G ML NY YR MWQ DN
Rat P450scc	86-P WV AYHQ Y Q R PI G
Human P450scc	86-P WV AYHQ Y Q R PI G
Bovine P450scc	86-P WL AYHR Y Q G KPI G
Pig P450scc	86-P WV AYHZ H YQ K PV G
Mouse apolipoprotein A-I	207-N PT L NE Y H TR AK
Mouse caveolin	91-T FT V TK Y WF Y R LL
Human hedgehog	247-G AKK V FY VIET REP
Mouse DBI	23-E ML F IY SH F K Q AT
Mouse StAR	5-K LC AG SS Y R H M R NG
Rat Annexin II	144-R VY K EM Y K T D L E K D
Rat P450c26/25	422-Q F V L CT Y V V S R DP
Strept. cholesterol oxidase	417-E TW V SL Y L A I T K NP
Mouse cholesterol 7 α -monooxygenase	166-W V T EG M Y A F C Y R VM
Nocardia cholesterol dehydrogenase	89-A SV T E A Y R Q R S F A
Human bile-salt-activated-lipase	222-S L Q T L S P Y N K G L I R R I
Rabbit acyl-CoA cholesterol acyltransferase	93-S T L V V D Y I D E G R L V

Figure 6 : Alignement de séquences d'a.a. de différents TSPO au niveau du CRAC, de P450sccs au niveau des régions de reconnaissance du substrat et de protéines connues pour interagir avec le cholestérol³⁵

Les chercheurs sont arrivés à un consensus définissant le CRAC par la séquence illustrée en figure 7.

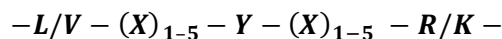


Figure 7 : Séquence générale du CRAC

Au laboratoire, nous avons étudié la structure 3D du TSPO élucidée par Jaremko *et al.* (PDBid : 2mgy) et avons ainsi pu observer la composition de la poche de fixation du PK-11195. Elle se trouve proche du cytosol, au niveau de la grande boucle entre les domaines TM1 et TM2 et est composée des acides aminés suivants : Ala₂₃, Val₂₆, Leu₄₉, Ala₅₀, Ile₅₂, Trp₁₀₇, Ala₁₁₀, Leu₁₁₄, Ala₁₄₇ et Leu₁₅₀. Les résidus présents dans la poche présentent principalement des interactions hydrophobes, ce qui corrèle avec la nature du substrat.

L'autre ligand de référence, le Ro5-4864, ne semble pas se fixer de la même façon que le PK-11195. La situation est assez particulière : d'un côté, le PK-11195 déplace la fixation du Ro5-4864 et inversement, tandis que l'utilisation d'agents comme les acides gras insaturés ou encore la coadministration de Phospholipase A2 déplacent la liaison du Ro-5864 sans aucune perturbation de la liaison du PK-11195.³⁷ D'autres agents sont également décrits comme inhibant la fixation du Ro5-4864 sans affecter celle du PK-11195, comme le DIDS (acide 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonique), des détergents et la cyclosporine A. Selon l'origine du TSPO utilisé, il y a également une différence entre les deux ligands lors de l'administration de DEPC (diéthylpyrocarbonate), un agent de carboxylation des histidines. On observe une inhibition de la liaison du PK-11195 sur le TSPO de rongeurs sans modifier la liaison du Ro5-4864, mais cela n'est pas ou presque pas observé avec le TSPO d'origine bovine ou ichthyenne. La température a montré, à la différence du PK-11195, une influence sur la fixation du Ro5-4864 qui pourrait être expliquée par l'implication d'autres partenaires

protéiques mitochondriaux nécessaires à la fixation du Ro5-4864 tandis que les dérivés de l'isoquinoline PK-11195 interagissent avec le TSPO seulement.

2.3. Structure du complexe actif

Le TSPO fait partie d'un complexe multiprotéique de 240kDa appelé le « transductosome »³⁸ et composé des protéines suivantes :

- TSPO – 18 kDa di- ou trimer
- VDAC – 32 kDa (Voltage Dependent Anion Channel)
- PAP7 – 60 kDa (PBR-Associated Protein)
- PKAR1 α – 54 kDa (cAMP-dependent protein kinase)
- StAR – 30 kDa (Steroidogenic Acute Regulatory protein)
- Cytochrome P450sc (side chain cleavage)

On peut observer la colocalisation de ces intervenants et la formation de ce complexe après une stimulation par l'hCG, une hormone stimulant la biosynthèse des stéroïdes endogènes.²⁶ L'activation du complexe est médiée par l'AMPC, le cholestérol (par action de StAR) et les hormones induisant la stéroïdogenèse. Le signal est transmis entre la PKAR1 α et le TSPO par l'intermédiaire de la protéine PAP7. C'est la formation du complexe mitochondrial StAR-PKAR1 α -PAP7-TSPO qui active le transport du cholestérol du cytosol vers l'espace intermembranaire. C'est ensuite le CYP11A1 qui prend en charge la métabolisation du cholestérol transféré en prégnénolone. En parallèle, la phosphorylation de StAR par la PKA est également nécessaire à son activation, plaçant cette PKA comme un régulateur important de la stéroïdogenèse (Figure 8).³⁹

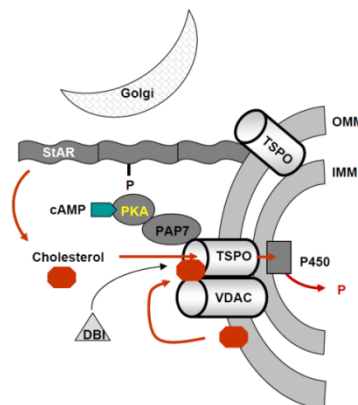


Figure 8 : Représentation schématique du complexe qui sert de médiateur et amplifie les signaux des hormones et de l'AMPC (P = Prégnénolone)²⁶

Le VDAC est associé à l'Adénine nucleotide Translocase (ANT) et ces deux protéines forment ensemble le MPTP.⁴⁰ Cette porine mitochondriale interagit avec de nombreuses protéines essentielles au fonctionnement mitochondrial comme Bax, Bid et Bcl-2, régulateurs majeurs de l'apoptose par la voie des caspases. Le TSPO et son complexe actif sont associés au MPTP et le rôle du TSPO dans l'induction de l'apoptose n'est pas encore démontré mais il pourrait y être impliqué.⁴¹ C'est

au niveau de la zone d'interaction entre VDAC et TSPO que se trouve le site de fixation des benzodiazépines périphériques comme le Ro5-4864.³⁰

Le rôle de VDAC dans le complexe fonctionnel du TSPO n'est toujours pas clairement élucidé. L'équipe de Sileikyte avait décrit la modulation de la formation du MPTP par le TSPO en 2010.⁴² Récemment, ils ont remis en question le rôle du TSPO dans le MPTP, montrant que chez des souris ayant subi un Knock-out conditionnel du TSPO au niveau des tissus cardiaques, on n'observe aucune différence avec le contrôle sur la fonction du MPTP, la réponse aux ligands ou à l'ischémie.⁴³

2.4. Translocation du cholestérol – effet des neurostéroïdes

L'un des rôles du TSPO est de transporter le cholestérol du cytosol vers l'espace intermembranaire mitochondrial où il est métabolisé en prégnénolone par le cytochrome P450sc (gène CYP11A1) par une suite de 3 réactions de monooxygénation successives utilisant le NADPH comme cofacteur.

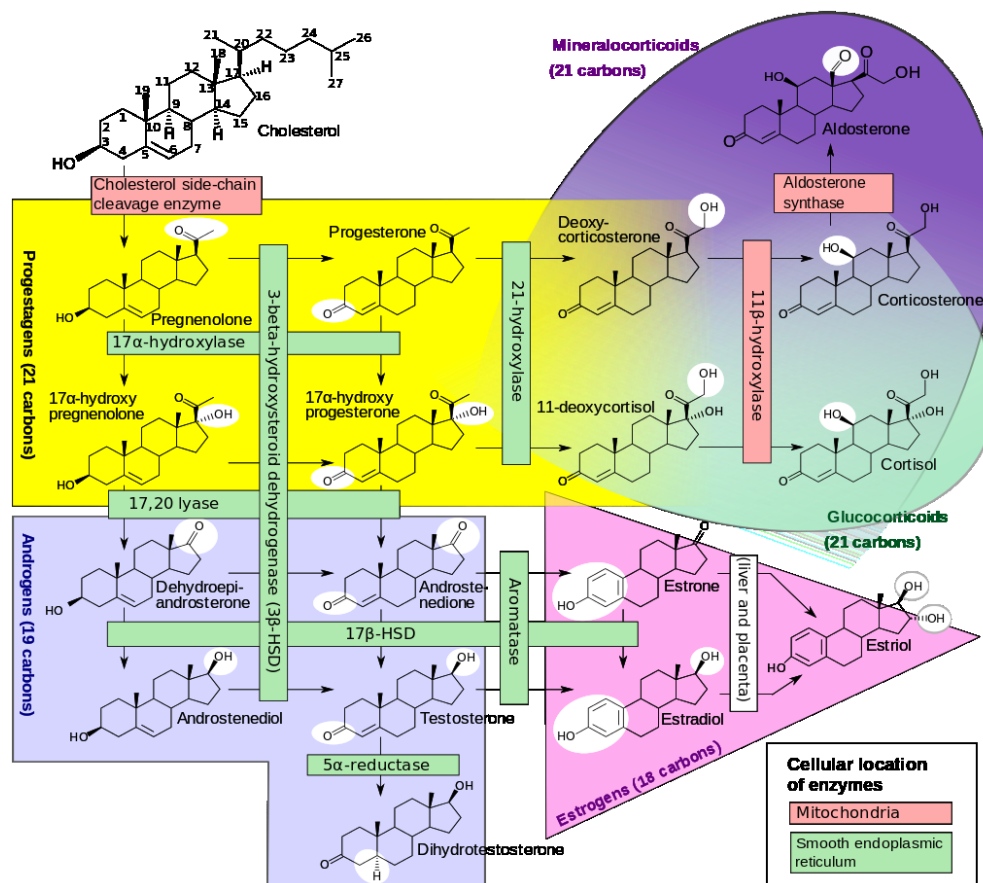


Figure 9 : Voies de biosynthèse des hormones stéroïdes⁴⁴

La prégnénolone est le précurseur principal de la biosynthèse des hormones stéroïdes (Figure 9⁴⁴) et des neurostéroïdes (Figure 10⁴⁵).

Au niveau moléculaire, les stéroïdes neuroactifs peuvent se lier à des récepteurs intracellulaires qui agissent comme facteurs de transcription et régulent l'expression génique. Ils peuvent également interagir avec de nombreux récepteurs des neurotransmetteurs et des récepteurs ionotropes, comme les récepteurs GABA_A, NMDA, AMPA, kainate, glycine, sérotoninergiques, nicotiques et

muscariniques ou les canaux calciques voltage-dépendant, les canaux sodiques, les canaux potassiques activés par le calcium et les canaux anioniques.⁴⁶ Par ces mécanismes, ils peuvent moduler l'excitabilité neuronale par action présynaptique sur le relargage des neurotransmetteurs ou post-synaptique en modifiant la réactivité neuronale. Les neurostéroïdes ont aussi une action sur la plasticité synaptique au niveau des synapses glutamatergiques et GABAergiques. L'effet de ces composés endogènes dépend de plusieurs facteurs comme le type de neurostéroïde, la région du cerveau, l'état du neurone présynaptique ainsi que le type de neurotransmetteurs libérés. Les propriétés des neurostéroïdes, dont l'impact reste à étudier, en font d'importants régulateurs de la transmission synaptique au niveau du SNC et sont un sujet important pour l'étude du fonctionnement de la neurotransmission et des maladies cérébrales qui y sont liées.

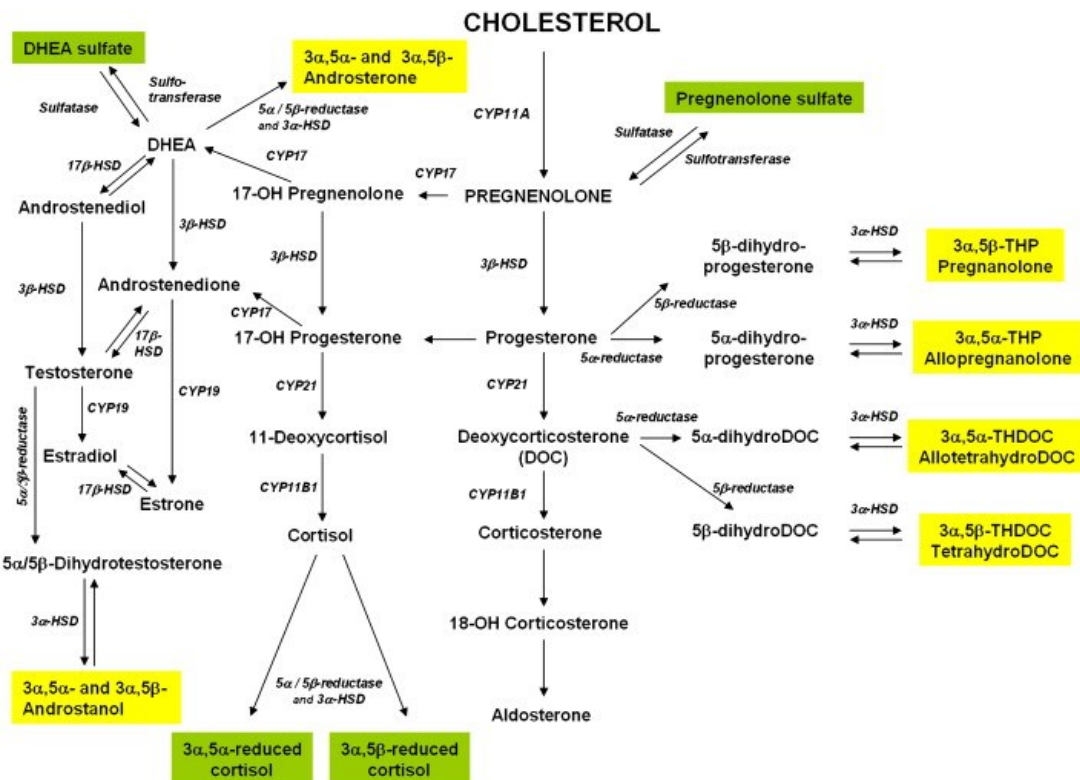


Figure 10 : Voies de biosynthèse des neurostéroïdes, en jaune, les neurostéroïdes inhibiteurs (agonistes GABA_A) et en vert, les neurostéroïdes activateurs (antagonistes GABA_A)⁴⁵

Pour mieux comprendre leur action au niveau central, l'équipe de Zheng⁴⁶ a étudié au cas par cas l'action des neurostéroïdes sur la libération des neurotransmetteurs dans différentes zones du cerveau. Ils ont découvert que les stéroïdes neuroactifs avaient des effets modulateurs sur la libération du glutamate, du GABA, de l'Acétylcholine, de la noradrénaline, de la dopamine et de la sérotonine. Ces modulations interviennent au niveau des zones de l'apprentissage et de la mémoire, des émotions, de la motivation, des mouvements ou de la cognition. Ils concluent leur étude en précisant que ces mécanismes restent assez obscurs et qu'il est nécessaire de continuer les recherches pour mieux comprendre la spécificité moral-dépendante et l'effet sélectif sur certaines régions du cerveau.

2.5. L'allopregnalone, un neurostéroïde aux effets prometteurs

L'allopregnalone (AP α) est un neurostéroïde naturel qui a montré expérimentalement sa capacité à promouvoir la régénération et la réparation du cerveau âgé de mammifère et du cerveau atteint par la maladie d'Alzheimer. L'AP α favorise la neurogenèse et ses fonctions cognitives associées, réduit l'état pathologique de la maladie d'Alzheimer et favorise la régénération de la substance blanche.⁴⁷

Des études post-mortem ont montré que la concentration d'AP α au niveau du cortex préfrontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer était considérablement plus faible que chez des sujets « contrôles » cognitivement intacts, cette concentration étant corrélée avec l'extension de la maladie d'Alzheimer chez le patient.⁴⁸ Cette observation avait déjà été faite chez des souris modèles de la maladie de Niemann-Pick type C, une maladie lysosomale engendrant une neurodégénérescence. La diminution de la concentration de ce neurostéroïde peut être due à une détérioration de la voie de synthèse de l'AP α ou à une accélération de son métabolisme. C'est cette deuxième hypothèse qui semble le plus proche de la vérité car une augmentation de l'activité de la 17- β -Hydroxystéroïde déshydrogénase a été observée chez les souris 3xTgAD modèles de la maladie d'Alzheimer.

L'AP α a également été montrée comme un facteur de prolifération des cellules souches neuronales et des précurseurs des oligodendrocytes au niveau central, tandis qu'au niveau périphérique, elle favorise la prolifération de cellules de Schwann et la remyélinisation des axones des neurones périphériques.⁴⁹⁻⁵¹

Brinton analyse qu'il y a 3 aspects de la régulation de la neurogenèse par l'AP α qui sont importants à considérer : premièrement, l'AP α restaure le potentiel régénératif du cerveau à un niveau normal, pas supra normal. Deuxièmement, l'effet régénérant de l'AP α est dose-dépendant avec une courbe de dose-réponse classique pour un facteur de croissance par lequel le dépassement des doses neurogéniques n'entraîne pas de réponse plus importante. Troisièmement, l'effet régénérant de l'AP α varie avec l'âge du sujet traité et le niveau d'avancement de la maladie. Ces caractéristiques indiquent que le système de régénération activé par l'AP α est finement régulé avec des gardes fous limitants l'activation et l'amplitude de la prolifération neuronale.⁴⁷

Une étude préclinique sur l'administration chronique d'AP α chez un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (souris 3xTgAD) a diminué les symptômes de la maladie et la génération de plaque β -amyloïde. Dans d'autres modèles précliniques de maladies neurodégénératives, l'AP α réduit la réponse inflammatoire. Elle diminue également l'activation microgliale et l'expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires dans des modèles précliniques murins de la maladie de Niemann-Pick type C, de traumatismes cérébraux, de traumatismes médullaires et de sclérose en plaques.

L'allopregnalone est conforme à trois critères sur quatre de la règle de Lipinski (LogP = 5.042, M = 318.5 g/mol, 2 HBA, 1 HBD), c'est donc un produit peu biodisponible oralement. Avant de l'utiliser en thérapeutique, il est nécessaire d'étudier la posologie adéquate et la pharmacocinétique de ce composé. Il existe trois problèmes quant à l'utilisation chez l'homme de l'AP α comme médicament : premièrement, ce produit coûte cher et il est difficile de s'en procurer en grande quantité.

Deuxièmement, sa métabolisation est assez rapide au niveau du tractus digestif, limitant ainsi sa biodisponibilité après une administration orale (en plus de la prédiction de mauvaise biodisponibilité selon la règle de Lipinski). Et enfin, l'AP α reste une hormone stéroïde et son utilisation au long cours n'est pas recommandée chez l'homme. Pourtant, ce composé endogène capable d'activer la capacité innée de régénération du cerveau, semble prometteur dans la prévention et le traitement de la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives.⁵²

Dans notre travail de recherche d'un ligand activant le TSPO, le but est d'activer les voies métaboliques conduisant à la biosynthèse d'alloprégnanolone en augmentant le transport et la métabolisation du cholestérol en prégnérolone. Cette approche peut ainsi permettre de passer au travers des problèmes liés à l'utilisation de l'AP α comme médicament.

3. Implication physiologique du TSPO

3.1. Une fonction décrite mais un rôle fortement débattu

Le rôle physiologique du TSPO n'est pas encore totalement élucidé mais il interviendrait comme modulateur dans différentes fonctions mitochondriales comme le transport du cholestérol et la synthèse d'hormones stéroïdes, la respiration mitochondriale, la formation des MPTP, l'apoptose et la prolifération cellulaire.⁵³ Ces fonctions ont été proposées grâce à l'utilisation de ligands TSPO et des Knock-Out conditionnels en utilisant des techniques de recombinaison homologue,⁵⁴ des vecteurs antisenses,^{55,56} des oligonucléotides antisenses,⁵⁷ ou des ARN interférents.⁵⁸⁻⁶⁰ De par sa capacité à transporter le cholestérol du cytosol vers l'espace intermembranaire, le TSPO pourrait aussi participer à la biogenèse des membranes mitochondriales.

L'équipe de Papadopoulos a annoncé en 1997 avoir observé une mort embryonnaire précoce lors d'une tentative de Knock-out constitutif chez des souris.⁶¹ Ils ont également observé que l'inactivation du TSPO dans les lignées stéroïdogéniques diminuait la formation d'endostéroïdes par ces cellules. De ces résultats qui n'ont jamais été remis en question durant 13 ans, il était facile de conclure de l'importance du TSPO dans la biosynthèse d'hormones stéroïdes. L'année dernière, ce dogme a été remis en question par l'équipe de Morohaku, qui a réussi à faire des K-O conditionnels sur des souris tout en conservant une activité stéroïdogénique.^{62,63} Cet essai a été poussé plus loin en 2014 par l'équipe de Stocco qui a réussi à réaliser un K-O constitutif sur des souris.⁶⁴ Ces souris TSPO^{-/-} sont viables et ne présentent aucune altération au niveau de la synthèse d'hormones stéroïdes. Ces derniers résultats remettent en cause le rôle important que la communauté scientifique avait attribué au TSPO.

La synthèse d'hormones stéroïdes est une chose si importante pour les tissus et leur fonctionnement que l'on peut imaginer qu'il existe plusieurs mécanismes compensatoires. A cela, Stocco répond que ces mécanismes redondants auraient dû être observés lors des différentes expériences cherchant à bloquer le TSPO pour mieux comprendre ses fonctions.

On retrouve le TSPO dans tous les tissus, centraux comme périphériques, impliqués dans la stéroïdogénèse ou non. On observe une surexpression en cas de lésions neuronales et dans des cellules cancéreuses (voir 4.). Si le TSPO n'est pas nécessaire à la biosynthèse des hormones stéroïdes, quelle est sa fonction pour les lignées cellulaires tumorales et dans l'organisme entier ?

Toutefois, la métabolisation du cholestérol en prégnénolone est l'étape limitante de la synthèse des hormones stéroïdes et des neurostéroïdes. Si la régulation de la biosynthèse des hormones stéroïdes au niveau des organes endocrines périphériques est effectuée en réponse aux hormones hypophysaires, il n'en va pas de même pour les neurostéroïdes qui régulent et modulent des transmissions synaptiques dans le cerveau. Ces derniers sont produits en beaucoup plus petite quantité que les hormones stéroïdes mais semblent, par leur régulation fine, tout autant importants pour la survie de l'espèce. A ce jour, seul le TSPO est connu comme modulateur de la production de ces neurostéroïdes. Quel pourrait être l'impact physiologique d'une modulation fine de cette protéine ?

3.2. Ligands endogènes du TSPO

Les ligands endogènes décrits du TSPO sont peu nombreux. Il y a le cholestérol bien entendu, qui se fixe au niveau C-terminal dans le cytosol au niveau du domaine CRAC avec une affinité nanomolaire. Les porphyrines sont également des ligands endogènes qui se lient avec une affinité nanomolaire au niveau de la zone N-terminale. Parmi ces composés, on retrouve : la Protoporphyrine IX (**6**), la Deuteroporphyrine IX (**7**), la Mesoporphyrine IX (**8**) et l'Hémine (**9**) illustrées en figure 11.⁶⁵

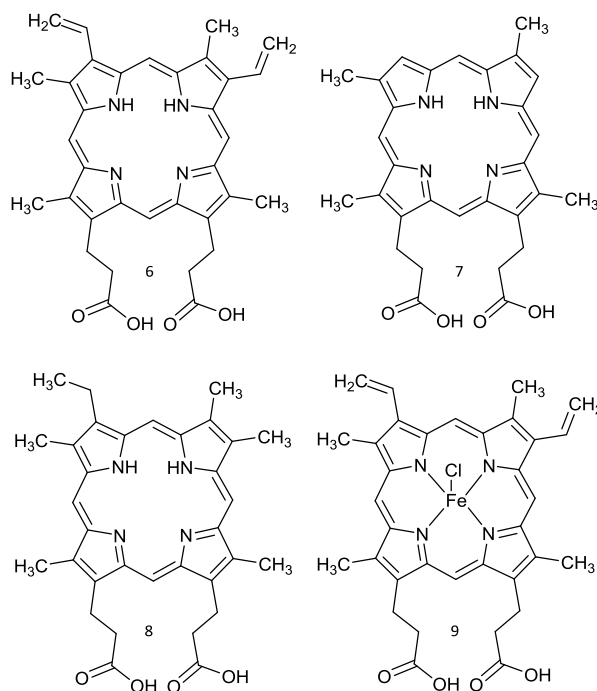


Figure 11 : Structure des porphyrines ligands endogènes du TSPO

La première et la dernière étape de biosynthèse des porphyrines prennent place dans la mitochondrie, donc le précurseur porphyrique de la protoporphyrine IX et l'hème doivent traverser la membrane

mitochondriale externe en passant par une porine comme le VDAC. Les porphyrines sont connues pour moduler l'activité enzymatique de nombreuses enzymes et sont également impliquées dans plusieurs interactions avec des protéines mitochondriales. Elles présentent un indice de sélectivité pour le TSPO vis-à-vis du récepteur central aux benzodiazépines d'environ 1000. Cette spécificité avec ce récepteur implique un rôle physiologique qui reste à déterminer. On sait que l'échange de l'atome de fer central de l'hémine provoque une diminution de l'affinité de l'hémine-métal pour le TSPO de 7 à 8 fois avec le zinc et de 1000 fois avec le cobalt ou l'étain. Au niveau des tissus stéroïdogéniques, la concentration en porphyrines est plus élevée que dans les autres tissus, pourrait-il y avoir une régulation de la stéroïdogénèse par les porphyrines ?

Parmi les autres ligands endogènes du TSPO, on retrouve les endozépines, qui sont des neuropeptides isolés d'extraits de cerveaux de rat qui montrent une habilité à déplacer la liaison des benzodiazépines de leur site de fixation sur le GABA_A. Ces composés sont dérivés de la protéolyse endogène du DBI (Diazepam Binding Inhibitor) qui est encodé par un gène unique largement exprimé au niveau du SNC.⁶⁶ On le retrouve également en grande concentration dans les tissus stéroïdogéniques riches en TSPO.¹⁵ Les deux fragments les plus actifs sont l'octadécaneuropeptide DBI33-50 (ODN) et le triakontatetrapeptide DBI17-50 (TTN), ils stimulent la synthèse des stéroïdes par les mitochondries.⁶⁷

TTN (rat) :
TQPTDEEMELFIYSHFKQ
ATVGDVNTDRPGLLDLK

Figure 12 : Séquence du TTN et de l'ODN

Le DBI, qui montre une affinité pour l'acyl-Coenzyme A, est aussi appelé Acyl-CoA-binding Protein et a récemment été reclassé dans la famille des ACBD (Acyl-CoA-binding domain-containing protein) et renommé ACBD1. Cette nouvelle classification suppose que les ACBD et l'Acyl-CoA peuvent réguler le TSPO.

Les endozépines sont synthétisées par les cellules de Schwann au niveau des tissus périphériques. Lors de lésions tissulaires, on observe une augmentation de la production d'endozépines et une augmentation de l'expression du TSPO dans ces zones.⁶⁸ Au niveau central, le gène codant pour le DBI est principalement exprimé au niveau des cellules gliales. Deux observations au niveau de l'expression de cette endozépine indiquent qu'elle semble être impliquée dans la réponse autocrine et paracrine des cellules gliales à la maladie d'Alzheimer :

- Sa synthèse est stimulée par le peptide β -amyloïde, qui a un rôle pathogénique dans la maladie d'Alzheimer⁶⁹
- Des niveaux élevés de DBI ont été relevés au niveau du liquide cérébro-spinal (LCS) de patients atteints de la maladie d'Alzheimer⁷⁰

Ces observations soulignent le potentiel thérapeutique des ligands TSPO dans le traitement des maladies neurodégénératives.

4. Niveaux d'expression du TSPO lors de troubles neuropsychiatriques⁵³

Bien que le rôle physiologique du TSPO ait récemment été remis en question, de nombreuses questions se posent toujours au niveau de son implication pathologique. En effet, dans certains troubles neuropsychiatriques, on observe une modification de l'expression de cette protéine.

L'utilisation de techniques de neuroimagerie et de ligands radiomarqués a permis l'identification du TSPO comme un biomarqueur sensible de la neurodégénération, des lésions cérébrales, de l'inflammation et de la gliose découlant de ces phénomènes.

Dans des conditions physiologiques normales, l'expression basale du TSPO dans le cerveau est basse et limitée aux cellules gliales. Une forte augmentation de son expression apparaît au niveau des cellules gliales en réponse à une lésion cérébrale ou une inflammation. L'utilisation de ligands sélectifs et marqués permet de visualiser la distribution et de quantifier l'expression du TSPO *in vitro* par des techniques d'autoradiographie ou *in vivo* par des techniques de PET (tomoscintigraphie par émission de positons) ou de SPECT (tomographie d'émission monophotonique). Ces technologies et l'augmentation localisée de l'expression du TSPO dans les zones endommagées permettent d'utiliser le TSPO comme un marqueur sensible pour détecter des petits changements dans les régions endommagées en comparaison avec les régions normales.⁷¹

Une sorte de cartographie a été réalisée en étudiant la surexpression zone-dépendante du TSPO après utilisation de neurotoxiques induisant une neurodégénération ou des lésions axonales. On peut ainsi lier certains troubles neuropsychiatriques à une augmentation localisée de l'expression du TSPO, quantifiable par PETscan ou SPECT chez les patients.⁷²

4.1. Lésions du système nerveux périphérique

Lors d'une lésion nerveuse au niveau périphérique, on observe une augmentation de l'expression du TSPO au niveau des cellules de Schwann, des macrophages et des neurones.^{68,73,74} Cette expression diminue lorsque la réparation nerveuse est terminée, ce qui suggère un rôle important du TSPO dans ces processus de réparation nerveuse.⁶⁸ Des profils d'expression génique montrent une augmentation du gène codant pour le TSPO sans pour autant avoir observé expérimentalement une surexpression de la protéine dans des modèles de douleurs neuropathiques *in vivo*.⁷⁵⁻⁷⁷ A la différence du SNC, le TSPO n'est pas utilisé comme un outil de diagnostic dans le système nerveux périphérique.

4.2. Lésions cérébrales

Dans la microglie et les astrocytes, il y a une surexpression du TSPO en réponse aux lésions neuronales dont le niveau est directement lié au degré des dommages. Le TSPO est donc devenu un outil intéressant pour étudier les lésions cérébrales avec une hétérogénéité pathophysiologique considérable.⁷⁸ Des études chez des patients ayant eu un AVC ont montré l'intérêt d'utiliser ce type d'outil pour suivre l'avancée des lésions et des processus de réparation.^{79,80} On peut ainsi qualifier le

TSPO de sonde pour le suivi des processus de réparation actifs intervenants lors de lésions cérébrales.⁸¹

4.3. Maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par une perte neuronale et une inflammation dans certaines zones du cerveau. Les ligands TSPO marqués ont été utilisés comme sondes moléculaires *in vivo* de ces dommages neuronaux et inflammatoires chez des patients atteints de maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, de Pick, d'Huntington, de Parkinson ou de Charcot ainsi que la sclérose en plaque. Dans toutes ces maladies, on observe une forte augmentation de l'expression du TSPO dans les zones concernées.

L'équipe de Ji a cherché à savoir quelle était la signification de la surexpression du TSPO au niveau astrocytaire ou microgliale. Ils ont utilisé des modèles des maladies d'Alzheimer et de Parkinson pour montrer que l'augmentation de l'expression du TSPO au niveau de la microglie reflète une réaction gliale délétère d'un point de vue neurotrophique tandis que cette augmentation au niveau des astrocytes représente plutôt un effet bénéfique.⁸²

Des études utilisant un modèle animal de maladies démyélinisantes comme la sclérose en plaques ont révélé que le niveau d'expression du TSPO restait élevé durant le recouvrement de la maladie et la réparation de la myéline, supposant un rôle du TSPO dans les processus régénératifs.^{78,83}

4.4. Tumeurs cérébrales

Si le TSPO est beaucoup décrit dans la littérature comme cible pour l'imagerie des troubles neurologiques, son importance en neuro-oncologie est moins établie. L'expression du TSPO augmente dans de nombreux cancers, y compris les tumeurs cérébrales. A la vue du haut niveau d'activité mitochondriale dans les cellules tumorales qui prolifèrent rapidement, le rôle du TSPO dans ces tissus n'est pas encore démontré comme cause ou symptôme de cette activité accrue. Plusieurs équipes cherchent actuellement à développer de nouveaux ligands du TSPO pour l'imagerie médicale ou comme agents antiprolifératifs.⁸⁴⁻⁸⁸

4.5. Troubles psychiatriques

D'une manière générale, on observe une diminution de l'expression du TSPO au niveau des cellules comme les lymphocytes ou les plaquettes.

On observe une diminution de l'expression du TSPO au niveau des lymphocytes chez les patients atteints d'un trouble anxieux généralisé (TAG). Cette diminution intervient au niveau transcriptionnel car on observe également la diminution de l'expression d'ARN messagers codants pour le TSPO.^{89,90}

Le ligand [³H]PK-11195 a été utilisé pour mesurer le binding maximum permettant de quantifier l'expression du TSPO au niveau des plaquettes. Plusieurs équipes ont observé une diminution de l'expression du TSPO chez les patients atteints d'anxiété de séparation,^{91,92} de stress post-traumatique⁹³, de troubles bipolaires,⁹⁴ de phobie sociale⁹⁵ ou encore chez les patients schizophrènes

en fonction de leur agressivité, sans prise en compte du caractère social.⁹⁶ Il n'y a pas de modification de l'expression dans les cas de dépression.⁹⁷ Le rôle du TSPO n'est pas complètement élucidé, mais on peut imaginer que la fonction du TSPO, dans des conditions pathologiques ou normales, dépende de son niveau d'expression et de sa localisation subcellulaire. Des travaux restent à faire pour évaluer cette implication physiologique et pathologique du TSPO.

5. Les ligands du TSPO et leurs utilisations

De nombreux composés de classes chimiques variées ont été développés comme ligands sélectifs du TSPO pendant les 25 dernières années. Ces composés présentent différentes sélectivités et affinités. De nombreux pharmacophores ont aussi été proposés par différents groupes après des études de Relation Structure-Activité (RSA). D'après James,⁹⁸ il est nécessaire d'avoir une zone riche en électrons (δ_1), deux régions lipophiles (PAR et FRA) et une autre région lipophile (LA) capable de moduler la liaison au récepteur (Figure 13).

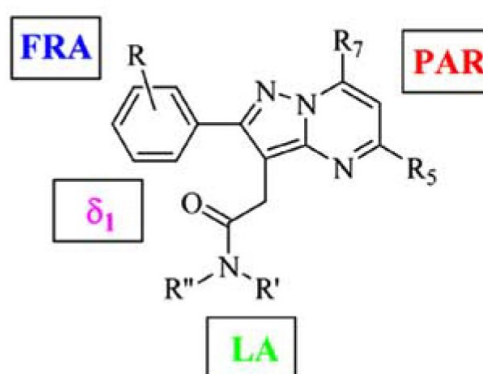


Figure 13 : Schéma du pharmacophore des Pyrazolo-pyrimidines⁹⁸

La liste présentée ci-dessous n'est pas exhaustive, il y a encore de nombreux composés en cours d'études dans plusieurs laboratoires de par le monde, tant dans la recherche institutionnelle qu'industrielle.

5.1. Ligands par famille chimique⁹⁸

5.1.1. Benzodiazépines

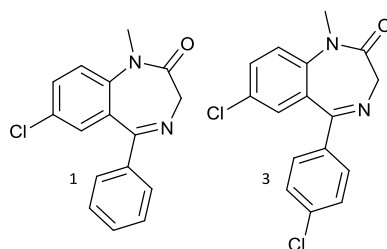


Figure 14 : Benzodiazépines : (1) Diazépam, (3) Ro5-4864

Le Diazépam **1** et le Ro5-4864 **3** sont des benzodiazépines et les ligands historiques du TSPO. Le diazépam (Valium®) est un médicament couramment utilisé comme anxiolytique et anticonvulsivant. Il

s'agit d'un modulateur allostérique du GABA_A. Son homologue *para*-chloré, le Ro5-4864 **3**, est le ligand historique sélectif du TSPO qui est une référence utilisée dans les études sur le TSPO. Son utilisation *in vitro* présente toutefois une limitation du fait de sa différence d'affinité avec le TSPO selon son espèce d'origine. Cela semble être dû au fait que les benzodiazépines nécessitent la présence d'autres protéines mitochondriales partenaires du TSPO pour montrer leur meilleure affinité.

5.2. (Iso)quinoline carboxamide

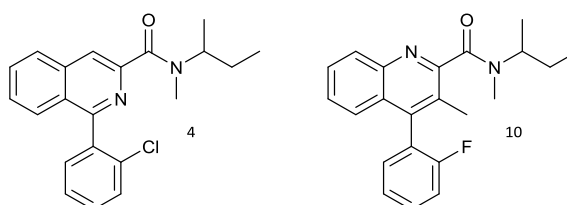


Figure 15 : Isoquinoline carboxamide : (4) PK-11195 ; Quinoline carboxamide : (10) VC198M

Le PK-11195 **4** est le premier ligand composé d'un noyau différent des benzodiazépines qui se lie au TSPO. Le PK-11195 se lie de manière réversible avec une affinité nanomolaire au TSPO. Le site de fixation des benzodiazépines est différent de celui des quinolines et la densité de ces derniers est 3 fois supérieure à celle des benzodiazépines au niveau du cortex, du cervelet et du pont.⁹⁹ Le PK-11195 est aussi capable d'activer la stéroïdogenèse en augmentant significativement la formation de prégnénolone chez des cellules de gliome C6.¹⁰⁰

Une étude flamande de 2003 a montré que le PK-11195 diminuait la quantité de médiateurs de l'inflammation comme la TNF α ou de monoxyde d'azote (NO), relargués par l'activation de la microglie. Cette première étude a montré que les ligands du TSPO pourraient altérer des processus cérébraux et avoir un effet thérapeutique sur des désordres neurologiques.¹⁰¹

Le PK-11195 est beaucoup utilisé comme outil biologique mais ne présente pourtant pas de bons paramètres pharmacocinétiques. Du fait de sa lipophilie, il n'a pas une très bonne solubilité ni une très bonne biodisponibilité et passe mal la BHE. Pour pallier à ces problèmes et conserver une telle sélectivité, d'autres composés comme le VC198M **10** ont été développés et présentent un meilleur profil cinétique. Les dérivés du type VC198M sont aujourd'hui utilisés comme radioligands en imagerie.⁹⁸

5.3. Benzothiazépines

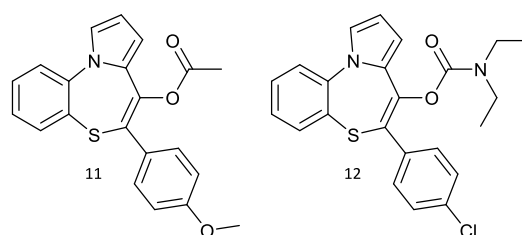


Figure 16 : Benzothiazépines : (11) THIA-66, (12) THIA-4i

Cette classe de ligands a été découverte en 1990 comme ligands pour le BZC, mais quelques composés comme le THIA-66 **11** ($IC_{50} = 34$ nM) ont montré une affinité nanomolaire pour le TSPO.¹⁰² Une étude RSA a montré l'importance du noyau pyrrole pour l'affinité ainsi que l'importance d'un groupement diéthylcarbamoyloxy en C7 et d'un chlore en position 4 conduisant au composé **12**, le THIA-4i ($IC_{50} = 2$ nM), qui est ainsi le ligand le plus affiné de cette classe de benzothiazépines, avec une affinité comparable à celle du « gold standard » PK-11195.¹⁰³ Ces ligands peuvent être utilisés comme des sondes pour des études *in vitro*, une étude plus approfondie est nécessaire pour évaluer leur profil pharmacologique *in vivo*.

5.4. Benzoxazépines

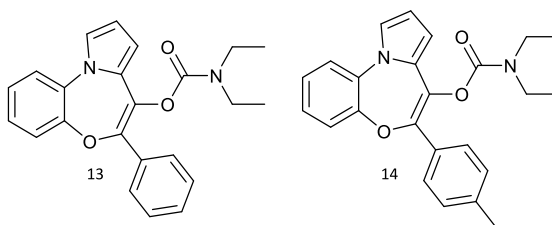


Figure 17 : Benzoxazépines : (13) OXA-17f, (14) OXA-17j

Ces dérivés OXA-17f **13** et OXA-17j **14** qui sont basés sur un scaffold pyrrolobenzoxazépine présentent une affinité respective de 0.26 nM et 0.36 nM pour le TSPO, sont inactives sur le CBR et montrent donc une grande sélectivité pour le TSPO. Ces composés sont capables de stimuler la production de neurostéroïdes chez les cellules adrénocorticales Y1 avec une puissance comparable aux références de la littérature comme le Ro5-4864 et le PK-11195.¹⁰⁴ Les composés issus de cette série ont été utilisés comme sonde permettant de définir le volume disponible dans la poche de fixation et ont servi à mieux caractériser les poches LA et δ_1 , initialement définies par James.⁹⁸ Des études de pharmacocinétique et de pharmacodynamie sont en cours pour continuer à évaluer cette famille chimique comme ligands du TSPO.

5.5. Phenoxyphenyl acétamide

Ces deux dérivés de la famille des Phenoxyphenyl acétamide ont été obtenus par coupure du squelette benzodiazépine du Ro5-4864. Ce sont des ligands spécifiques du TSPO qui ont montré des effets anxiolytiques sur des modèles animaux.^{105,106}

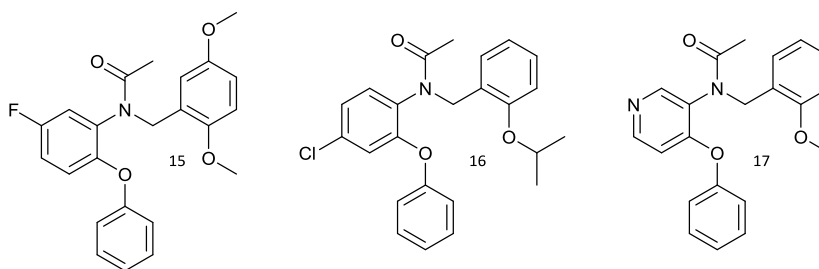


Figure 18: Phenoxyphenyl acétamide : (15) DAA1106, (16) DAA1097 (17) PBR28

Le DAA1106 **15** et le DAA1097 **16** ont des IC₅₀ de 0.28 et 0.92 nM, respectivement, et leur affinité est indépendante de l'espèce car ils ont également pu être reproduits chez le rat et le singe. Le [³H]DAA1106 est un outil pour l'autoradiographie qui a permis de déterminer les zones où le TSPO est exprimé avec une plus forte densité.¹⁰⁵

L'activité stéroïdogénique de ces deux composés a été évaluée sur des cellules de gliome C6-2B et sur des cellules de Leydig MA-10. Tandis que le DAA1097 **16** provoque une augmentation significative de la production de progestérone, le DAA1106 ne montre aucun effet significatif sur la production de prégnénolone chez ces lignées cellulaires.¹⁰⁷

D'autres dérivés de cette famille ont été synthétisés en changeant l'aniline par une aminopyridine et sont utilisés en imagerie comme le PBR28 **17**.

5.6. Indole acétamide et dérivés

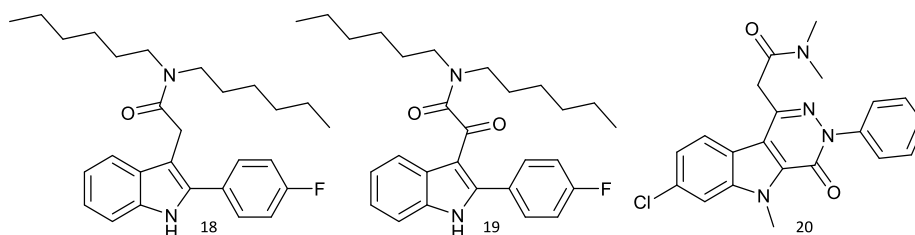


Figure 19: (18) FGIN-1-27, (19) IND-18 et (20) SSR-180,575

Les premiers représentants de cette famille ont été développés dans les années 90 en utilisant la synthèse de Fischer des indoles. Le FGIN-1-27 **18** montre une forte affinité pour le TSPO ($K_i = 5.0$ nM) et passe la BHE. Malgré sa forte sélectivité pour le TSPO, le FGIN-1-27 a des effets anticonvulsivants et son administration en intraveineuse à des doses micromolaires conduit à une sédation et une ataxie.

Ces effets pourraient être dus à une activation indirecte du GABA par la stimulation de la production de neurostéroïdes.¹⁰⁸ Le passage d'un amide N,N-dihéxyl à un N,N-diméthyl entraîne une diminution de l'affinité d'un facteur 20 de même que l'augmentation de la taille des chaînes carbonées sur l'amide diminue également l'affinité.¹⁰⁹

L'équipe de Da Settimo a rigidifié ces composés en échangeant la chaîne acétyle par une chaîne glyoxyl pour conduire à la famille des indolyglyoxylamides. Cette diminution de la flexibilité a amélioré l'affinité et l'activité de ces composés avec le composé « hit » l'IND-18 **19** qui a un IC₅₀ de 0.37 nM. Ces composés montrent également, selon leurs décorations, une bonne stimulation de la production de prégnénolone chez les cellules de gliome C6.¹¹⁰

Le SSR-180,575 **20** est un dérivé de la famille des pyridazinoindolacétamides développé par les laboratoires pharmaceutiques SANOFI dont le développement clinique en phase 2 est maintenant arrêté. Ce composé est le premier ligand TSPO qui a été montré comme favorisant la survie neuronale et la régénération dans des modèles d'axotomie et de neuropathies. Il présente une affinité nanomolaire pour le TSPO et stimule également la production de prégnénolone dans le cerveau de

souris. C'est une molécule qui nous servira de référence quant à l'évaluation de nos composés sur des tests fonctionnels de production de prégnénolone.¹¹¹

Il a été montré que le FGIN-1-27 **18** et le SSR-180,575 **20** passent la BHE mais il reste nécessaire de continuer à étudier ces composés *in vivo* pour obtenir plus d'informations de pharmacocinétique car la lipophilie supérieure au PK-11195 risque de poser des problèmes en vue d'une éventuelle administration *per os*. Ils restent néanmoins de bons candidats pour une utilisation thérapeutique ou dans l'imagerie.

5.7. Imidazopyridines

L'alpidem **21** est le premier membre de la famille des imidazopyridines qui se lie au CBR ou au TSPO avec des affinités nanomolaires, $K_i = 1-28$ nM et $0.5-7$ nM respectivement.¹⁰⁰ Bien que l'alpidem soit reconnu comme anxiolytique cliniquement actif¹¹² et soit capable de stimuler la stéroïdogénèse, sa nature non sélective limite son potentiel dans l'étude du rôle physiologique et pharmacologique du TSPO. Il s'agit d'un médicament qui a été commercialisé en France en 1991 pour le traitement l'anxiété et retiré du marché en 1994 à cause de son hépatotoxicité. Ces effets secondaires pourraient être dus à l'effet sur les récepteurs GABA_A que l'on retrouve parfois exprimé au niveau des tissus hépatiques.

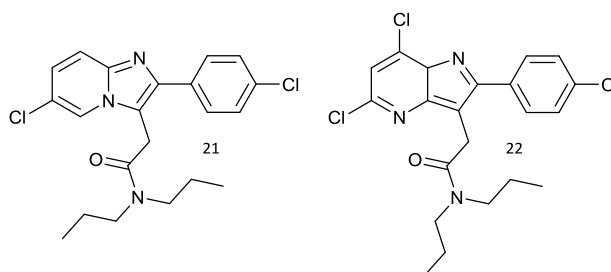


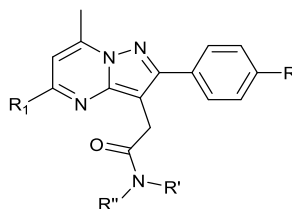
Figure 20 : Imidazopyridines : (21) Alpidem, (22) CB-34

L'équipe de Trapani a réalisé des études de RSA sur l'alpidem pour essayer de développer une nouvelle série d'imidazopyridines présentant une meilleure sélectivité pour le TSPO vis-à-vis du GABA_A.¹¹³ Le remplacement d'hydrogènes du cycle pyridine par des halogènes en position 6- et 8- a permis d'arriver à une sélectivité pour le TSPO. D'autres études de RSA et de RSS ont été réalisées par l'exploration de différentes chaînes alkyles sur la partie acétamide et ont conduit à la synthèse d'une autre série de phénylimidazo[1,2-c]pyridines.¹¹⁴ Plusieurs ligands « hits » découverts par cette équipe ont montré qu'ils étaient capables d'augmenter la production de neurostéroïdes chez les rats. Le CB 34 **22** issu de cette série est le plus prometteur de par sa bonne affinité, sa sélectivité et son habilité à stimuler la stéroïdogénèse tant au niveau périphérique que central avec une puissance supérieure à celle du PK-11195.

Certains composés de cette série ayant pourtant une bonne affinité n'ont aucun effet sur la concentration en neurostéroïdes au niveau du cortex cérébral et peuvent être considérés comme antagonistes.¹¹⁴ Ces résultats prouvent qu'il n'y a pas de corrélation directe entre l'affinité et la sélectivité pour le TSPO avec l'activité fonctionnelle stéroïdogénique.

5.8. Pyrazolopyrimidines

Les pyrazolopyrimidines sont des bioisostères des imidazopyridines avec une sélectivité plus grande pour le TSPO. Des études de RSA ont été menées pour évaluer l'influence de certaines substitutions ou modifications sur la sélectivité envers le TSPO, avec une étude plus approfondie des positions 5- et 7-¹⁰⁰ (voir tableau 2)



Nom	R	R ₁	R'	R''	K _i (nM)
DPA-713	-OCH ₃	-CH ₃	-Et	-Et	4.7
PYRA-3j	-Cl	-CH ₃	-Et	-Et	2.4
PYRA-3q	-CH ₃	-CF ₃	-Et	-Et	1.0
PYRA-4d	H	-CH ₃	-nBu	-nBu	4.5
PYRA-4j	H	-CH ₃	-Et	-Ph	0.8

Tableau 2 : Structures et affinité des composés "hit" de la famille de pyrazolopyrimidines

Les composés PYRA-3j et PYRA-3q stimulent aussi la production de prégnénolone chez les cellules de gliome de rat C6 avec une puissance comparable à celle du Ro5-4864 ou du PK-11195. Le DPA-713, quant à lui, ne montre aucun effet sur la stéroïdogenèse, prouvant encore une fois qu'il n'y a pas de corrélation entre l'affinité et l'activité sur l'augmentation de la production de stéroïdes. L'importance du groupement amide a été démontrée puis modulée par des modifications structurales qui ont conduit aux dérivés PYRA-4d et PYRA-4j stimulants la production de stéroïdes avec une puissance supérieure aux références de la littérature.¹¹⁵

5.9. Benzoxazine

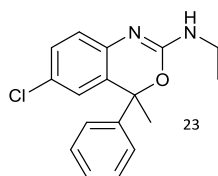


Figure 21 : Structure de l'Etifoxine (23)

L'etifoxine **23** est un anxiolytique commercialisé par les laboratoires BIOCDEX sous le nom de STRESAM® avec une indication dans les manifestations psychosomatiques de l'anxiété. C'est un ligand du GABA_A et du TSPO.¹¹⁶ L'effet anxiolytique est attribué à son action sur le GABA_A, tandis que l'effet neuroprotecteur découvert récemment¹¹⁷ serait dû à la stimulation de neurostéroïdes après activation du TSPO. L'affinité pour le TSPO reste assez faible (IC₅₀ = 18.3 μM vs [³H]PK-11195) mais ce ligand a montré une grande efficacité dans des études précliniques.^{117,118} Son utilisation thérapeutique risque d'être limitée par sa trop grande toxicité hépatique qui en fait un médicament à risque.

5.10. Purines - XBD173

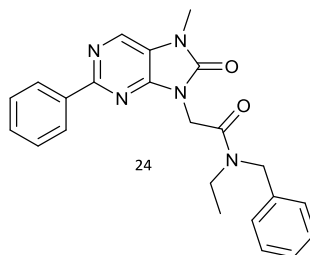


Figure 22 : Structure du XBD-173 (24)

Le XBD173 (ou Emapunil ou AC-5216) est un ligand du TSPO développé à la fin des années 90 par la compagnie pharmaceutique DIANIPPON comme anxiolytique sans les effets secondaires typiques des benzodiazépines. Cet effet est dû à l'activation du GABA_A par les neurostéroïdes d'origine endogène dont la formation est favorisée par l'activation du TSPO par le XBD173.

Ce composé dérivé de la famille des purines présente une bonne affinité pour le TSPO ($K_i = 0.3 - 3$ nM selon l'origine tissulaire). Son efficacité a été prouvée chez les rongeurs dans différents modèles d'anxiété comme le test de Vogel chez les rats et la boîte noire et les interactions sociales chez les souris.¹¹⁹

Il existe plusieurs tests permettant de caractériser les effets secondaires des benzodiazépines comme la détermination de l'effet myorelaxant, de la prolongation du sommeil induit par les barbituriques ou l'alcool, un test de mémoire ou encore la mesure de l'électroencéphalogramme du rat. Tous ces paramètres sont perturbés par l'action des benzodiazépines anxiolytiques sur le récepteur GABA_A. Le XBD-173 n'a activé aucun de ces marqueurs lors des tests précliniques *in vivo*, tout en montrant une efficacité sur des modèles d'anxiété chez le rongeur.

5.10.1. Etudes cliniques du XBD-173¹²⁰

Une étude de 2009, publiée dans Science,¹²¹ relate l'effet antipanique rapide du XBD-173 sans effets secondaires d'accoutumance et de dépendance chez l'homme et les rongeurs. Les chercheurs ont également établi les doses usuelles du XBD-173 pour une utilisation chez l'homme : 90 mg pour dose maximale efficace avec aucun effet observé avec des doses inférieures à 30 mg. C'est la première étude qui montre l'efficacité de l'utilisation de ligands du TSPO dans le traitement de l'anxiété chez l'homme par action sur le GABA sans les effets secondaires typiques des anxiolytiques comme les benzodiazépines.

Avant ces résultats, une étude de phase 2 menée par Novartis en 2005-2006 sur 400 personnes n'avait pas montré l'efficacité du traitement par le XBD-173 versus placebo sur différents marqueurs de l'anxiété.

Le groupe d'Owen¹²² étudie les différences de sensibilités aux ligands du TSPO en utilisant des méthodes d'imagerie comme le PET avec des radioligands. Ils ont tout d'abord montré qu'il existait trois groupes de patients exprimant le TSPO : les HABs (High Affinity binders), les LABs (Low Affinity Binders) ou encore les MABs (Mixed Affinity binders) différant par le niveau d'expression de sites de

haute ou de faible affinité. Après séquençage des patients appartenant aux différents groupes de « binders », cette différence a été attribuée au polymorphisme A147T du gène codant pour le TSPO,^{123,124} ayant un effet plus ou moins prononcé, selon le ligand, sur l'affinité de ce dernier. Pour le XBD-173, ils ont montré que l'occupation des sites de liaison pouvait être divisée par 10 à 15 selon le groupe de « binder » auquel appartient le patient traité.

Sachant que le XBD173 voit son affinité divisée par 15 chez les polymorphe A147T du TSPO, que 50% de la population caucasienne exprime au moins une copie de l'allèle mutant et que la majorité des patients de l'étude étaient caucasiens, il est possible qu'un biais important au niveau des doses ait été omis lors de la réalisation de l'étude clinique et que 50% des patients traités aient reçu une dose sous-thérapeutique, remettant ainsi en cause les résultats de cette étude.

Afin de mieux évaluer l'effet clinique du XBD-173, il serait nécessaire de réaliser une étude clinique avec des doses appropriées au génotype ou encore d'utiliser des classements de médecine stratifiée en ne recrutant que des patients pouvant répondre au traitement.

6. Utilisation des ligands TSPO en thérapeutique

Tous les ligands décrits dans le chapitre précédent ont été développés dans trois buts :

- Améliorer la compréhension des mécanismes du TSPO
- Les utiliser en imagerie médicale comme marqueurs de l'inflammation
- Découvrir de nouveaux moyens pour traiter les maladies affectant le SNC

Nous avons auparavant décrit les mécanismes connus du TSPO, son niveau d'expression selon quelques états pathologiques et l'utilisation possible de ligands marqués du TSPO comme outils diagnostiques. En considérant l'effet bénéfique des ligands du TSPO sur la viabilité neuronale, les processus de régénération et de la réponse neuroinflammatoire, on peut imaginer de nombreuses utilisations thérapeutiques des ligands du TSPO pour des indications au niveau des systèmes nerveux central et périphérique. La suite de cette introduction va donc présenter l'utilisation des ligands TSPO dans une approche thérapeutique.

6.1. Neuroinflammation⁵³

Après une lésion du système nerveux périphérique, les macrophages activés dérivés des populations locales ou recrutés dans la circulation ont un rôle dans la dégénération antérograde des fibres nerveuses appelée la « dégénérescence wallérienne ». Ce processus conduit à une digestion des axones et des gaines de myéline par ces macrophages activés suivi par une repousse de l'axone endommagé.¹²⁵ Pourtant, une inflammation importante et prolongée peut causer de gros dommages aux neurones et aux fibres nerveuses, cela semble donc important de pouvoir moduler cette réponse inflammatoire par le biais du TSPO dont l'expression est reliée à cette réponse. L'administration d'Etifoxine, de Ro5-4864 ou de PK-11195 module l'activation des macrophages et limite la production de cytokines pro-inflammatoires après une lésion du système nerveux périphérique.^{117,126,127}

Au niveau du SNC, l'activation de la microglie est directement liée à l'expression du TSPO.¹²⁸ Celle-ci à une action de défense contre les dommages et contribue au support neuronal, la régénération et la formation de la gaine de myéline.¹²⁹ L'activation chronique de la microglie a pourtant des effets délétères pour les neurones et constitue un facteur important dans les processus de neurodégénération. Cette activation est limitée lors de l'administration de Ro5-4864 ou de PK-11195 ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires au niveau central dans les modèles de dommages cérébraux excitotoxiques.^{130,131}

6.2. Lésions du système nerveux périphérique

L'effet neuroprotecteur des ligands du TSPO a été observé dans des modèles expérimentaux de douleurs neuropathiques, les neuropathies induites par les chimiothérapies et le diabète.^{111,118,132,133}

Douleurs neuropathiques

L'équipe de Zhou et Liu¹³⁴ a étudié l'effet des ligands FGIN-1-27 et Ro5-4864 sur la guérison d'un modèle *in vivo* de douleurs neuropathiques par la ligature du nerf spinal chez le rat. Ils ont observé une augmentation de l'expression du TSPO en corrélation avec l'intensité de l'allodynie provoquée par cette ligature, cette surexpression diminuant en même temps que la rémission de la lésion nerveuse jusqu'à retrouver un niveau normal au moment de la récupération d'une sensibilité normale. Ils ont localisé cette surexpression au niveau des cellules gliales spinales mais pas au niveau des neurones. Après administration (7^{ème} jour) de Ro5-4864 ou de FGIN-1-27 après la ligature (Jour 0), ils ont observé le rétablissement d'une sensibilité normale dès le 8^{ème} ou le 9^{ème} jour tandis que sans traitement, l'allodynie ne disparaît qu'au cinquantième jour. Ces résultats appuient l'hypothèse donnant un rôle au TSPO dans la régénération neuronale.

La vincristine est un agent antitumoral qui est connu pour induire des douleurs neuropathiques, son administration chez l'animal conduit à un modèle *in vivo* de douleurs neuropathiques généralisés. L'équipe de Poisbeau a montré en 2009¹¹⁸ que l'administration d'etifoxine avait un effet curatif et préventif sur ce modèle grâce à la stimulation de la sécrétion de stéroïdes neuroactifs réduits en position 3 α . Cet effet étant attribué à l'activation du TSPO dans la synthèse de neurostéroïdes.

La protection des fonctions mitochondriales en activant le TSPO semble être une bonne stratégie thérapeutique pour limiter ou prévenir les différents états de douleurs neuropathiques.

Neuropathie périphérique diabétique

Les neuropathies périphériques sont les plus importantes complications du diabète sucré qui touchent presque la moitié des patients diabétiques dans le monde. Au niveau central, l'hyperglycémie augmente la production de radicaux libres qui vont endommager les axones et les gaines de myéline. Au niveau clinique, on observe une diminution de la vitesse de transmission nerveuse, une diminution de la sensibilité thermique et une altération de l'activité de l'enzyme Na⁺, K⁺-ATPase qui maintient la différence de potentiel sur tout le neurone. Le seul moyen de traiter ces affections est de limiter l'hyperglycémie du patient en contrôlant régulièrement le taux de glucose sanguin tout en respectant un régime alimentaire strict. Chez le rat, il existe un modèle diabétique qui présente une diminution

de la concentration de neurostéroïdes au niveau du nerf sciatique et l'administration de neurostéroïdes comme la progestérone ou la testostérone a montré un effet neuroprotecteur.¹³⁵ En traitant ces rats avec du Ro5-4864, l'équipe de Melcangi a découvert que l'activation du TSPO stimulait la production de neurostéroïdes (prégnénolone, progestérone, testostérone et DHT) au niveau du nerf sciatique, rétablissant ainsi la dégradation neuronale, résorbant la désensibilisation thermique, restaurant la densité d'innervation dans la peau, l'expression protéique et l'activité de la Na⁺, K⁺-ATPase.

La protection des fonctions mitochondriales grâce aux ligands du TSPO semble être une bonne stratégie thérapeutique pour limiter ou prévenir les différents états de douleurs neuropathiques

6.3. Lésions cérébrales

La plupart des études sur le potentiel thérapeutique des ligands du TSPO se sont concentrées sur leurs propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires sur des modèles expérimentaux de lésions cérébrales excitotoxiques et traumatiques. Chez le rat, le modèle de lésions cérébrales excitotoxiques est induit par une injection intracérébrale ou intracérébroventriculaire d'acide kaïnique qui provoque une perte importante de neurones et une astrogliose au niveau de l'hippocampe. L'administration prophylactique de Ro5-4864 avant l'injection d'acide kaïnique limite la gliose réactive et la mort des neurones de l'hippocampe.¹³¹ Dans un modèle de contusion du cortex cérébral, le prétraitement avec du Ro5-4864 augmente le nombre de réseaux neuronaux conservés ainsi que le nombre de neurones survivants tandis que le traitement avec du PK-11195 n'a aucun effet.¹³⁶ L'effet du Ro5-4864 sur l'amélioration de la survie est corrélé à la diminution de l'œdème cérébral exprimé par une diminution significative de la quantité d'eau accumulée et de la pression intracrânienne à 24h après la blessure. Les animaux traités avec le Ro5-4864 se montraient en bien meilleure forme que ceux traités par le véhicule.^{137,138}

Les ligands du TSPO pourraient être une bonne stratégie thérapeutique dans la prévention des conséquences pathophysiologiques et la perte neuronale après un traumatisme crânien ou un choc ischémique, même au niveau d'autres organes à risque comme le cœur ou les reins.¹³⁹⁻¹⁴²

6.4. Maladies neurodégénératives

Sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie neurologique auto-immune qui provoque une démyélinisation des fibres nerveuses du cerveau, de la moelle épinière et du nerf optique. L'équipe de Deng a publié en 2013 une étude¹⁴³ montrant l'action de l'etifoxine sur un modèle de SEP : des souris atteintes d'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE).¹⁴⁴ Ils ont observé une surexpression du TSPO chez les souris EAE et plus spécifiquement au niveau des astrocytes activés et de la microglie activée. L'efficacité du traitement a été évaluée en calculant un score représentatif des effets cliniques de la maladie pour chaque groupe d'animal : l'administration d'etifoxine réduit l'extension de la maladie et favorise la rémission. Des études précédentes¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ avaient montré que la sécrétion des neurostéroïdes était altérée chez les patients atteints de SEP ou dans les modèles EAE dû à la

diminution de l'expression de l'enzyme 3 α HSDIII qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse de l'alloprégnanone. Ces mêmes études avaient aussi observé l'effet positif de l'administration de progestérone et d'alloprégnanone chez le modèle EAE mais l'administration de stéroïdes à long terme peut être préjudiciable pour le sujet, il est donc préférable d'activer la biosynthèse de ces neurostéroïdes grâce à l'activation du TSPO par une petite molécule hétérocyclique comme l'etifoxine. Cette étude a aussi montré qu'en modulant l'activité du TSPO, il y avait moins de cellules immunitaires périphériques qui s'infiltraient dans la moelle épinière tout en augmentant la régénération des oligodendrocytes formant la myéline, ayant ainsi un double effet sur la rémission du modèle EAE. Il n'existe actuellement pas de traitement pour traiter la SEP et les autres maladies neurologiques auto-immunes, ces études indiquent que le TSPO pourrait être une cible de choix dans le traitement de ces affections neuroinflammatoires.

Maladie D'Alzheimer

Un consortium de chercheurs de plusieurs nationalités a étudié l'effet du Ro5-4864 sur le développement de la maladie d'Alzheimer chez les souris triples transgéniques 3xTgAD.¹⁴⁹ Ils ont étudié les effets sur la neurostéroïdogénèse et la neuropathologie liée à la maladie d'Alzheimer incluant l'accumulation d'A β , la gliose et la dégradation comportementale chez des souris âgées de 7 ou 24 mois pour comparer l'intervention thérapeutique à différents stades du développement de la maladie. Ils ont observé que l'administration de Ro5-4864 atténuait l'accumulation d'A β au niveau de l'hippocampe, diminuait la gliose, modifiait la sécrétion de testostérone et de progestérone dans le cerveau et améliorait les mesures cognitives des souris 3xTgAD. Les effets anxiolytiques du Ro5-4864 sont aussi responsables de ces résultats car l'anxiété est partie prenante de la dégradation cognitive des patients atteints d'Alzheimer ou les souris 3xTgAD. Le ciblage simultané de ces deux composantes (neurodégénération et anxiété) améliore ainsi les résultats cognitifs chez les souris 3xTgAD.

Il s'agit de la première étude montrant l'effet bénéfique de ligands du TSPO sur la maladie d'Alzheimer en agissant sur plusieurs cibles cliniques comme la fonction mémorielle et les comportements anxieux. Les ligands du TSPO semblent ainsi offrir une alternative aux stratégies thérapeutiques focalisées sur la réduction de l'accumulation d'A β car ils ciblent simultanément plusieurs facettes de la cascade neurodégénérative comme la neuroinflammation, le stress oxydant, le dysfonctionnement mitochondrial et la perte neuronale.

6.5. Tumeurs cérébrales

La mitochondrie est le médiateur clé de la voie intrinsèque de l'apoptose et le TSPO semble avoir un rôle important, en interaction avec le MPTP, dans ces cascades de signalisation par les caspases. Le Knock-down du TSPO réduit la mortalité cancéreuse et provoque une diminution de l'apoptose d'environ 60%.⁴¹ Cet effet serait dû au rôle spécifique du TSPO dans la génération de ROS qui peuvent activer les voies apoptotiques mitochondriales par relargage du cytochrome c et ainsi provoquer la perméabilité membranaire par le biais du VDAC, composant majeur du MPTP.

Le PK-11195, le Ro5-4864 et le FGIN-1-27 augmentent la survenue de l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses comme le neuroblastome ou le glioblastome. Lors d'une co-administration, ils peuvent, à des concentrations micromolaires, potentialiser les effets des chimiothérapies.¹⁵⁰ L'effet de ces ligands n'est peut-être pas directement lié au TSPO car leur effet pro-apoptotique peut également être observé après un knock-down du TSPO ou encore chez les cellules qui n'expriment pas le TSPO.^{151,152} Cet effet serait donc attribué à la cytotoxicité intrinsèque des ligands du TSPO à forte concentration. Plus récemment, l'équipe de Da Settimo a développé un composé agissant sur plusieurs voies de signalisation en réactivant la protéine p53 et en activant le TSPO.¹⁵³ Leur composé hit a ainsi montré une forte activité pro-apoptotique en activant ces deux voies sur des cellules de glioblastome.

Avant d'envisager l'utilisation de ligands du TSPO comme adjuvants ou comme traitement anticancéreux, il reste à étudier les mécanismes impliqués dans cet effet pro-apoptotique ainsi que la cytotoxicité des ligands du TSPO à forte concentration. Néanmoins, par ses fonctions sur la génération des ROS et son implication mitochondriale, le TSPO pourrait être une cible intéressante.

6.6. Troubles Psychiatriques

Les neurostéroïdes issus de la transformation du cholestérol en prégnénolone sont des modulateurs allostériques du GABA_A. La stimulation du TSPO permet ainsi d'augmenter la concentration des neurostéroïdes au niveau central et de moduler la transmission synaptique. Plusieurs ligands du TSPO comme l'Étifofoxine, le XBD-173, la série des imidazopyridines et des phénoxyphényl acétamides ont montrés des propriétés anxiolytiques et anti-paniques dans des modèles d'expérimentation animale. L'avantage principal de l'utilisation des ligands du TSPO dans ces indications est l'effet anxiolytique rapide, proche de celui des benzodiazépines sans leurs effets délétères de tolérance et de retrait/dépendance. Ces propriétés ont été démontrées pour le XBD-173 chez l'homme et l'animal.^{121,154} D'une manière plus générale, les effets de l'allopregnanolone sur l'anxiété et la dépression sont relativement bien décrits, on peut donc imaginer un bon effet des ligands du TSPO dans ce type de maladie. Il est tout de même important d'effectuer des études cliniques plus longues pour étudier si la toxicité hépatique de l'Alpidem ou de l'Étifofoxine est liée à leurs structures chimiques ou leur action sur le TSPO.⁵³

7. Le « paradoxe » fonctionnel du TSPO : un enjeu pour le développement thérapeutique

Dans les paragraphes précédents, nous avons décrit les ligands qui ont été développés pour cibler le TSPO. De manière assez surprenante, les notions d'agonisme et d'antagonisme n'ont pas été évoquées dans les journaux. Si la détermination de l'affinité est bien maîtrisée via des tests de déplacement de ligands radioactifs comme le [³H]PK-11195 ou encore le [³H]Ro5-4864, le caractère fonctionnel d'un ligand vis-à-vis du TSPO reste un sujet à débat. Par exemple, dans le cas du PK-11195, Rupprecht le décrit comme un agoniste ou un antagoniste selon le type cellulaire, l'environnement

tissulaire ou encore la présence de ligands endogènes.⁵³ Il y a tout de même un consensus général sur la capacité des ligands à induire la production de prégnénone. Néanmoins, un problème subsiste : il n'y a pas de corrélation entre l'affinité et l'activité fonctionnelle de production de prégnénone. Ce paradoxe a été décrit par Scarf et Kassou en 2012 dans la revue *Current Molecular Medicine*.¹⁵⁵ Ils concluent qu'il est nécessaire de mieux comprendre les sites de fixation sur le TSPO afin de pouvoir établir un pharmacophore représentatif de l'activité fonctionnelle et ainsi prédire, selon le châssis moléculaire ou ses décorations, un effet physiologique attendu.

8. Conclusion

Au fil de cette introduction, nous avons tenté de retranscrire la complexité des mécanismes dans lesquels le TSPO est impliqué. Nous avons pu voir l'état actuel des connaissances sur sa structure, son mécanisme d'action, ses implications physiologiques ou pathologiques ainsi que ses ligands endogènes ou synthétiques. Nous avons ainsi pu mettre en lumière les contradictions de certaines de ses propriétés, les différentes remises en cause de son rôle physiologique et de son intervention potentielle dans des mécanismes complexes de sauvegarde de l'activité neuronale. Nous avons aussi pu voir les difficultés liées au développement de ligands pour le TSPO bien que l'on puisse facilement imaginer un fort intérêt thérapeutique. De nombreuses entreprises pharmaceutiques se sont ainsi lancées dans cette course, avec des approches psychiatriques ou neurodégénératives, imaginant de nouvelles approches thérapeutiques ou diagnostiques. Mais, après presque 38 années de recherches sur le TSPO, la communauté scientifique essaie toujours de résoudre les mystères liés à cette protéine et son expression sur la protection de notre cerveau.

Objectifs

Cette thèse financée par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche s'inscrit dans le consortium « NeuroRhine », financé par l'Europe et les 3 régions du Rhin supérieur. Ce consortium implique des équipes de chimistes, de biologistes et de pharmacologues issus des universités de Strasbourg, Basel et Freiburg pour l'étude approfondie des mécanismes de neuroprotection de neurogenèse dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer.

Dans le cadre de ce projet, notre attention s'est portée sur le développement de ligands ciblant la protéine TSPO. La protéine Translocatrice 18kDa (TSPO) est une protéine mitochondriale dont la fonction est de transporter le cholestérol du cytosol vers la matrice mitochondriale. Ce cholestérol est ensuite métabolisé en prégnénolone, précurseur principal de la biosynthèse des neurostéroïdes dont l'allopregnanolone. Cette dernière a montré des effets neuroprotecteurs dans différents modèles de maladies neurodégénératives et de douleurs neuropathiques. L'administration *in vivo* d'allopregnanolone étant peu efficace, l'activation du TSPO au moyen de ligands sélectifs permet d'induire la sécrétion des neurostéroïdes comme l'allopregnanolone de manière endogène. Les mécanismes impliquant le TSPO sont encore peu décrits, ainsi que les autres rôles potentiels de cette protéine, tant au niveau physiologique que pathophysiologique.

Il existe dans la littérature de nombreux ligands du TSPO qui ont été développés selon des critères d'affinité, en négligeant leurs aspects fonctionnels. Toutefois, des travaux récents ont montré une absence de corrélations entre l'affinité et la fonction des ligands ciblant la protéine TSPO. Malgré de fortes affinités, beaucoup de ces ligands ont un effet fonctionnel faible ou non décrit.

Pour ce travail de thèse, nous avons intentionnellement abordé l'évaluation des ligands du TSPO via leurs effets fonctionnels, plutôt que par leur affinité. Nous avons travaillé sur plusieurs familles chimiques identifiées au laboratoire, comprenant des dérivés hétérocycliques de type imidazo[1,2-c]quinazolinone et des dérivés peptidiques autour de la phénylalanine (Figure 23). Dans le cadre de cette étude structure-fonction, nous avons comparé nos composés avec plusieurs ligands de référence (XBD173, SSR-180,575, Ro5-4864) que nous avons resynthétisés pour l'occasion.

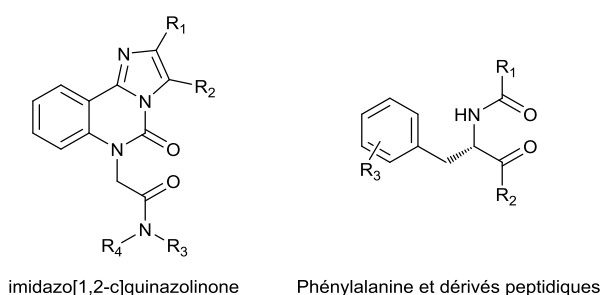


Figure 23 : Familles étudiées pour leur effet fonctionnel

La plupart des ligands du TSPO synthétisés au laboratoire ou décrits dans la littérature présentent un problème récurrent de solubilité dans l'eau. Dans ce contexte, nous avons entrepris de réaliser une analyse structurale qualitative et quantitative induisant cette insolubilité et nous avons tenté de proposer un nouveau châssis permettant d'améliorer cette propriété via une diminution de la planéité du châssis moléculaire accompagnée d'une réduction du caractère aromatique (Figure 24).

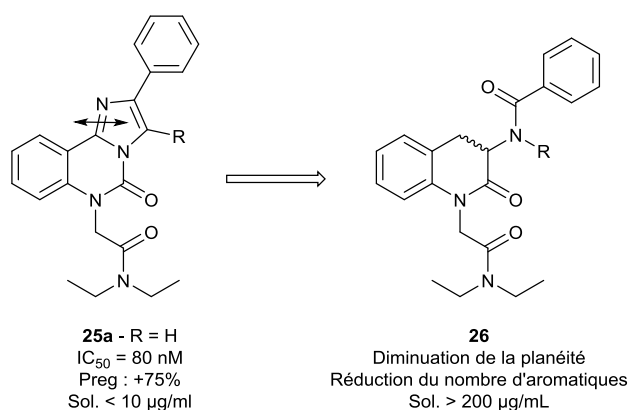


Figure 24 : Passage à des composés plus solubles

Pour accéder à ce nouveau châssis, nous avons réalisé une étude méthodologique autour d'une réaction de cyclisation de la 2-bromophénylalanine par une amination pallado-catalysée de type Buchwald-Hartwig (Figure 25), et nous avons plus particulièrement étudié la sélectivité de la cyclisation, induite par l'utilisation de ligands spécifiques.

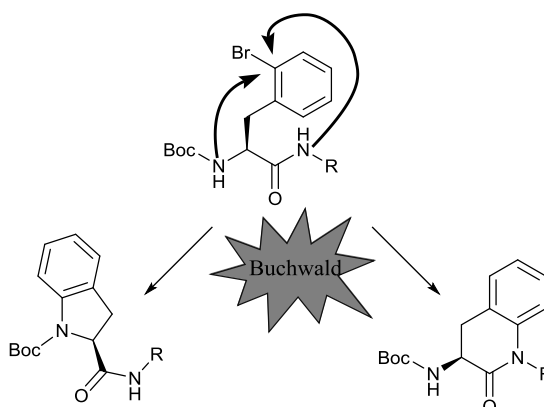


Figure 25 : Cyclisation envisagée

Suivant notre approche fonctionnelle, les ligands synthésés lors de cette thèse ont été évalués pour leur capacité à induire la production de prégnénone *in vitro*. Afin de mieux comprendre le(s) rôle(s) du TSPO au niveau cellulaire, les ligands synthésés ont été évalués sur l'activité mitochondriale (respiration, production d'ATP, production d'espèces réactives de l'oxygène) sur des neuroblastomes sains ou exprimant l'APP dans un modèle de la maladie d'Alzheimer.

A ce jour, le TSPO est essentiellement décrit pour son activité neuroprotectrice via la neurostéroïdogénèse. Néanmoins, de récents travaux laissent penser que le TSPO pourrait avoir une action protectrice plus large, concernant notamment des cellules indépendantes du système nerveux central. Dans ce contexte, le TSPO semble impliqué dans la protection des globules rouges face à l'infection du *Plasmodium falciparum* (parasite responsable du paludisme). Ce système est particulièrement intéressant si l'on considère que les globules rouges ne possèdent pas de mitochondries. Ce concept est encore peu décrit expérimentalement, et nos ligands synthésés ont ainsi pu servir d'outils biologiques pour une meilleure compréhension des mécanismes induisant cette protection anti-parasitaire.

En parallèle à ce projet de recherche en chimie médicinale, nous avons également synthétisé des dérivés du Ro5-4864, ligand du TSPO, pour évaluer leur activité inhibitrice de la Phosphodiésterase 5 pour le traitement des douleurs neuropathiques.

Enfin, notre laboratoire a une bonne expertise dans la synthèse de ligands fluorescents servant à la mise au point de tests de binding par compétition (collaboration avec l'entreprise CisBio Assays). Il n'existe actuellement aucun ligand fluorescent permettant de cibler la sous-unité unité α_1 du récepteur central aux benzodiazépines (CBR) et nous avons essayé de réaliser des sondes fluorescentes pour le récepteur central aux benzodiazépines basées sur un châssis imidazopyridine.

Partie B - Développement de ligands du TSPO comme agents neuroprotecteurs

1. Objectifs

Plusieurs familles de ligands du TSPO ont été développées au laboratoire dans les années 90 mais jamais publiés. A l'époque, seule l'affinité de ces composés pour le TSPO avait été évaluée, leur activité fonctionnelle n'avait pas du tout été considérée. Dès le début de ma thèse, j'ai été impliqué dans le projet « Neurogénèse et neuroprotection pour la prévention des troubles neurologiques et la restauration des fonctions neurophysiologiques », financé par le programme européen Interreg – Offensive Science (2013 – 2015). Ce projet a permis la mise en place du consortium « NeuroRhine », impliquant des chimistes, des biologistes et des pharmacologues. L'un des objectifs du programme était dans un premier temps d'évaluer les effets fonctionnels des ligands TSPO sur des tests *in vitro* montrant un potentiel effet dans la neuroprotection et la neurogenèse. L'approche consistait à tester les ligands de référence du TSPO, mais aussi ceux développés dans le passé par le Dr. Mustapha Abarghaz au sein du laboratoire. Sur la base de ces résultats, le projet consistait à proposer de nouvelles familles de ligands TSPO présentant de meilleures propriétés physicochimiques, notamment en termes de solubilité.

Dans la première partie de ce projet, j'ai reconstitué une librairie de ligands du TSPO, en incluant tous les produits synthétisés à l'époque par le Dr. Mustapha Abarghaz. La pureté des produits a été évaluée, et les caractérisations analytiques (^1H et ^{13}C RMN) ont été complétées. J'ai également compilé dans une base de données l'ensemble des résultats biologiques associés à ces produits. Par ailleurs, j'ai synthétisé les 3 ligands de référence (Ro5-4864, XBD-173 et SSR 180,575) afin qu'ils servent de références dans l'ensemble des tests biologiques. Pour finir, je me suis investi dans la réalisation des tests biologiques *in vitro*, et notamment dans l'évaluation de la production de prégnénone induite par les ligands du TSPO.

Dans un 2^{ème} temps, j'ai développé de nouvelles familles chimiques peptidiques et non-peptidiques comme nouveaux ligands du TSPO, et j'ai participé à leur évaluation fonctionnelle.

2. Les imidazo[1,2-c]quinazolinones développées par le Dr. Mustapha Abarghaz

Au cours de sa thèse au laboratoire, le Dr. Mustapha Abarghaz a développé cette famille montrant une affinité nanomolaire pour le TSPO. Tous les composés synthétisés ont été testés par la CEREP pour leur affinité sur le TSPO et leur sélectivité vis-à-vis du récepteur central aux benzodiazépines (CBR). Nous avons repris ce travail en réalisant l'évaluation des composés pour leur capacité à induire une augmentation de la production de prégnénone

2.1. Concept

Les travaux de Mustapha se basent sur les travaux de Francis *et al.*^{156,157} décrivant de nouveaux ligands du CBR basés sur des [1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolin-5(6H)-one **27**. Après l'observation des différents ligands de référence du TSPO, l'équipe du Dr. Bourguignon a eu l'idée d'insérer une chaîne *N,N*-

diéthylacétamide sur l'azote libre de l'urée du cycle quinazolinone. Il s'agit là d'un motif « signature » de la plupart des ligands du TSPO (Figure 26).

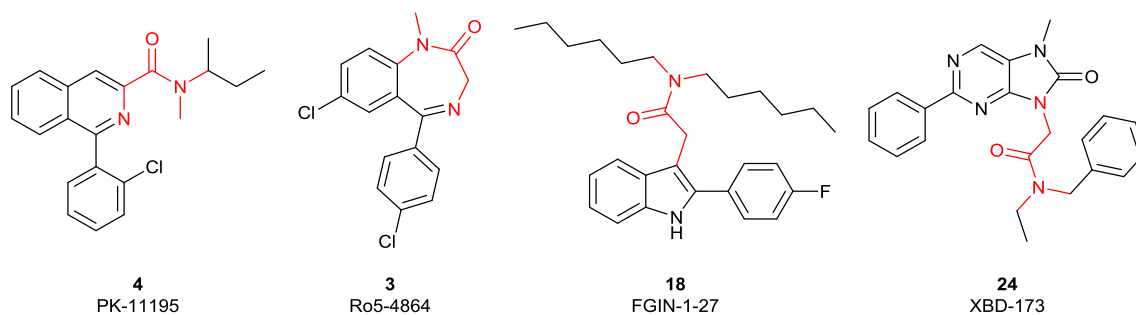
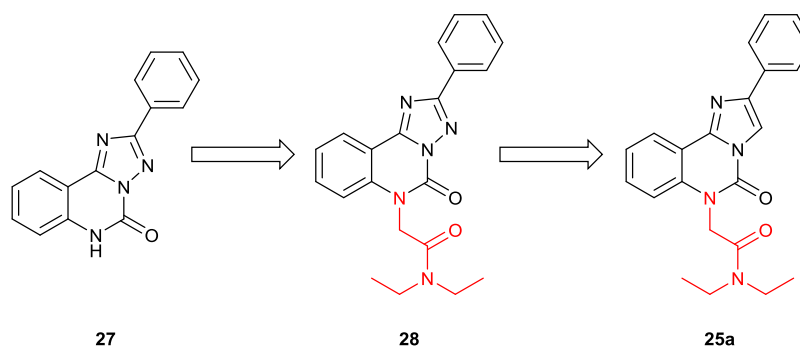


Figure 26 : Ligands de référence présentant la « signature » acétamide

Il est décrit dans la littérature que la présence de l'azote 2 de la [1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolin-5(6H)-one **28** permet une superposition avec les structure du type 1,4-benzodiazépi-2-ones, ligands du récepteur GABA_A.¹⁵⁸ En se basant sur cette observation des modélisateurs de l'époque, le composé imidazo[1,2-c]quinazolinone a également été synthétisé.



Entrée	Composé	Nom	IC ₅₀ (nM)	
			CBR	TSPO
1	27	CGS-13767	15	9800
2	28	NCS-1056	1700	60
3	25a	NCS-1008	>10000	80

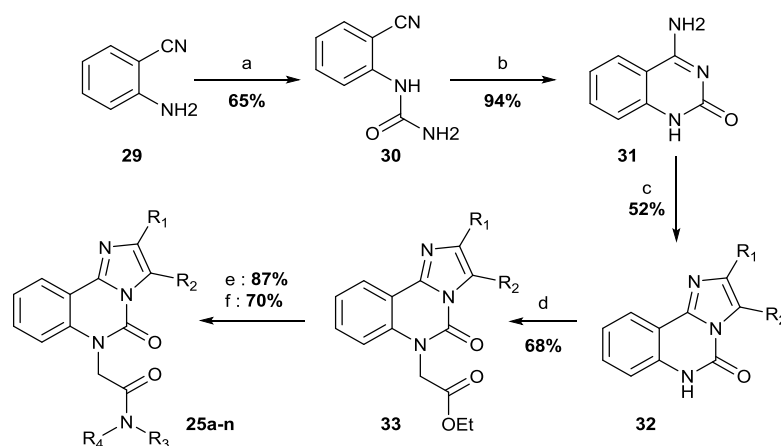
Tableau 3 : Effet de l'insertion d'une chaîne N,N-diéthylacétamide - Concept développé par le Dr. Abarghaz à partir des travaux de Francis^{156,157}

Les affinités des ligands **27**, **28** et **25a** pour le TSPO et le CBR ont été déterminées par la CEREP et sont présentés dans le tableau 3. L'insertion de la chaîne N,N-diéthylacétamide a permis, en comparaison avec le composé **27** non alkylé, d'inverser la sélectivité pour le TSPO vis-à-vis du CBR, passant d'une IC₅₀ de 15 nM à 1700 nM pour le CBR et de 9.8 μM à 60 nM pour le TSPO. Cette sélectivité est encore améliorée par le remplacement du cycle triazole par le cycle imidazole. Ce carbaisostère **25a** présente ainsi une IC₅₀ de 80 nM pour le TSPO et ne montre aucune affinité pour le CBR aux doses testées (> 10 μM).

2.2. Synthèse des imidazo[1,2-c]quinazolin-5-ones

L'action du cyanate de potassium en milieu acide sur le 2-aminobenzonitrile **29** fournit l'orthocyan(aminocarbonyl)aminobenzène **30**. Ce dernier est cyclisé en milieu méthanolate pour donner la 4-

aminoquinazolin-2-one **31**. Le squelette imidazo[1,2-*c*]quinazolin-5-ones est ensuite obtenu par une réaction de cyclocondensation entre une α -bromocétone et la 4-aminoquinazolin-2-one **31**. Cette méthode permet d'introduire des groupements variés en R₁ et R₂ sur l'imidazole selon les substituants présents sur le réactif halogéné. La fonctionnalisation du squelette intervient par l'alkylation de l'azote libre de la partie quinazolinone **32** en présence d'hydrure de sodium et de chloroacétate d'éthyle. L'ester **33** est ensuite hydrolysé puis l'amine secondaire désirée est couplée en présence de DCI.



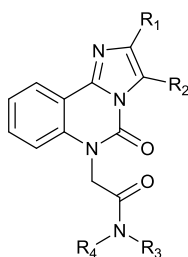
(a) KOCN, AcOH, ta, 24h; (b) MeONa, MeOH, reflux, 2h; (c) R₁-CO-CHR₂Br, DMF, 110°C, 3h; (d) ClCH₂CO₂Et, NaH, DMF, ta, 15h; (e) HCl, AcOH, 100°C, 12h; (f) CDI, HNR₃R₄, DMF, 40-80°C, 4h.

Figure 27: Synthèse des imidazo[1,2-*c*]quinazolinones 25a-n

2.3. Etude RSA autour des imidazo[1,2-*c*]quinazolinones

La bonne affinité et la sélectivité de l'imidazo[1,2-*c*]quinazolinone **25a** pour le TSPO a poussé le Dr. Abarghaz à synthétiser une librairie de dérivés d'imidazo[1,2-*c*]quinazolin-2-ones diversément substitués **25b-n**, et dont les affinités vis-à-vis du TSPO et du CBR ont été évaluées par la CEREP sur un test de compétition sur des microsomes de cœur de rat en présence de ligands radiomarqués (Tableau 4).

Comme expliqué Partie A -2.2. , les poches de fixation du Ro5-4864 et du PK-11195 ne sont pas exactement les mêmes mais se superposent légèrement. L'habilité des imidazo[1,2-*c*]quinazolinones à déplacer les deux ligands marqués a été mesurée et on observe différentes sélectivités pour le déplacement du Ro5-4864 ou le PK-11195.



#	Composé	Nom	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ (nM)		
							[³ H]PK-11195	[³ H]Ro5-4864	[³ H]Flumazenil
1	25a	NCS1008	Ph-	H	Et	Et	400	80	>10 000
2	25b	NCS1026	Ph-	H	Pr	Pr	11	12	>10 000
3	25c	NCS1014	4-MeO-Ph-	H	Et	Et	140	120	>10 000
4	25d	NCS1020	3,4-(MeO) ₂ -Ph-	H	Et	Et	150	500	>10 000
5	25e	NCS1028	2-Cl-Ph-	H	Et	Et	280	34	>10 000
6	25f	NCS1016	3-Cl-Ph-	H	Et	Et	58	50	>10 000
7	25g	NCS1012	4-Cl-Ph-	H	Et	Et	1500	>10 000	>10 000
8	25h	NCS1018	2-furanyl-	H	Et	Et	260	580	>10 000
9	25i	NCS1019	3-thiophenyl-	H	Et	Et	200	130	>10 000
10	25j	NCS1033	tBu-	H	Et	Et	130	70	>10 000
11	25k	NCS1042	tBu-	H	Pr	Pr	39	18	>10 000
12	25l	NCS1031	-CO-Ph	H	Et	Et	220	200	>10 000
13	25m	NCS1017	Ph	Me	Et	Et	29	9	>10 000
14	25n	NCS1039	Ph	H	Me	Ph	2	1	>10 000

Tableau 4 : Etude de binding autour des dérivés imidazo[1,2-c]quinazolinones

Tous ces composés sont sélectifs pour le TSPO vis-à-vis du CBR. Les dérivés présentant des groupements lipophiles comme un *tert*-butyle (**25j**, entrée 10) ou un phényle (**25a**, entrée 1) en R₁ présentent de meilleures affinités que les composés disposant de groupements accepteurs de liaisons hydrogènes (furanyle **25h**, thiophène **25i**, et benzoyle **25l**, entrées 8, 9 et 12) dans cette position.

Les entrées 5, 6 et 7 du tableau 4 montrent que l'ajout d'un groupement hydrophobe comme un chlore en position *para* du phényle en R₁ n'est pas toléré (**25g**), tandis que les positions *ortho* (**25e**) et *meta* (**25f**) améliorent légèrement l'affinité. L'insertion de groupements méthoxys accepteurs de liaison H (**25c**, **25d**, entrées 3 et 4) entraîne une perte d'affinité dans le déplacement du [³H]Ro5-4864, mais dans le même temps un petit gain d'affinité avec [³H]PK-11195.

Pour les dérivés présentant un phényle en R₁ (**25a**, **25b**, entrées 1 et 2), le passage du diéthylamide au dipropylamide provoque un gain d'affinité d'un facteur 40 dans le déplacement du [³H]PK-11195 et de 8 dans le déplacement du [³H]Ro5-4864. Cette homologation engendre seulement un gain d'un facteur 3 et 4 dans le cas des composés présentant un *tert*-butyle en R₁ (**25j**, **25k**, entrées 10 et 11). Néanmoins, il est remarquable de noter qu'un simple passage d'éthyle à propyle permet de générer des composés présentant des affinités entre 10 et 40 nM avec les 2 sondes radioactives. L'amide dissymétrique N-méthyle-N-phényle apporte un gain conséquent d'affinité pour les deux poches de fixation (**25n**, entrée 14).

Le remplacement de l'hydrogène par un méthyle en R₃ (**25m**, entrée 13) entraîne également un gain significatif d'affinité de facteurs 13 ([³H]PK-11195) et 9 ([³H]Ro5-4864) par rapport au dérivé **25a**.

Nous avons expliqué dans la Partie A -7. qu'il n'existe pas, dans le cas du TSPO, de lien de corrélation entre l'affinité d'un ligand pour sa cible et l'effet fonctionnel lié à ce ligand donné. Nous avons donc décidé, grâce à la possibilité offerte par le partenariat du consortium Neurorhine, de réévaluer ces composés sur des tests fonctionnels.

2.4. Etudes fonctionnelles des imidazo[1,2-c]quinazolin-2-ones

L'objectif de ce travail de thèse est de développer des ligands du TSPO montrant des effets dans la neuroprotection. En favorisant le transport du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie pour être transformé en prégnénolone, les ligands TSPO stimulent ainsi la neurostéroïdogénèse, et notamment la production d'allopregnanolone, molécule connue pour ses effets neuroprotecteurs mais difficile à administrer sous forme de médicament (Figure 28). Notre stratégie est donc basée sur une approche indirecte visant à augmenter la production d'allopregnanolone endogène. L'allopregnanolone résulte d'une longue cascade enzymatique au départ du cholestérol (Figure 10), et sa quantification implique trop de variables. Nous avons donc choisi d'étudier la production de prégnénolone, qui est le premier stéroïde synthétisé à partir du cholestérol après son transport médié par le TSPO à l'intérieur de la mitochondrie.

Par ailleurs, nous essaierons de voir si les ligands de TSPO peuvent également agir à d'autres niveaux que la stéroïdogénèse, et nous focaliserons notre étude sur leurs effets potentiels dans le fonctionnement de la mitochondrie, notamment au niveau de la respiration mitochondriale au travers de la production d'ATP.

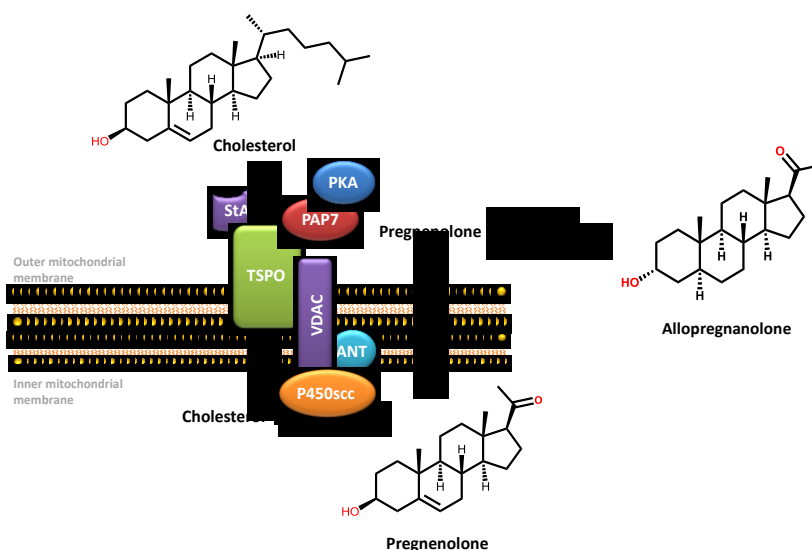


Figure 28 : Action du TSPO sur la biosynthèse de l'allopregnanolone

Nous avons mis en place plusieurs tests pour évaluer l'effet fonctionnel des ligands du TSPO que nous avons développé :

- Un test visant à quantifier la production de prégnénolone dans 3 lignées cellulaires différentes, afin de mesurer un effet direct de nos ligands sur le transport du cholestérol par le TSPO
- Un test visant à quantifier la production d'ATP, afin d'évaluer l'effet des ligands TSPO sur la respiration mitochondriale de cellules de neuroblastome en conditions normales ou pathologiques.
- Un test visant à quantifier la production d'espèces oxydantes (ROS), afin d'évaluer l'effet des ligands TSPO sur les mécanismes de réponse au stress oxydant chez les cellules de neuroblastome en conditions normales ou pathologiques.

Nous avons souhaité comparer les résultats obtenus dans ces différents modèles avec ceux observés pour les ligands de la littérature, et en particulier ceux ayant été en Phase 2 d'études cliniques (XBD-173, et SSR 180,575). Nous avons ainsi synthétisé les ligands de référence Ro5-4864, XBD-173 et SSR-180,575.

2.4.1. Synthèse du Ro5-4864

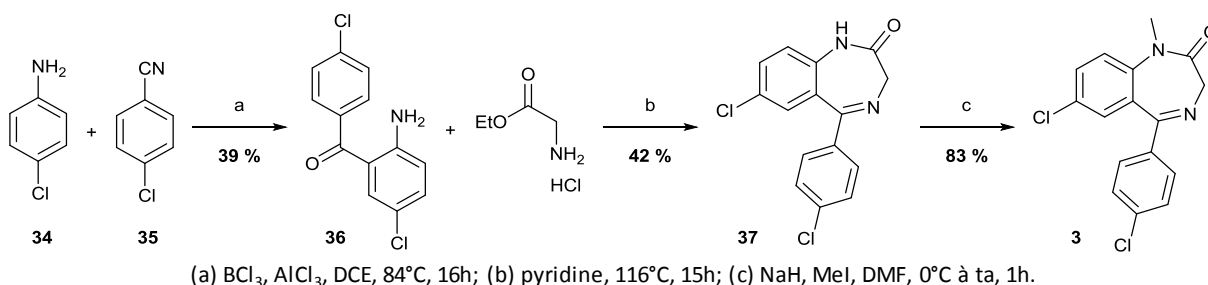


Figure 29 : Synthèse du Ro5-4864

La *p*-chloroaniline **34** est condensée avec le *p*-chlorobenzonitrile **35** en présence de trichlorure de bore et de trichlorure d'aluminium pour former la benzophénone **36**. Celle-ci est alors condensée avec la glycinate d'éthyle dans la pyridine pour former le squelette 1,4-benzodiazépin-2-one desméthyl **37**. L'alkylation de l'amide est ensuite réalisée avec le MeI en présence d'hydrure de sodium pour conduire au Ro5-4864 **3**.

2.4.2. Synthèse du XBD-173

La condensation du benzimidamide **38** avec le 2-(éthoxyméthylène)malonate de diéthyle **39** en milieu éthanolate conduit à la pyrimidinone **40** qui peut réagir avec la glycine après activation par POCl_3 pour former l'amidine **42**. L'acide carboxylique est ensuite fonctionnalisé en amide disubstitué puis l'ester **43** est hydrolysé pour donner le composé **44** qui peut cycliser en présence d'azoture de diphenylphosphoryle pour donner la purine **45**. L'alkylation de l'azote de l'urée par l'iodure de méthyle conduit au XBD-173 qui peut être utilisé pour les tests *in vitro*.

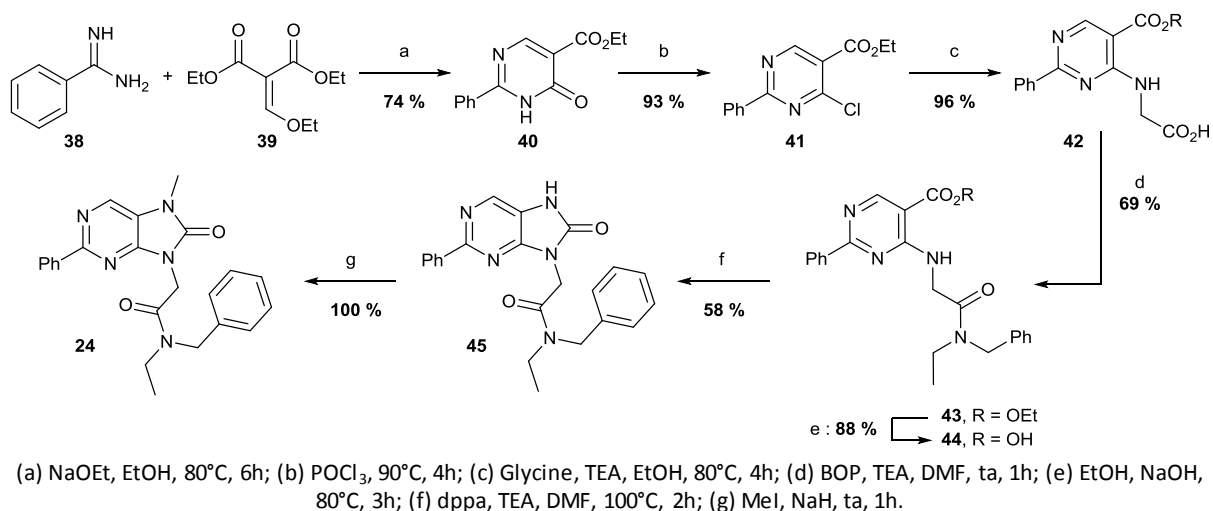
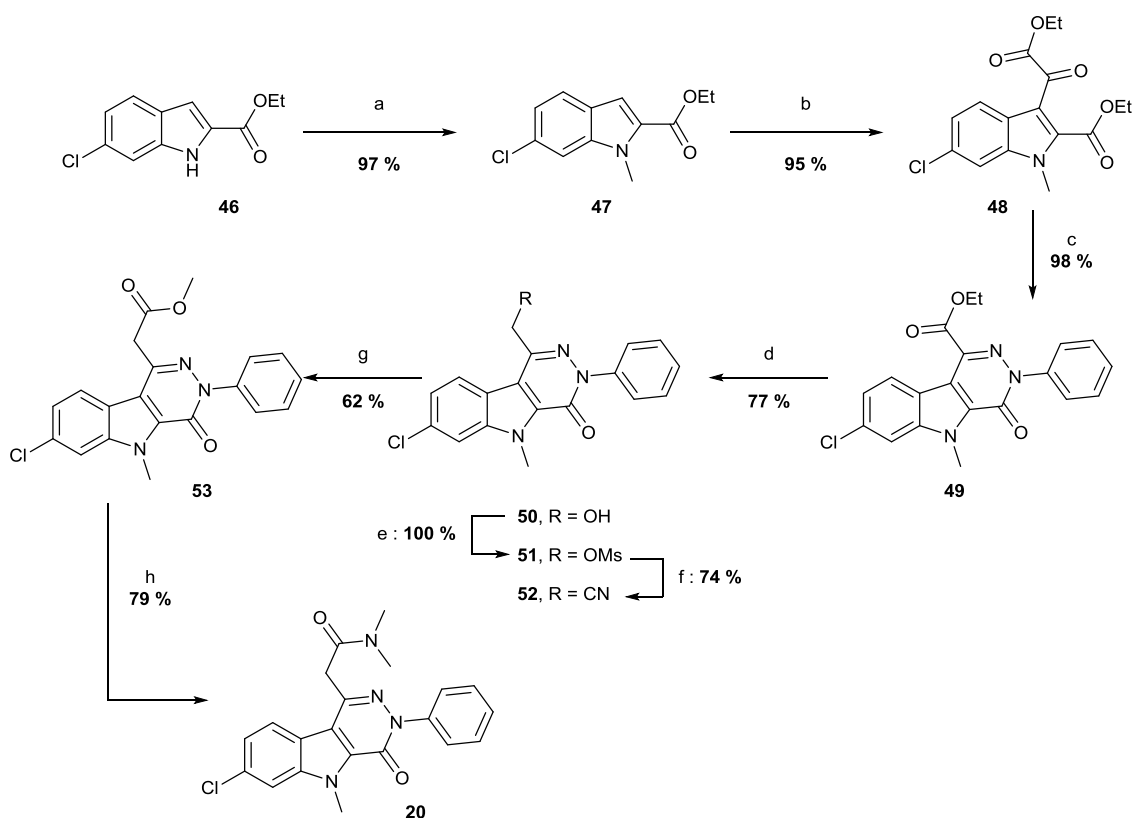


Figure 30 : Synthèse du XBD-173

2.4.3. Synthèse du SSR-180,575


 Figure 31 : Synthèse du SSR-180,575 d'après le brevet de SANOFI¹⁵⁹

La synthèse a été adaptée à partir du brevet de SANOFI¹⁵⁹ (WO9906406) et débute par la méthylation de l'atome d'azote du 6-chloroindole-2-carboxylate d'éthyle **46**. Le composé **47** formé peut ensuite réagir avec le chlorure d'oxalyle en présence d'un acide de Lewis (TiCl₄) pour donner le cétoester **48**. La formation du squelette tricyclique **49** est ensuite obtenue par condensation avec la phénylhydrazine dans l'acide acétique à chaud. Une séquence réactionnelle d'élongation de chaîne

carbonée est ensuite effectuée en commençant par la réduction de l'ester **49** en alcool **50** à l'aide de borohydrure de sodium, puis méthylation de l'alcool formé, suivie par une substitution nucléophile par le cyanate de sodium pour conduire au dérivé acétonitrile **52**. L'hydrolyse du groupement nitrile dans des conditions acides conduit à l'ester méthylique **53**. L'ester est échangé par la diméthylamine en présence de triméthylaluminium pour conduire au SSR-180,575 désiré **20**. La synthèse décrite par SANOFI a été adaptée à l'utilisation de plus petites quantités en laboratoire et nous avons remplacé la séquence d'allongement originale qui consistait à oxyder l'alcool **50** en aldéhyde avec du dioxyde de manganèse pour ensuite le substituer par un nitrile en utilisant le 1-[(isocyanométhyl)sulfonyl]-4-méthylbenzène en présence de diméthyléthylate de potassium et de méthanol. La suite de la synthèse s'effectue ensuite de la même manière que décrite précédemment.

Grâce à cette synthèse, nous avons pu utiliser le SSR-180,575 comme composé de référence dans tous les tests décrits ci-après.

2.4.4. Mesure de la production de prégnénone

Bien que le rôle du TSPO dans la biosynthèse des hormones stéroïdes soit toujours soumis à débat,⁶² les ligands du TSPO ont montré un effet stimulant sur la biosynthèse des stéroïdes en facilitant le passage du cholestérol dans la mitochondrie pour y être transformé en prégnénone, et cela dans différentes lignées cellulaires.^{100,103,104,115,160-163}

L'équipe de Selleri *et al.* a développé un test *in vitro* permettant de quantifier la production de prégnénone induite par des ligands de TSPO sur des cellules gliales C6-2B issues de gliomes de rat.^{100,115} A la vue de la fonction et de la localisation du TSPO, nous souhaitions au départ réaliser les tests directement sur des mitochondries isolées mais le nombre important de molécules à tester aurait nécessité une trop grande quantité de matériel biologique. Nous nous sommes donc orientés vers le test cellulaire décrit par Selleri *et al.* Ce test a été mis en place avec le Dr. Christian Klein au sein du laboratoire de « Biopathologie de la myéline, neuroprotection et stratégies thérapeutiques » (U1119, INSERM/Université de Strasbourg) dirigé par le Pr. Guy Mensah.

Bien que testant des composés présentant des affinités largement submicromolaires, Selleri *et al.* ont testé tous leurs composés à une dose unique de 40 μM , soit à peu près 100 fois leur IC50. Dans un souci d'homogénéité et de comparaison avec les données de la littérature, nous avons utilisé la même concentration pour tester nos ligands.

Les cellules gliales C6-2B sont issues de gliomes de rat et sont cultivées dans du milieu DMEM complété avec 10% de SVF, 2mM de L-glutamine, 100 unités/mL de pénicilline et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine. La culture est maintenue en condition d'atmosphère humide 5%/95% de CO_2/O_2 . Les cellules sont déposées dans une plaque 96 puits avec environ 10 000 cellules par puit pour un volume final de 100 μL . Après 1 nuit pour arriver à confluence, les cellules sont lavées 3 fois avec un milieu salin (140 nM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 10 mM glucose, 10 mM HEPES/NaOH et pH 7.4) complété par 0.1% de BSA.

Il est nécessaire d'utiliser des inhibiteurs des enzymes 17 α -hydroxylase (CYP17) et 3 β -hydroxysteroloïde déshydrogénase (3 β -HSD) afin de bloquer la métabolisation de la prégnénolone en 17 α -hydroxyprégnénolone et progestérone, respectivement (Figure 32). L'équipe de Selleri a utilisé du trilostane et du SU 10603, mais ce dernier n'est pas disponible commercialement. Par conséquent, le laboratoire de Guy Mensah à Strasbourg, spécialisé dans les stéroïdes, a proposé de le remplacer par du kétoconazole pour la réalisation des premiers tests de production de prégnénolone sur les cellules C6.

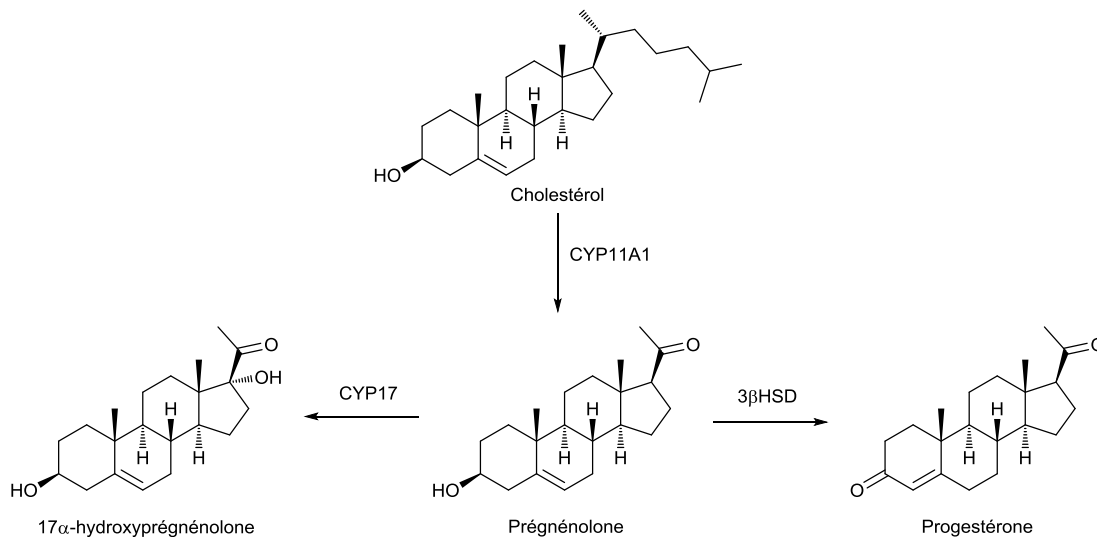
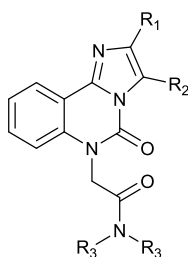


Figure 32 : Métabolisme de la prégnénolone

Le milieu salin BSA sert également de milieu de test dans lequel est solubilisé à 40 μ M le composé à tester ainsi que 25 μ M de trilostane et 25 μ M de kétoconazole. La concentration finale en DMSO est de 1 % V/V. Après application d'un volume de 100 μ L de composé à tester à 40 μ M (triplicats), la plaque est incubée à 37°C pendant 2H. Après cette période d'incubation, 50 μ L du surnageant de chaque puits sont transférés sur une plaque ELISA pour doser la prégnénolone (les principes de l'ELISA sont présentés à l'Annexe 2). Une courbe étalon est établie dans certains puits et on peut doser la quantité de prégnénolone présente dans chaque puits. Les résultats sont alors comparés à ceux des cellules contrôles et sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

Dans le tableau 5 sont présentés les résultats obtenus avec les dérivés d'imidazo[1,2-c]quinazolinones sur le test de production de prégnénolone sur les cellules C6.



Entrée	Comp.	Nom	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ (nM) [³ H]PK-11195 ^a	IC ₅₀ (nM) [³ H]Ro5-4864 ^a	%Prégnénolone ± SEM Cellules C6
1	4	PK-11195	-	-	-	-	-	0.66 ¹⁰	+27 ± 3 (+50 litt.) ¹¹⁵
2	3	Ro5-4864	-	-	-	-	-	-	+15 ± 2 (+40 litt.) ¹¹⁵
3	24	XBD-173	-	-	-	-	3 ± 0.2 ¹⁶⁴	-	+65 ± 6 (+33% litt. à 10µM) ¹⁶⁵
4	20	SSR-180,575	-	-	-	-	3.5 ¹¹¹	2.5 ± 0.6 ¹¹¹	+70 ± 14
5	25a	NCS1008	Ph-	H	Et	Et	400	80	+75 ± 30
6	25b	NCS1026	Ph-	H	Pr	Pr	11	12	+38 ± 7
7	25c	NCS1014	4-MeO-Ph-	H	Et	Et	140	120	+3 ± 23
8	25d	NCS1020	3,4-(MeO) ₂ -Ph-	H	Et	Et	150	500	+43 ± 25
9	25e	NCS1028	2-Cl-Ph-	H	Et	Et	280	34	+11 ± 11
10	25f	NCS1016	3-Cl-Ph-	H	Et	Et	58	50	+70 ± 21
11	25g	NCS1012	4-Cl-Ph-	H	Et	Et	1500	>10 000	+ 17 ± 1
12	25h	NCS1018	2-furanyl-	H	Et	Et	260	580	+73 ± 11
13	25i	NCS1019	3-thiophenyl-	H	Et	Et	200	130	+2 ± 3
14	25j	NCS1033	tBu-	H	Et	Et	130	70	+78 ± 15
15	25k	NCS1042	tBu-	H	Pr	Pr	39	18	+41 ± 9
16	25l	NCS1031	-CO-Ph	H	Et	Et	220	200	+27 ± 7
17	25m	NCS1017	Ph	Me	Et	Et	29	9	+96 ± 6
18	25n	NCS1039	Ph	H	Me	Ph	2	1	insoluble

Tableau 5 : Effet des dérivés d'imidazo[1,2-c]quinazolinones sur la stéroïdogénèse des cellules C6

Les deux ligands de référence PK-11195 et Ro5-4864 induisent une augmentation respective de 27 % et de 15 % la production de prégnénolone chez les cellules C6 à 40 µM. Ces valeurs sont légèrement inférieures à la littérature mais ont été reproduites plusieurs fois. De manière intéressante, les deux candidats cliniques XBD-173 et SSR-180,575 induisent fortement la production de prégnénolone, de 65 % et 70 % respectivement. Ce dernier résultat constitue également une certaine validation du test, car le XBD-173 a été développé en clinique comme anxiolytique pour sa capacité à augmenter la stéroïdogénèse.¹²¹

Comme attendu d'après la littérature, les affinités des imidazo[1,2-c]quinazolinones testées ne corrélaient pas avec leur capacité à induire la production de prégnénolone. Néanmoins, cinq composés (**25a**, **25f**, **25h**, **25j**, et **25m**) présentent un niveau d'activité similaire au XBD-173 et au SSR 180,575.

Les dérivés dipropylamides ont une meilleure affinité que les diéthylamides mais ont une moindre capacité à induire la production de prégnénolone (**25a**, **25b**, **25j**, **25k**, entrées 5, 6, 14 et 15). L'ajout d'une plateforme aromatique sur l'amide rend le **25n** insoluble aux concentrations testées (entrée 18). Les groupements méthoxys et diméthoxyphényle en R₁ ne semblent pas les plus favorables (**25c**, **25d**, entrées 7 et 8), au contraire de systèmes plus hydrophobes tels que les groupements phényle, 3-

chlorophényle et *tert*-butyle (**25a**, **25f**, **25j**, entrées 5, 10, et 14). Il est important de noter que le groupement furanyle en R₁, accepteur de liaison H, induit une forte augmentation de prégnénone (**25h**, entrée 12), ce qui n'est pas observé avec le 3-thiophényle (**25i**, entrée 13). Le dérivé **25m** méthylé en R₂ présente un fort effet stimulateur avec une augmentation de 96% de la production de prégnénone, à comparer avec les +75% de l'analogue non méthylé **25a** (entrées 5 et 17).

Avec ces résultats on retrouve bien le manque de corrélation entre l'affinité et l'activité décrite auparavant. De manière similaire aux données de la littérature, les composés présentant les meilleures affinités ne sont pas forcément ceux qui présentent la meilleure activité. Néanmoins, les décorations R₁, R₂ et R₃ du châssis imidazo[1,2-*c*]quinazolinone sont importantes dans la modulation de l'activité de TSPO.

Les cellules C6 sont des cellules gliales qui ont un rôle de soutien et de protection des neurones au niveau central. Afin de visualiser l'effet protecteur des ligands TSPO au niveau des neurones eux-mêmes, nous avons également voulu tester leur effet stéroïdogénique sur des cellules de neuroblastome SH-SY5Y ainsi que sur des neurones primaires HT22.

Au cours de la 3^{ème} année de thèse, l'équipe du Dr. Anne Eckert (Université de Bâle, Suisse) m'a accueilli pour transférer le protocole expérimental de la production de prégnénone sur les cellules SH-SY5Y et HT22 avec l'aide de la doctorante Imane Lejri.

Les cellules SH-SY5Y sont des cellules de neuroblastome cultivées en milieu DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau, 5% de sérum de cheval, 2 mM de Glutamax et 1% de pénicilline et streptomycine à 37°C et 7.5% de CO₂. Les cellules HT22 sont des neurones primaires d'hippocampe, habituellement utilisées pour tester la toxicité induite par le glutamate dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer.¹⁶⁶ Cette lignée cellulaire est particulièrement intéressante, car elle nous permettra d'observer les effets des ligands du TSPO sur une lignée non cancéreuse issue de l'hippocampe, zone directement concernée par les maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer. Elles sont cultivées dans un milieu DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau, 2 mM de Glutamax et 1% de pénicilline et streptomycine.

En absence de cellules, le test Elisa mesure un bruit de fond de l'ordre de de 0.3 ng/mL de prégnénone. Nous avons alors testé différentes concentrations cellulaires (2 000, 5 000, 10 000 et 12 000 cellules par puit) et nous n'avons pas observé de production significative de prégnénone, et ceci quelle que soit la quantité de cellule par puit. Nous nous sommes alors demandés si les cellules extrudaient bien la prégnénone et avons testé à la fois le surnageant et le lysat cellulaire mais aucune différence n'a été observée. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène est que ces cellules n'induisent pas de production constitutive de prégnénone, mais sont-elles capables d'induire la production de prégnénone sous l'effet de ligands du TSPO ? Pour valider ce postulat, nous avons testé le XBD-173 et d'autres dérivés à 40 µM et trouvé qu'ils augmentaient la production de prégnénone dans des proportions comparables aux cellules C6 mais nous avons eu de grosses difficultés à obtenir des résultats reproductibles.

Nous avons alors étudié tous les paramètres du test afin d'expliquer, puis corriger ces problèmes de reproductibilité. Nous avons commencé par étudier le comportement des ligands TSPO dans le milieu de culture. En effet, nous utilisons une dose élevée de 40 μM , et ces molécules ne sont pas très solubles, comme nous le verrons dans la Partie B -2.5. Nous avons donc observé au microscope les puits contenant une concentration de 40 μM en ligand TSPO et avons observé des problèmes de solubilité, visibles sous la forme d'un milieu hétérogène et la présence d'amas. La présence de ces amas pose des problèmes quant à la fiabilité des doses testées. Nous avons également réalisé des tests de survie cellulaire sur SH-SY5Y et avons observé une certaine toxicité induite par les ligands TSPO à une concentration de 40 μM . L'utilisation d'une concentration de 1 μM est envisagée pour la suite des expériences puisqu'aucune mort cellulaire n'est observée à cette dilution (Figure 33).

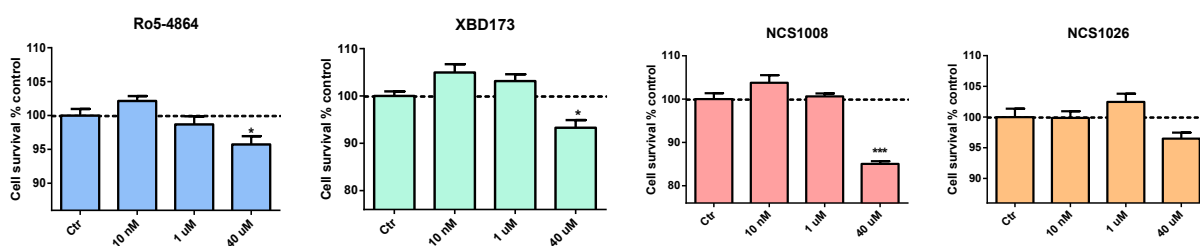


Figure 33 : Tests MTT sur les cellules SH-SY5Y

En étudiant plus en détail le protocole opératoire, et en particulier le rôle des inhibiteurs permettant de bloquer la métabolisation de la prégnénolone, je me suis rendu compte que le kétoconazole, utilisé comme substitut du SU10603, est un inhibiteur non-sélectif des cytochromes P450 et inhibe également le CYP11A1 (ou cytochrome P450_{scc}) qui, lui, transforme le cholestérol en prégnénolone. Le kétoconazole pourrait avoir joué un rôle important dans les problèmes de reproductibilité de nos expériences, en bloquant tout simplement la formation de la prégnénolone, quel que soit l'état d'activation du TSPO et rendant ainsi difficile l'évaluation de la production de prégnénolone. L'inhibiteur utilisé par Selleri *et al.* n'étant pas disponible commercialement, j'ai proposé de le remplacer par l'abitératone qui inhibe sélectivement la 17 α -hydroxylase sans affecter le CYP11A1.

Tous ces essais ont été réalisés durant la dernière année de thèse et les problèmes identifiés sont actuellement en cours d'optimisation par Imane Lejri dans le laboratoire d'Anne Eckert. Il sera également nécessaire de revalider les résultats obtenus sur les cellules C6 en tenant compte des informations rassemblées avec les autres types cellulaires. Le coût important des plaques Elisa (500 €/96 puits) a constitué une difficulté non négligeable dans la mise au point de ce test.

2.4.5. Effets des ligands de TSPO sur l'activité mitochondriale en conditions normales ou pathologiques (modèle Alzheimer)

2.4.5.1. Généralités sur la mitochondrie¹⁶⁷

La mitochondrie est un organite cellulaire présent chez les cellules eucaryotes. Elle est constituée de deux membranes lipidiques qui diffèrent par leurs composition et fonctions. La membrane externe est constituée d'environ la moitié de lipides et la moitié de protéines et contient des porines, ce qui la rend perméable aux composés ayant un poids moléculaire inférieur à 10 kDa. La membrane interne,

beaucoup moins perméable, est composée d'environ 20% de lipides et 80% de protéines. La mitochondrie est le lieu du catabolisme des glucides, des lipides et des acides-aminés pour produire de l'énergie sous forme d'ATP grâce à la respiration cellulaire. C'est également le lieu de synthèse des coenzymes d'oxydoréduction NADH et FADH grâce à la chaîne de transport d'électrons présente dans la membrane interne. Au niveau cellulaire, les mitochondries sont impliquées dans plusieurs fonctions primordiales comme la signalisation intracellulaire, la régulation des potentiels membranaires, l'apoptose, le métabolisme cellulaire, la synthèse des stéroïdes ou encore la synthèse de l'hème nécessaire au transport de l'oxygène dans les globules rouges. Il s'agit d'un organite essentiel dans la régulation des fonctions cellulaires, dont l'altération peut engendrer des effets physiologiques importants.

2.4.5.2. Impact de la maladie d'Alzheimer sur la respiration mitochondriale

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative dont la survenue est généralement due à une hyperphosphorylation de la protéine Tau et une accumulation extracellulaire de plaques amyloïdes composées de peptides β -amyloïdes ($A\beta$). Ce peptide $A\beta$ est issu du clivage de l'Amyloid Precursor Protein (APP) par la gamma secrétase qui se trouve dans la membrane plasmique des cellules. L'agrégation des peptides $A\beta$ entraîne une surproduction de peroxyde d'hydrogène qui contribue au stress oxydant responsable de la mort neuronale.¹⁶⁸ Pendant longtemps, la toxicité de l' $A\beta$ a été attribuée à la formation des plaques amyloïdes non solubles, mais plusieurs études ont depuis montré l'importance de la toxicité de l' $A\beta$ sous forme d'oligomères solubles, notamment pour la surproduction de peroxyde d'hydrogène.¹⁶⁸ Contrairement aux plaques amyloïdes strictement extracellulaires, ces oligomères solubles ont aussi été détectés au niveau intracellulaire et intramitochondrial dans des tissus cérébraux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et pourraient être liés à des malformations des mitochondries.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Ces données indiquent que le dysfonctionnement mitochondrial pourraient jouer un rôle important dans la pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer.¹⁷²⁻¹⁷⁴

Le « Neurobiology Laboratory For Brain Aging and Mental Health », dirigé par le Dr. Anne Eckert à Bale, est spécialisée sur la maladie d'Alzheimer et plus spécifiquement sur le rôle de la mitochondrie dans le métabolisme énergétique et les mécanismes oxydants liés aux maladies neurodégénératives. Ils ont mis au point un modèle cellulaire de la maladie d'Alzheimer en transfectant des cellules SH-SY5Y de neuroblastome par un plasmide exprimant l'APP.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Cette expression de l'APP permet d'observer l'effet d'une exposition des cellules aux peptides $A\beta$ intracellulaires, et se traduit particulièrement par des dysfonctionnements au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie :

- Diminution de la production d'ATP
- Diminution générale de la consommation en oxygène par ces cultures cellulaires
- Augmentation de la sécrétion de ROS

Pour résumer, les cellules exprimant de l'APP présentent un déficit de production énergétique et sont beaucoup plus sensibles au stress oxydant, impliquant ainsi la diminution des fonctions mitochondriales dans la dégénération neuronale, liées à la toxicité du peptide $A\beta$.

La figure 34 est une représentation schématique de la chaîne de transport d'électrons permettant la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP. Une accumulation de peptide A β et Tau inhibe les complexes I et IV et provoque une rupture de la chaîne respiratoire qui résulte par l'augmentation de la sécrétion des ROS et une diminution de la production d'ATP. Une trop grande sécrétion de ROS peut endommager la mitochondrie et la cellule et peut conduire à l'apoptose.

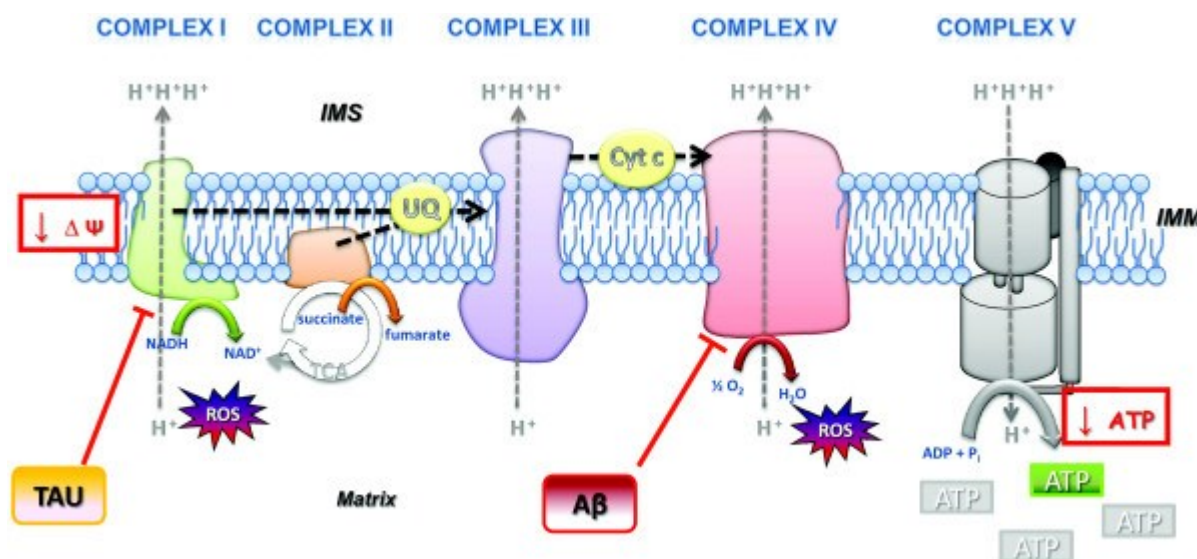


Figure 34 : Effets de la maladie d'Alzheimer au niveau mitochondrial.

Afin de continuer à étudier les différences entre l'affinité de certains composés et leurs activités, nous avons décidé de tester sur ce modèle les composés **25a** et **25b** ainsi que les références de la littérature SSR-180,575, XBD-173 et Ro5-4864. Ces deux composés **25a** et **25b** sont de très bons inducteurs de la production de prégnénolone mais présentent un grand écart d'IC₅₀.

2.4.5.3. Effets des ligands TSPO sur la respiration mitochondriale

L'allopregnanolone est un neurostéroïde dont l'efficacité dans la neuroprotection est reconnue dans la littérature.^{47,52,178} L'équipe d'Anne Eckert a récemment montré l'effet stimulateur des neurostéroïdes sur la production d'ATP par les cellules SH-SY5Y.¹⁷⁹ La sécrétion d'allopregnanolone ainsi que celle d'autres neurostéroïdes étant stimulée par les ligands du TSPO,¹⁴³ nous avons émis l'hypothèse que les ligands TSPO devraient augmenter la production d'ATP. Nous avons ainsi sélectionné cinq composés pour valider cet hypothèse, en incluant trois substances de référence (Ro5-4864, XBD-173, et SSR-180,575), ainsi que deux imidazo[1,2-c]quinazolinones **25a** (NCS1008) et **25b** (NCS1026). Leur capacité à induire la production d'ATP dans des cellules de neuroblastome SH-SY5Y a été comparée à celle de l'allopregnanolone. Lors de ce premier passage, les composés ont été testés à 3 concentrations différentes : 10, 250 et 500 nM et l'allopregnanolone à 250, 500 et 750 nM.

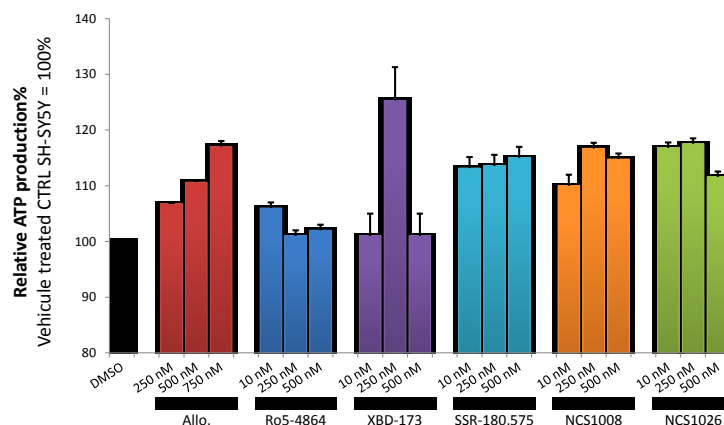


Figure 35 : ATP production chez les cellules SH-SY5Y

On peut voir dans la figure 35 que l'allopregnanolone induit une augmentation de la production d'ATP de 7 à 18% de manière dose-dépendante chez les cellules SH-SY5Y. En accord avec les résultats de production de prégénolone sur des cellules C6 montrant le peu d'effet fonctionnel du Ro5-4864, ce dernier n'induit que faiblement (1 à 5%) la production d'ATP aux concentrations testées. Le XBD-173 augmente la production d'ATP de plus de 20% à 250 nM tandis qu'il n'a aucun effet à 10 ni à 500 nM, cette perte d'effet méritera d'être confirmée dans une future expérience. Le SSR-180,575 provoque une augmentation d'environ 12 à 15 % de la production d'ATP mais d'une manière non dose-dépendante. Les imidazo[1,2-c]quinazolinones NCS1008 et NCS1026 induisent une augmentation de 10 à 17% de la production d'ATP avec un maximum d'efficacité à 250 nM.

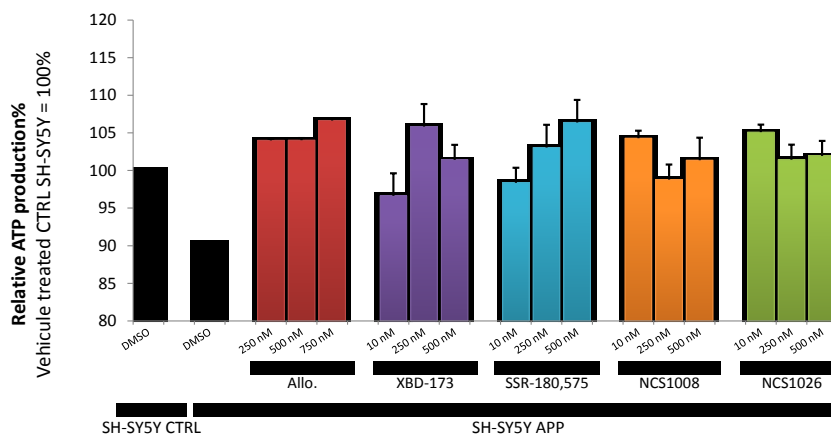


Figure 36 : Effet des ligands du TSPO sur la production d'ATP chez les cellules SH-SY5Y transfectées à l'APP

On peut voir dans la figure 36 que la production basale d'ATP est diminuée d'environ 10% chez les cellules SH-SY5Y transfectées à l'APP par rapport aux cellules SH-SY5Y non transfectées. L'allopregnanolone induit un retour à une production normale d'ATP chez les cellules transfectées à l'APP. Les ligands de référence XBD-173 et SSR-180,575 provoquent aussi un retour à une production « normale » d'ATP, mais on peut noter que les ligands NCS1008 et NCS1026 induisent un retour à la production normale d'ATP avec une concentration faible de 10 nM.

L'effet similaire sur la production d'ATP observé avec l'allopregnanolone et les différents ligands de TSPO va dans le sens d'un mode d'action indirect impliquant l'activité neurostéroïdogenique des

ligands du TSPO. Cela pourrait expliquer l'absence d'effet-dose des ligands de TSPO sur ce modèle. Quelques questions légitimes se posent alors : Quel est le rôle d'une amélioration de la production d'ATP sur les cellules, en quoi cela participe-t-il à un effet protecteur ? Est-ce « le » mécanisme ou l'un des mécanismes conduisant à l'effet neuroprotecteur des ligands du TSPO ? A quel niveau interviendraient les neurostéroïdes sur la chaîne respiratoire pour induire une augmentation de son activité ? Il est clair que les détails de cet effet protecteur ne sont pas encore tous élucidés, mais cette information amène à regarder vers la mitochondrie dans son ensemble et pas seulement sur la première étape de la biosynthèse des stéroïdes.

2.4.5.4. Effets sur la réponse au stress oxydant

L'agrégation du peptide A β lors de la maladie d'Alzheimer induit la production de peroxyde d'hydrogène qui va contribuer au stress oxydatif en milieu extracellulaire. Ce stress oxydant provoque une augmentation de la production des ROS par les mitochondries des neurones et cellules gliales environnantes.^{168,180} Les ROS s'attaquent à l'ADN par oxydation de la guanosine, aux protéines par carbonylation et aux liaisons insaturées des lipides pour former des peroxydes déstabilisant les membranes. La catalase et la superoxyde dismutase sont des enzymes mitochondriales qui ont pour rôle de neutraliser les ROS formés naturellement lors de la respiration mitochondriale. La diminution de l'activité mitochondriale induite par la surexpression d'APP induit une diminution de l'activité de la catalase et de la superoxyde dismutase, entraînant une augmentation de la sensibilité au stress oxydant. La mitochondrie est donc à la fois le premier lieu de génération de ROS et paradoxalement la première cible de ces ROS.^{176,181} Il s'agit presque d'un mécanisme auto amplificateur et l'on ne sait pas si la maladie d'Alzheimer en est la cause ou la conséquence.¹⁸²

Les cellules SH-SY5Y transfectées à l'APP présentent une diminution de leurs fonctions de respiration mitochondriale, caractérisée par la diminution de la production d'ATP de ces cellules. L'équipe d'Anne Eckert a évalué la réponse des cellules SH-SY5Y et SH-SY5Y/APP à un stress oxydant induit par l'addition de peroxyde d'hydrogène, ainsi que l'effet protecteur des ligands du TSPO.

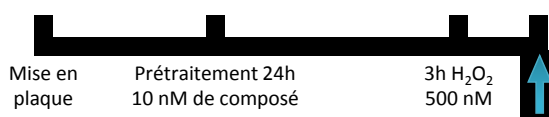


Figure 37 : Déroulement du test sur le stress oxydant

Les cellules subissent un prétraitement durant 24h avec une concentration de 10 nM pour chaque composé testé puis un stress oxydant avec l'addition de 500 μ M d'H₂O₂ pendant 3h. L'effet est ensuite évalué via différents paramètres, tels que la survie cellulaire, la production d'ATP, et la génération d'espèces réactives de l'oxygène.

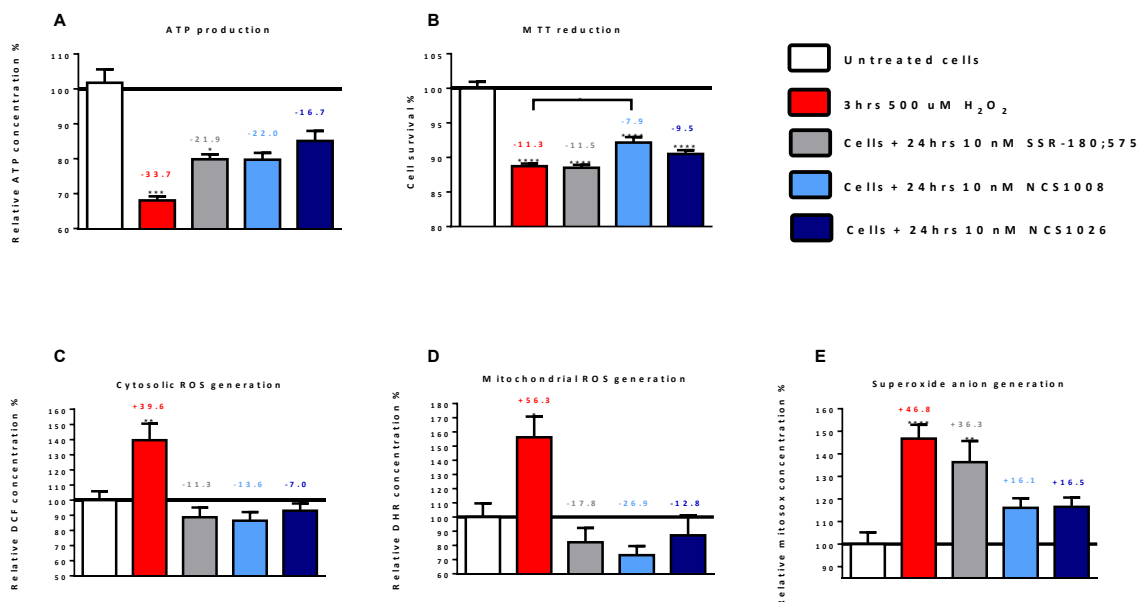


Figure 38 : Effet protecteur face au stress oxydant chez les cellules SH-SY5Y

Chez les cellules SH-SY5Y, on voit que la production d'ATP est diminuée lors d'un stress oxydatif (Figure 38, **A**), l'administration de ligands du TSPO comme le SSR-180,575, le NCS1008 et le NCS1026 à 10 nM permet de limiter significativement cette diminution sans toutefois la rétablir complètement.

Le stress oxydant provoque la diminution de la survie cellulaire après 3h (Figure 38, **B**). Le SSR-180,575 ne diminue pas l'impact du stress oxydant sur cette survie tandis que le NCS 1008 diminue la mort cellulaire de manière significative.

L'utilisation du peroxyde d'hydrogène entraîne une importante augmentation de la production des ROS au niveau du cytosol et de la mitochondrie (Figure 38, **C** et **D**). Les 3 ligands testés à 10 nM provoquent un rétablissement à la normale voir même une diminution des productions cytosoliques et mitochondriales basales de ROS. Les ligands du TSPO montrent ainsi un effet protecteur vis-à-vis de la production de ROS cytosoliques et mitochondriaux lors d'un stress oxydatif.

L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est toxique pour la cellule et sa neutralisation est contrôlée par la superoxyde dismutase. L'activité de cette enzyme semble diminuée lors d'un stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène et cela entraîne une forte augmentation de la production de cet anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. L'administration des ligands NCS1026 et NCS1008 à 10 nM protège les cellules en limitant la surproduction d'anion superoxyde (Figure 38, **E**). Le SSR-180,575 a quant à lui un effet plus faible sur la limitation de cette surproduction.

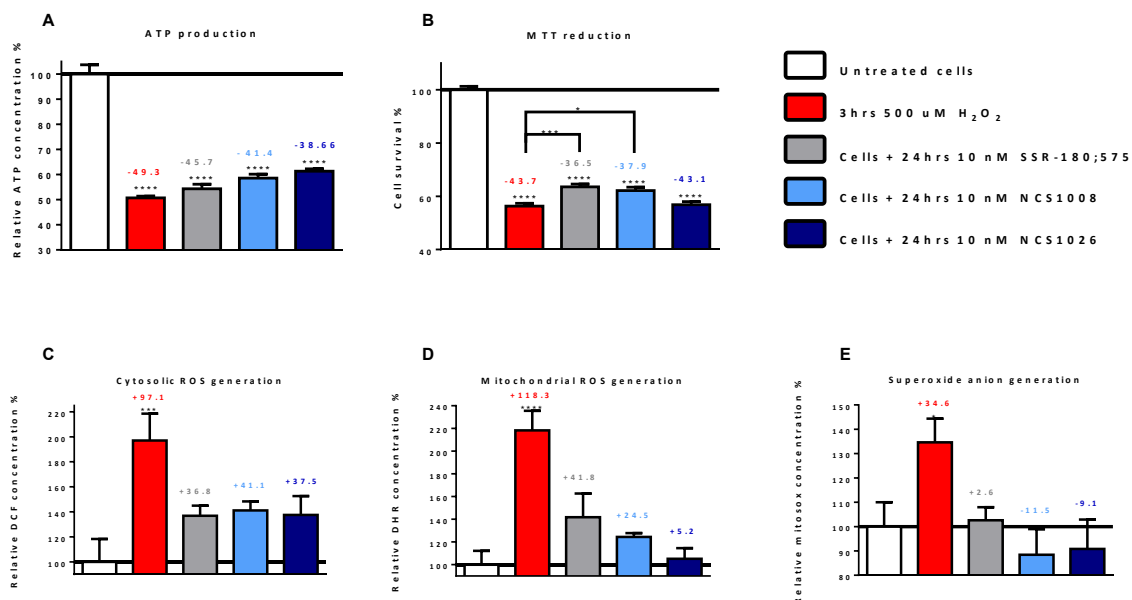


Figure 39 : Effet protecteur face au stress oxydant chez les cellules SH-SY5Y/APP

Les fonctions mitochondriales des cellules SH-SY5Y transfectées à l'APP semblent plus sensibles aux effets du stress oxydatif. La production d'ATP est réduite de presque 50% en milieu oxydant et le prétraitement avec les ligands du TSPO à 10 nM ne permet pas de rétablir une production normale, mais néanmoins améliore jusqu'à 25% la production d'ATP après traitement avec H_2O_2 (Figure 39, A). La survie cellulaire diminue de 43% après un stress oxydant au peroxyde d'hydrogène et le prétraitement par SSR-180,575 et NCS1008 à 10 nM permet de réduire la mort cellulaire d'une manière significative (Figure 39, B).

Le stress oxydant induit une forte sécrétion de ROS chez les cellules SH-SY5Y/APP avec une augmentation de la production de 97% au niveau du cytosol et de 118% au niveau des mitochondries (Figure 39, C et D). Cette production est bien limitée par les 3 ligands du TSPO en prétraitement à 10 nM, sans toutefois réussir à bloquer totalement cette surproduction (Figure 39C). La production de ROS mitochondriaux est mieux limitée par les ligands du TSPO avec un blocage total de leur sécrétion par le NCS1026 à 10 nM (Figure 39, D).

Les cellules SH-SY5Y/APP sont plus sensibles aux effets des ligands à 10 nM pour la limitation de la production de l'anion superoxyde puisque la surproduction de ce dernier est totalement bloquée par les 3 ligands et même diminuée par rapport au milieu non-oxydant avec les NCS1026 et NCS1008 à 10 nM (Figure 39, E).

Ces études nous montrent que les cellules SH-SY5Y qui surexpriment l'APP sont beaucoup plus sensibles au stress oxydant que les cellules SH-SY5Y non transfectées. On y voit aussi l'effet protecteur des ligands du TSPO vis-à-vis de la génération des ROS. Il est à noter que la dose utilisée est faible (10 nM) et largement inférieure à l' IC_{50} du NCS1008 mais son effet est pourtant très marqué. Pour les tests où ces molécules ne sont pas ou peu actives (production d'ATP et survie cellulaire) il serait intéressant de réitérer ces expériences avec des doses plus élevées.

Si une cellule est exposée à l'A β intracellulaire, ses fonctions mitochondriales seront déjà diminuées et l'exposition au stress oxydant va induire une production conséquente de ROS. Ces ROS vont s'attaquer aux mitochondries, augmenter la dégradation de leurs fonctions et les rendre encore plus sensibles au stress oxydatif. On voit bien ici pourquoi ce mécanisme peut être considéré comme auto-amplifié et provoquer d'autant plus de mort cellulaire que les fonctions mitochondriales sont déjà entravées par l'expression de l'APP. La protection des fonctions mitochondriales semble donc être un levier important dans la protection face à la neurodégénération.

Les ligands du TSPO montrent un effet protecteur important vis-à-vis des ROS en limitant fortement leur production et cela à des concentrations très faibles. On ne sait pas encore par quel mécanisme cette protection est effectuée ni quels en sont les acteurs. L'allopregnanolone a montré des effets protecteurs face au stress oxydant chez les cellules SH-SY5Y,¹⁸³ cela peut laisser penser à un mécanisme dû à l'action des neurostéroïdes générés suite à l'activation du TSPO, mais il pourrait également être possible que le TSPO interagisse directement avec les protéines régulatrices de la mitochondrie. En effet, en tant que protéine membranaire, le TSPO est susceptible d'interagir avec les protéines de la chaîne respiratoire.

2.5. Propriétés physico-chimiques

La plupart des composés administrés par voie orale répondent à la règle établie par Lipinski¹⁸⁴ qui définit les propriétés moléculaires nécessaires pour permettre l'absorption et la traversée des membranes biologiques. Cette « règle des cinq » est définie par les propriétés suivantes :

- Coefficient de partage octanol/eau (LogP) < 5
- Masse moléculaire < 500
- Accepteurs de liaisons hydrogène (HBA) <10
- Donneurs de liaisons hydrogène (HBD) <5

Les composés répondant à trois critères sur quatre devraient facilement pénétrer à l'intérieur des membranes biologiques et permettre leur administration *per os*. Pour développer des composés pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique, il est préférable de répondre à certaines conditions de polarité qui ont été décrites par Hitchcock *et al.*¹⁸⁵ d'après une analyse statistique des structures de dérivés actifs au niveau central :

- MW < 450
- $2 < c\text{LogP} < 4$
- Aire de surface polaire (PSA) < 70 Å²
- HBD < 1

Entrée	Composé	MW (g/mol)	cLogP ^a	PSA ^a (Å ²)	HBD	HBA
1	Ro5-4864	319.19	3.74 ± 0.70	32.7	0	3
2	PK-11195	352.86	4.85 ± 0.38	33.2	0	3
3	XBD-173	401.47	3.97 ± 0.62	69.6	0	7
4	SSR-180,575	394.86	1.35 ± 1.05	57.9	0	3
5	NCS1008	374.44	4.71 ± 0.56	58.4	0	6

^aDéterminés par le logiciel ACD/Lab

Tableau 6 : Propriétés physico-chimiques des ligands du TSPO

Dans le tableau 6 sont indiquées les propriétés théoriques pour les références de la littérature Ro5-4864, PK-11195, XBD-173, SSR-180,575 et pour le dérivé NCS1008. Tous ces composés répondent à la règle de Lipinski et s'approchent de celles d'Hitchcock. Néanmoins, on peut voir des disparités au niveau des LogP théoriques calculés qui représentent la solubilité dans l'eau de ces composés. Certains dérivés comme le PK-11195 ou le NCS1008 présentent des cLogP proche de 5 qui peuvent laisser présager une mauvaise solubilité dans l'eau.

La solubilité dans l'eau est un sujet important pour le développement de composés en chimie médicinale. D'après Lipinski, une faible solubilité peut être définie par une solubilité thermodynamique dans l'eau inférieure à 50 µg/mL.^{184,186} Selon la plateforme moléculaire considérée, il n'est pas toujours facile de réussir à améliorer ce paramètre influençant la pharmacocinétique d'un composé. En effet des plateformes comprenant de nombreux groupements aromatiques comme les imidazo[1,2-c]quinazolinones présentent, quels que soit les substituants, une solubilité intrinsèque très limitée à cause de la planéité de ces composés couplés à des cLogP élevés. Il est possible d'améliorer la solubilité d'un composé en lui greffant des groupements solubilisants, mais ces décorations peuvent ne pas être compatibles avec une activité sur la cible visée, cela rend ainsi difficile l'amélioration de la solubilité de hits déjà établis.

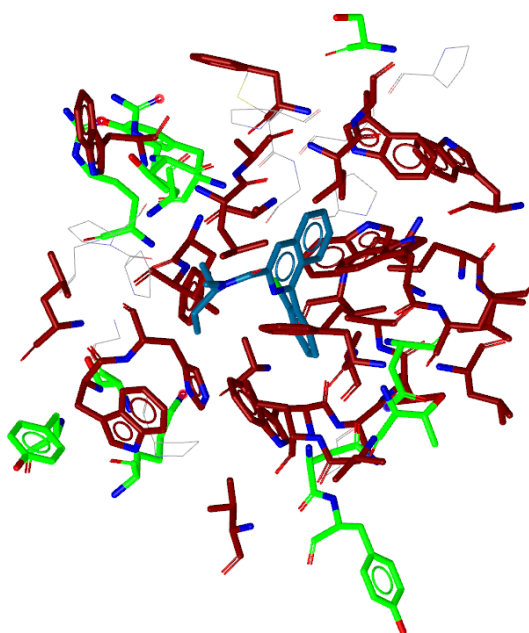


Figure 40 : Poche de fixation du PK-11195 (PDBid : 2mgy). Bleu : PK-11195, Rouge : résidus hydrophobes, Vert : résidus hydrophiles

Nous avons étudié la poche de fixation du PK-11195 en Partie A -2.2. et observé qu'elle ne contient que des groupements hydrophobes (Figure 40). Ces informations correspondent à la forte lipophilie observable chez les ligands de référence du TSPO, on peut ainsi penser qu'il va être difficile d'insérer des groupements solubilisants sur des ligands du TSPO sans perdre en affinité/activité.

Nous avons déterminé la solubilité thermodynamique du NCS1008 comme représentant de la famille des imidazo[1,2-c]quinazolinones. Cette solubilité est établie par dosage HPLC d'une solution saturée agitée pendant 24h à température ambiante. Le NCS1008 a une solubilité de 10 µg/mL et ce résultat est extensible aux autres dérivés de la famille. Cette faible solubilité dans l'eau est due aux propriétés de ces molécules comme le nombre important d'aromatiques, la présence de groupements lipophiles ou encore leur planéité, qui favorise le stacking dans un milieu aqueux.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ Ces propriétés sont essentiellement liées au squelette moléculaire, il est donc nécessaire, pour améliorer la solubilité, de changer de squelette moléculaire.

Pour diminuer la planéité des imidazo[1,2-c]quinazolinones, le Dr. Abarghaz avait « ouvert » le tricycle imidazo[1,2-c]quinazolinones pour obtenir le N-phényl-N-benzoylglycinamide **54**. En rendant la structure plus flexible, on obtient néanmoins une perte importante d'affinité. De manière tout à fait intéressante, le transfert du phényle sur le C α a permis de retrouver une forte affinité avec le dérivé de L-phénylalanine **55** (Figure 41). Néanmoins, malgré une plus grande flexibilité et l'introduction d'un carbone chiral, la solubilité thermodynamique du dérivé **55** reste très faible (25 µg/mL). Aucune étude n'avait été réalisée sur ce dérivé de phénylalanine, et donc, dans le cadre de cette thèse, nous avons réalisé une étude RSA autour de ce dérivé d'acide aminé (voir Partie B -2.6.)

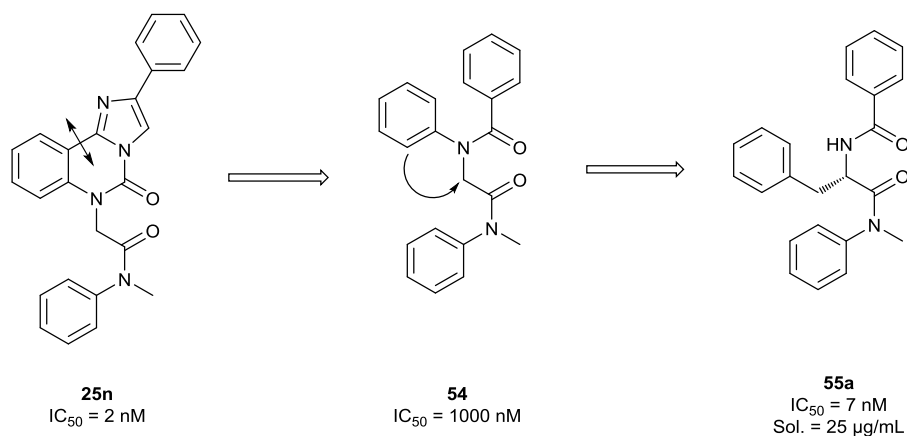


Figure 41 : Coupures effectuées par le Dr. Abarghaz

Lors de ma thèse, j'ai également abordé une autre modification du scaffold imidazo[1,2-c]quinazolinones. L'idée a consisté à « ouvrir » le cycle imidazole pour obtenir le scaffold 3-amino-dihydroquinolin-2-one **26** (Figure 42).

L'intérêt de ce scaffold consiste à maintenir un motif central rigide de type dihydroquinolin-2-one, non planaire grâce à la chiralité en position 3. Le carbonyle de la fonction amide en position 3 jouera le même rôle d'accepteur de liaison H que l'azote du cycle imidazole. Cette modification du scaffold

permet de fortement diminuer la planéité du système et le nombre d'aromatiques. La synthèse et l'étude de ce nouveau scaffold de type peptidomimétique seront abordées en Partie B -2.8.

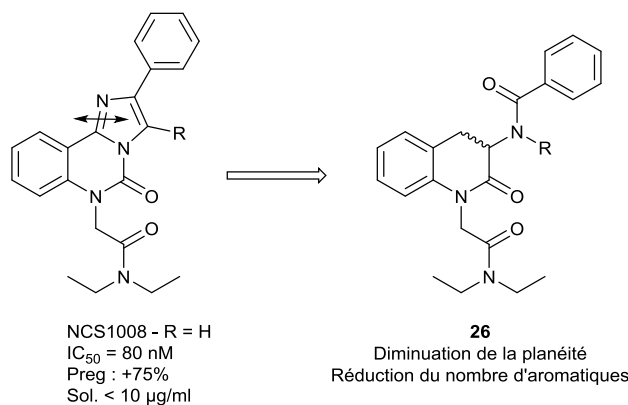


Figure 42 : Coupures pour accéder aux 3-amino-dihydroquinolin-2-one 26

2.6. Dérivés de phénylalanine

2.6.1. Introduction

Découvert en fin de thèse par le Dr. Abarghaz, le dérivé de L-phénylalanine **55a** présente une excellente affinité pour TSPO ($IC_{50} = 7 \text{ nM}$). La forme D avait été testée, et présentait une IC_{50} micromolaire. Néanmoins, ce dérivé **55a** n'a fait l'objet d'aucune étude RSA depuis sa découverte. Bien que plus flexible que le motif imidazo[1,2-c]quinazolinone et présentant un carbone asymétrique, nous avons pu mesurer une très faible solubilité thermodynamique dans l'eau pour ce composé. Ceci est probablement dû à la présence des trois plateformes aromatiques. Le fait de partir d'un motif d'acide aminé permet de facilement modifier les parties N- et C-terminales ainsi que la chaîne latérale (Figure 43). Les composés synthétisés ont ensuite été évalués pour leur capacité à induire la production de prégnénone sur des cellules C6 de gliome. Au début de ce projet, nous n'avions pas accès à un test de binding, mais nous avons récemment établi une collaboration avec le Pr. Mariano Ostuni (Université Paris-Diderot) pour réaliser ces tests de binding, mais également étudier ces molécules dans le cadre d'un projet anti-malaria (voir Partie C). Nous avons également étudié l'effet des modifications structurales sur la solubilité thermodynamique des composés.

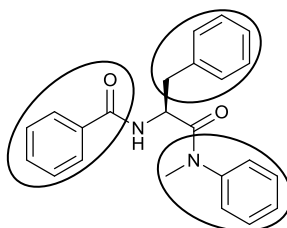
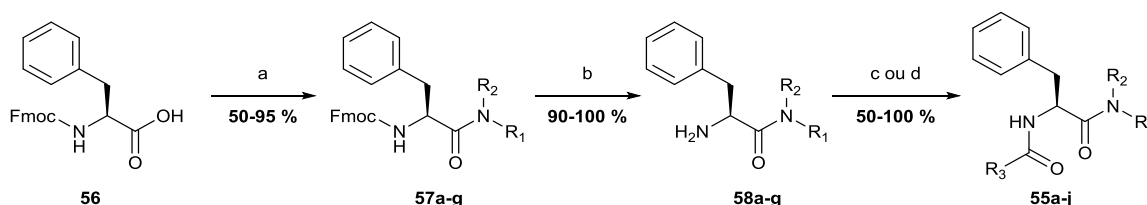


Figure 43 : Explorations sur la base phénylalanine

2.6.2. Synthèse et Etudes des RSA

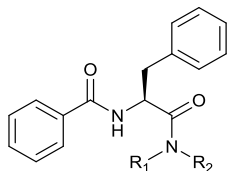
La synthèse des dérivés du composé **55a** s'est faite via des méthodes classiques de synthèse peptidique en phase liquide (Figure 44). Le couplage de la Fmoc-Phe-OH avec une amine secondaire en présence d'HATU permet d'obtenir la phénylalanine amidée, qui est ensuite déprotégée par action du DBU. L'amine libre N-terminale en résultant est ensuite acylée par un anhydride, un chlorure d'acide ou un couplage peptidique selon l'acide carboxylique utilisé. Cette synthèse en 3 étapes permet d'accéder rapidement à de nombreux composés diversement substitués.



(a) HNR_1R_2 , HATU, DIEA, DCM/DMF (3/1), ta, 1h; (b) DBU, DCM, ta, 3h; (c) R_3COCl , DIEA, DCM, ta, 12h; (d) $\text{R}_3\text{CO}_2\text{H}$, HATU, DIEA, DCM/DMF (3/1), ta, 1h.

Figure 44 : Accès aux dérivés de phénylalanine

2.6.2.1. Modification de la partie C-terminale



Entrée	Composé	Nom	R ₁	R ₂	%Prégnénone Cellules C6
1	55a	RF3171	-Me	-Ph	+31
2	55b	RF3179	-Me	-Me	+11
3	55c	RF3177	-Et	-Et	-3
4	55d	RF3174	-Pr	-Pr	+18
5	55e	RF3170	-Me	CH ₂ Ph	+24
6	55f	RF3172	-Me	-CH ₂ CH ₂ Ph	+27
7	55g	RF3173	Et	-CH ₂ Ph	+14

Tableau 7 : Effet des modifications C-terminales sur la production de prégnénone

Dans le tableau 7 sont représentés les résultats des différentes modifications qui ont été effectuées en partie C-terminale. Testée sur la production de prégnénone, la phénylalanine **55a** permet une augmentation de +31%. Ce résultat est sensiblement inférieur à l'imidazo[1,2-c]quinazolinone NCS1008 ou aux composés de référence XBD et SSR, mais cela constitue néanmoins un bon point de départ et une preuve de concept que cette famille chimique est capable d'induire la production de prégnénone. La plateforme aromatique en partie C-terminale semble importante, comme l'atteste la perte d'activité des dérivés **55b**, **55c** et **55d** (Entrées 2, 3 et 4). Ceci constitue une différence importante avec les ligands de référence du TSPO (SSR-180,575, NCS1008, PK-11195) qui présentent une simple fonction N,N-dialkylamide. L'éloignement du cycle aromatique (**55e** et **55f**, entrées 5 et 6) maintient l'induction de prégnénone observée avec le composé **55a** (Entrée 1). Nous avons alors

introduit le motif N-éthyl-N-benzamide par analogie avec le XBD173, mais la présence de l'éthyle semble être néfaste à l'activité (**55g**, entrée 7).

Bien que construit rationnellement à partir de ligands connus du TSPO, la fonction amide C-terminale semble ne pas se positionner de la même manière que la signature « glycinamide » des ligands de référence du TSPO.

Les amides disubstitués peuvent être présents sous la forme de deux conformères *cis* ou *trans*. L'étude RMN 2D du dérivé **55a** a permis de déterminer sa conformation représentée en figure 45. Une forte corrélation NOESY entre un des protons benzylique de la phénylalanine et les protons du méthyle sur l'amide ainsi qu'une faible corrélation entre l'aromatique de la phénylalanine et le méthyle de l'amide ont permis de déterminer la conformation *trans* de l'amide disubstitué, avec le méthyle du même côté que la chaîne latérale de la phénylalanine. Pour confirmer cette observation, aucunes corrélations NOESY entre le phényle de l'amide et les protons benzyliques ou l'aromatique de la phénylalanine n'ont pu être observées, ce qui permet de confirmer la conformation *trans* du dérivé **55a**. Ce résultat semble rationnel à la vue de l'encombrement stérique du phényle sur l'azote de l'amide

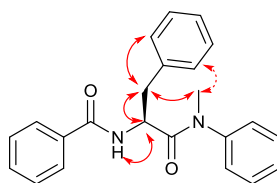


Figure 45 : Corrélations NOESY– détermination de la conformation *trans* du **55a**

Dans le cas des amides **55e**, **55f** et **55g** (entrées 5, 6 et 7), les spectres RMN ^1H dédoublent à température ambiante. Ce dédoublement disparaît lors du chauffage pendant l'acquisition du spectre. Ceci indique la présence de deux conformères lorsque l'aromatique n'est pas directement lié à l'azote. La diminution de l'encombrement stérique induite par le carbone benzylique par rapport au phényle du **55a** induit ainsi deux conformations à température ambiante. Afin de pouvoir déterminer la forme majoritaire, nous avons réalisé des études RMN 2D sur le dérivé **59** présentant un *m*-chlorobenzyle pour favoriser le déblindage et permettre de facilement différencier les protons de l'aromatique de la chaîne latérale avec ceux du benzyle sur l'amide (voir RMN 2D en annexe 3).

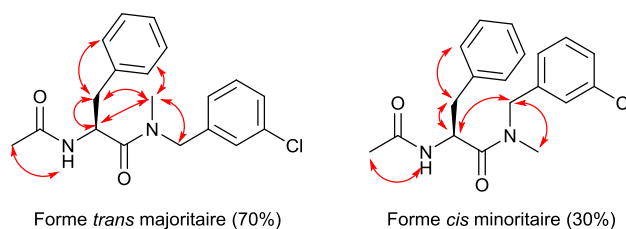


Figure 46 : Corrélations NOESY – détermination de la conformation majoritaire

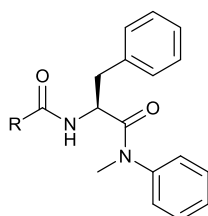
L'analyse 2D a montré, pour la forme *trans* majoritaire, des corrélations NOESY entre le méthyle de l'amide et l'hydrogène α de la phénylalanine. La forme *cis* minoritaire présente une corrélation entre les protons benzyliques et l'hydrogène α de la phénylalanine, confirmant ainsi la conformation.

L'encombrement stérique imposé par le benzyle sur l'amide est moins important que pour le phényle du **55a** et permet la coexistence des formes *cis* et *trans* des dérivés **55e**, **55f** et **55g**.

Nous n'avons néanmoins aucune indication quant à la forme pouvant être la plus active sur le TSPO.

2.6.2.2. Modification partie N-terminale

Des groupements du type acétyl, benzoyle, cinnamoyle ou benzylpipéridine ont été insérés en partie N-terminale (Tableau 8).



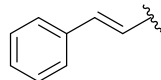
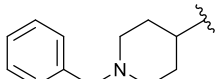
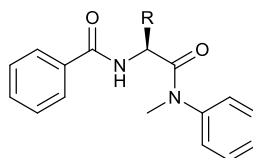
Entrée	Composé	Nom	R	%Prégnénone Cellules C6
1	55h	RF3196	Me	+44
2	55a	RF3171	Ph	+31
3	55i	RF3197		+17
4	55j	RF3201		+11

Tableau 8 : Effet des modifications N-terminales sur la production de prégnénone

On peut observer que la présence d'un benzoyle, ou d'un groupement aromatique en général, sur la fonction N-terminale n'est pas essentielle pour un effet inducteur de la production de prégnénone.

2.6.2.3. Modifications sur la chaîne latérale

Afin de modifier la chaîne latérale, la même voie de synthèse a été utilisée avec d'autres acides aminés commerciaux. Les résultats de ces échanges sont exprimés dans le tableau 9.



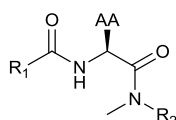
Entrée	Composé	Nom	R	A.A.	%Prégnénone
1	55a	RF3171	CH ₂ -Ph	Phe	+31
2	59b	RF3178	CH ₂ -Ph(4-OH)	Tyr	+7
3	60	RF3199	iBu	Leu	+20
4	61	RF3200	secBu	Ile	+42
5	62	RF3206	Ph	PhGly	+21
6	63	RF3207	CH ₂ -CH ₂ -Ph	HPhe	+11

Tableau 9 : Effet des modifications d'acide aminé sur la production de prégnénone

Le passage de la phénylalanine à l'isoleucine entraîne un gain d'activité intéressant. Le remplacement de la phénylalanine par une tyrosine entraîne une perte d'activité. L'échange avec une leucine n'entraîne pas d'amélioration tandis que les homologues supérieurs et inférieurs de la phénylalanine n'améliorent pas non plus l'induction de production de prégnénolone.

2.6.1. Solubilité

De la même manière que pour évaluer la solubilité du dérivé NCS1008 (voir Partie B -2.5.) nous avons déterminé la solubilité thermodynamique des dérivés de phénylalanine par le dosage HPLC d'une solutions aqueuse saturée après 24h d'agitation à température ambiante (Tableau 10).



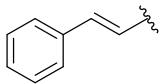
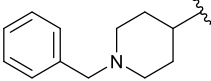
Entrée	Composé	Nom	AA	R ₁	R ₂	Solubilité dans l'eau (µg/mL)
1	55a	RF3171	Phe	Ph	Ph	25
2	55e	RF3170	Phe	Ph	Bz	10
3	55f	RF3172	Phe	Ph	CH ₂ -CH ₂ -Ph	29
4	55b	RF3179	Phe	Ph	Me	728
5	55h	RF3196	Phe	Me	Ph	522
6	55i	RF3197	Phe		Ph	3
7	55j	RF3201	Phe		Ph	5
8	59	RF3178	Tyr	Ph	Ph	4
9	61	RF3200	Ile	Ph	Ph	387

Tableau 10 : Effet des différentes substitutions sur la solubilité

Pour les dérivés de phénylalanine, l'éloignement du phényle en partie C-terminale apporte une flexibilité visible en RMN 2D mais qui n'améliore pas la solubilité dans l'eau (**55a**, **55e**, **55f**, entrées 1, 2 et 3) tandis que sa suppression augmente fortement la solubilité (**55b**, entrée 4). En partie N-terminale, la suppression du phényle entraîne un fort gain de solubilité et son remplacement par des substituants cinnamoyl ou benzylpipéridine n'améliore aucunement la solubilité (**55h**, **55i**, **55j**, entrées 5, 6 et 7). Lorsque la phénylalanine est remplacée par une tyrosine, la présence d'un phénol n'améliore pas la solubilité et le remplacement par une isoleucine améliore grandement cette solubilité (**59**, **61**, entrées 8 et 9).

On peut voir au travers de ces résultats que la simple suppression d'un cycle aromatique sur le scaffold de base entraîne un gain de solubilité d'un facteur 15 à 30 avec un effet plus marqué au niveau des extrémités qu'au niveau de la chaîne latérale de l'acide aminé central.

2.6.2. Conclusion et perspectives

Dans cette étude autour des dérivés de phénylalanine, il est intéressant de noter que la présence d'un cycle aromatique est essentielle en partie C-terminale mais le remplacement des aromatiques est

possible au niveau de la chaîne latérale ou en partie N-terminale pour permettre d'augmenter la solubilité thermodynamique tout en conservant une activité inductrice de la production de prégnénolone.

Le remplacement de la phénylalanine par une isoleucine semble être un bon compromis entre activité et solubilité et la poursuite de cette étude RSA est encore à réaliser dans ce sens.

Il serait également nécessaire de valider ces résultats sur la production de prégnénolone par une étude de binding sur le TSPO. Des démarches dans ce sens ont été entamées par l'équipe du Pr. Ostuni, mais ils ont rencontré des problèmes de mise au point à cause de l'utilisation d'une source de TSPO différente de la CEREP et les résultats ne sont pas encore disponibles.

La possibilité d'utiliser des dérivés d'acides aminés semble une voie nouvelle pour le développement de dérivés actifs sur le TSPO et qui pourrait nous rapprocher des potentiels ligands peptidiques endogènes.

2.7. Séquence DBI, retour aux peptides

Le DBI est un neuropeptide soupçonné d'être le ligand endogène du TSPO de la classe des endozépines (voir Partie A -3.2.) qui a montré des effets sur la biosynthèse des neurostéroïdes et dans les mêmes champs d'application que les ligands TSPO. Il peut être clivé par les endopeptidases pour conduire à deux sous unités actives, le DBI₁₇₋₅₀ ou Triakontatétraneuropeptide (TTN) et le DBI₃₃₋₅₀ ou Octadécaneuropeptide (ODN). Ces deux produits sont préférentiellement retrouvés au niveau des neurones tandis que le DBI est également exprimé au niveau des cellules gliales.¹⁹⁰ L'ODN a plutôt une affinité spécifique pour le récepteur central aux benzodiazépines et le TTN est plus spécifique au TSPO.



Figure 47: Séquence du TTN de rongeur

De par son action sur le BZC, l'ODN a été largement plus étudié que le TTN et des tests de type Ala-scan (remplacement systématique des acides aminés par des alanines) et de D-scan (remplacement des L-acides aminés importants par leur énantiomère D) ont montré que les acides-aminés Thr₄₁ et Leu₄₇ étaient essentiels à l'activité biologique sur le BZC. Malheureusement, aucune étude de ce type n'a été réalisée sur le TTN. La partie la plus hydrophobe de la séquence du TTN contient la séquence Leu₂₆-Phe₂₇-Ile₂₈ qui présente une certaine analogie avec les structures étudiées au paragraphe précédent. Cette séquence est conservée à travers les espèces comme les souris, les rats, les bovins et l'homme.⁶⁶ Nous avons donc émis l'hypothèse d'un rôle de cette séquence de trois acides aminés dans l'activation du TSPO.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons synthétisé une série de di- et tri-peptides contenant ces 3 acides aminés. Ce travail a été effectué en utilisant une synthèse sur support (résine Rink-amide sur polystyrène) en stratégie Fmoc (Figure 48).

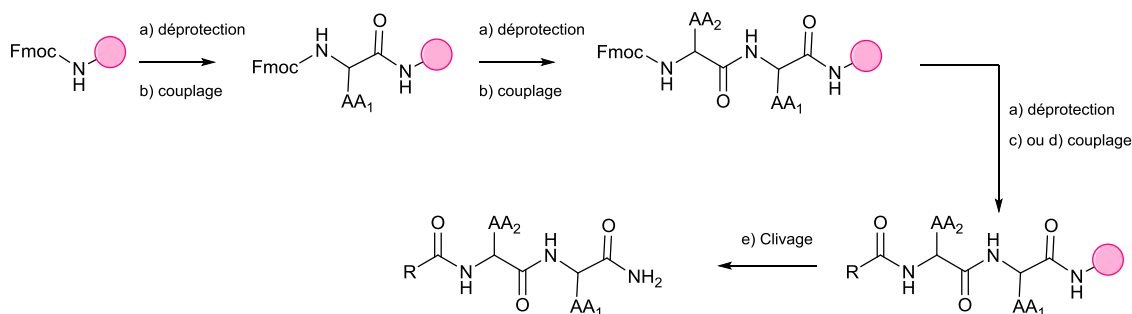


Figure 48 : Stratégie Fmoc pour la synthèse de petits peptides sur phase solide

La synthèse sur support solide consiste en une succession de réactions de déprotection puis de couplage conduisant à l'élongation d'un chaîne peptidique greffée sur une résine (= support). Le peptide désiré est ainsi formé puis clivé en conditions acides dans le cas d'une utilisation de la stratégie Fmoc (voir Annexe 1). Les activités des di- et tri-peptides sont présentées dans le tableau 11.

Entrée	Composé	Nom	Séquence	%Prégnénolone
1	64	RF3205	Ac-Leu-Phe-Ile-NH ₂	+72
2	65	RF3204	Ac-Leu-Phe-NH ₂	+8
3	66	RF3202	Ac-Phe-Ile-NH ₂	+18
4	67	RF3203	Bz-Phe-Ile-NH ₂	+43

Tableau 11 : Effet des petits peptides sur la production de prégnénolone

Le tripeptide Leu-Phe-Ile **64** induit une bonne augmentation de la production de prégnénolone, ce qui peut permettre de valider l'hypothèse émise au paragraphe précédent et la délétion de l'isoleucine entraîne une perte totale d'activité (**65**, entrée 2), cet acide aminé semble donc essentiel pour activer la stéroïdogénèse par le TSPO. Le remplacement de la leucine par un groupement acétyle entraîne une perte d'activité tandis que le groupement benzyle permet de maintenir une induction de la production de prégnénolone (**66**, entrée 3). En outre, dans le cas de l'utilisation d'un dipeptide Phe-Ile, il semble nécessaire d'avoir la présence d'un groupement lipophile ou aromatique en partie N-terminale (entrées 3 et 4). Ces résultats préliminaires renforcent l'hypothèse du rôle important de cette séquence LFI dans l'activation du TSPO par le TTN.

2.7.1. Synthèse de peptides modifiés

Nous avons synthétisé d'autres dérivés du dipeptide Phe-Ile avec différentes décorations en partie N-terminale comme des pyrdininoyle, furanoyle, phénylacétyle et benzoyles substitués par des méthoxys (Figure 49).

Afin de réaliser des études structurales sur le TSPO, nous nous sommes intéressés à la possibilité de tester l'insertion d'une sonde fluorescente en partie N-terminale de ce peptide. La perte d'activité liée à la délétion de l'isoleucine semble indiquer l'importance des interactions possibles avec la partie C-terminale et pourrait limiter l'insertion d'un bras espaceur de type alkyle sur cette position. Afin de

tester la disponibilité de la partie N-terminale, nous avons synthétisé un dérivé présentant une chaîne alkyle à 7 chaînon en partie N-terminale afin de voir si l'effet de la présence de cette chaîne sur la production de prégnérolone.

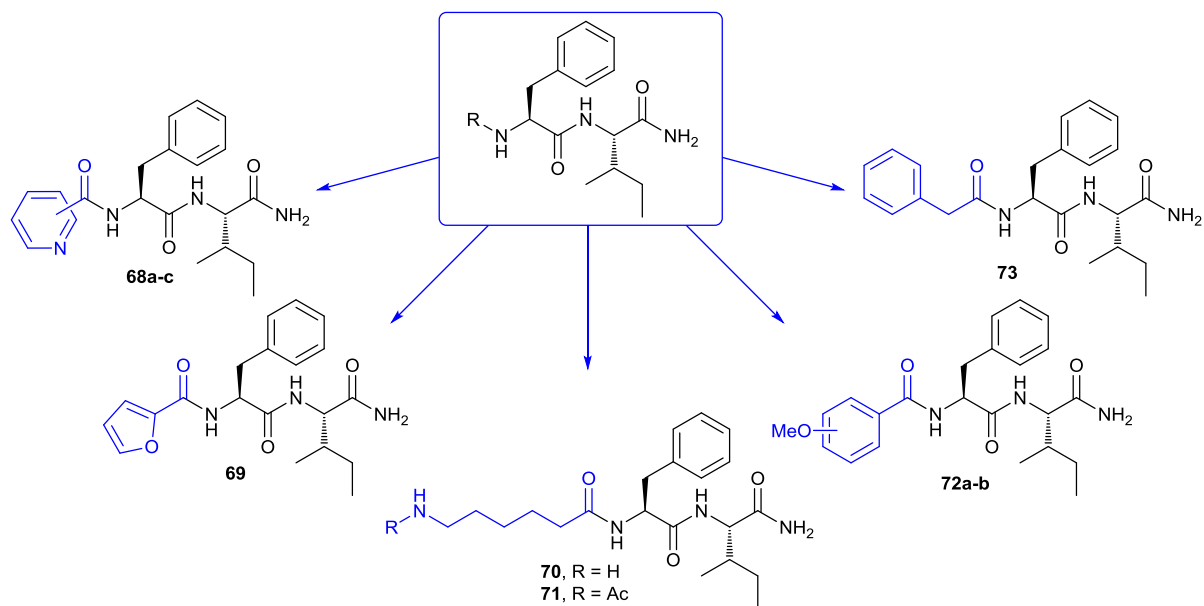


Figure 49 : Fonctionnalisation N-terminale du dipeptide (FI)

Pour valider l'importance des résidus Phe et Ile issus de la séquence du TTN, nous avons aussi modifié la séquence du dipeptide en échangeant séquentiellement ces deux résidus par d'autres acides aminés.

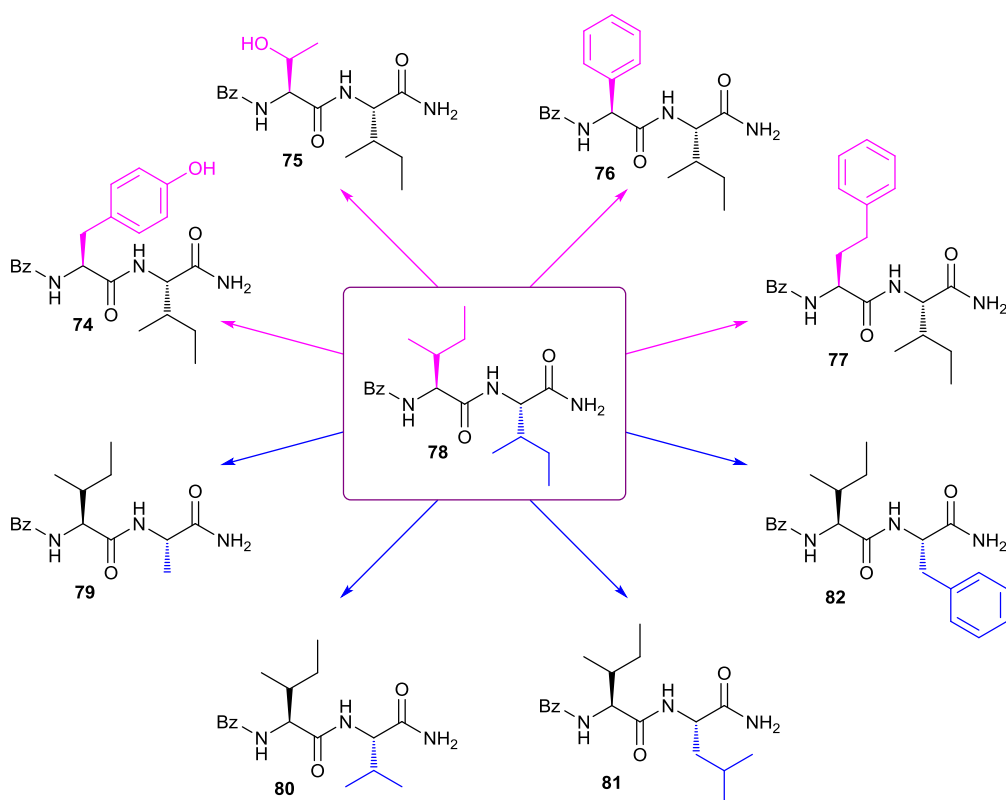


Figure 50 : Changement de séquence du dipeptide

La phénylalanine a été remplacée par une tyrosine, une sérine, la phénylglycine et l'homophénylalanine tandis que l'isoleucine a été remplacée par une alanine, une valine, une leucine ou encore une phénylalanine représentés à la figure 50.

Tous ces composés sont en attente d'être testés en binding et sur leur capacité à induire la production de prégnénone. Des problèmes de solubilité risquent néanmoins d'être rencontrés avec l'utilisation de ces petits peptides hydrophobes. Afin de valider l'hypothèse de fragment actif du TTN, il serait nécessaire de réaliser des études de type Ala-scan ou D-scan sur le TTN et d'en tester les effets sur la production de prégnénone. Il pourrait également être intéressant d'étudier la fixation de ce type de structures peptidiques avec le TSPO afin de mieux comprendre les interactions possibles entre le DBI ou le TTN avec le TSPO.

Dans cette étude autour des dérivés de phénylalanine, il est intéressant de noter que la présence d'un cycle aromatique est essentielle en partie C-terminale mais le remplacement des aromatiques est possible au niveau de la chaîne latérale ou en partie N-terminale pour permettre d'augmenter la solubilité thermodynamique tout en conservant une activité inductrice de la production de prégnénone.

Le remplacement de la phénylalanine par une isoleucine semble être un bon compromis entre activité et solubilité et la poursuite de cette étude RSA est encore à réaliser dans ce sens.

En général, le développement d'un projet de chimie médicinale est amorcé à partir d'un ligand peptidique endogène et le travail du pharmacochimiste intervient pour s'éloigner de cette structure vers des dérivés hétérocycliques permettant de gagner en stabilité et en affinité. Nous avons ici suivi un développement inversé, débutant de ligands hétérocycliques peu solubles mais présentant des affinités nanomolaires pour le TSPO pour aboutir à des dérivés peptidiques évalués sur leurs activités fonctionnelles. Cette démarche originale de retour au peptide n'est pas exclue de limitations qui pourraient être rencontrées dans l'idée d'une administration *per os*. Afin d'anticiper ces problèmes et tenter de gagner en solubilité, nous avons entrepris le développement d'une nouvelle famille de peptidomimétiques ligands du TSPO basés sur une phénylalanine rigidifiée, intermédiaire entre les imidazo[1,2-c]quinazolinones et les dérivés de phénylalanine.

2.8. Dihydroquinolinones

Nous avons vu dans le paragraphe 2.5. que les problèmes de solubilité des imidazo[1,2-c]quinazolinones sont liés à la planéité du squelette moléculaire et le trop grand nombre de plateformes aromatiques sur ces composés. En suivant ces deux règles, nous avons imaginé une nouvelle famille de ligands du TSPO : les 3,4-dihydroquinolin-2-ones qui sont structurellement proches des phénylalanines mais basées sur les requis structuraux correspondants au pharmacophore des imidazo[1,2-c]quinazolinones défini à la figure 51.

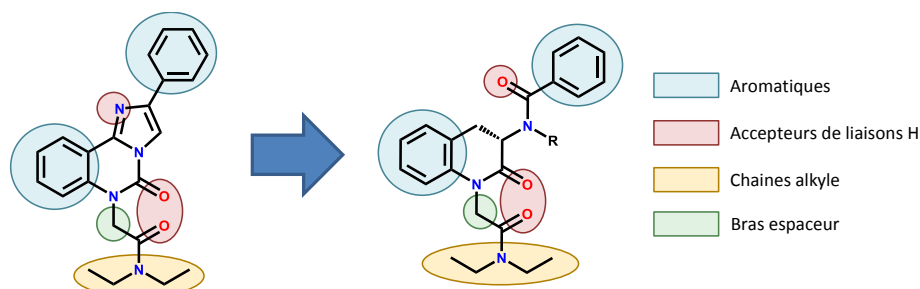


Figure 51 : Analyse du pharmacophore des Imidazo[1,2-c]quinazolinones et développement des 3,4-dihydroquinazolin-2-ones

Afin d'accéder à ces composés chiraux, nous avons imaginé la rétro synthèse décrite en figure 52 qui est basée sur une réaction centrale de cyclisation Pallado-catalysée de la 2-bromophénylalanine en dihydroquinolinone. Nous avons réalisé un travail méthodologique pour la mise au point de cette réaction de Buchwald-Hartwig, décrit à la partie D, au cours duquel nous avons réussi à déterminer des conditions réactionnelles nous permettant de cycliser sélectivement et sans racémisation sur l'azote de la partie N-terminale ou C-terminale de la phénylalanine d'un dipeptide

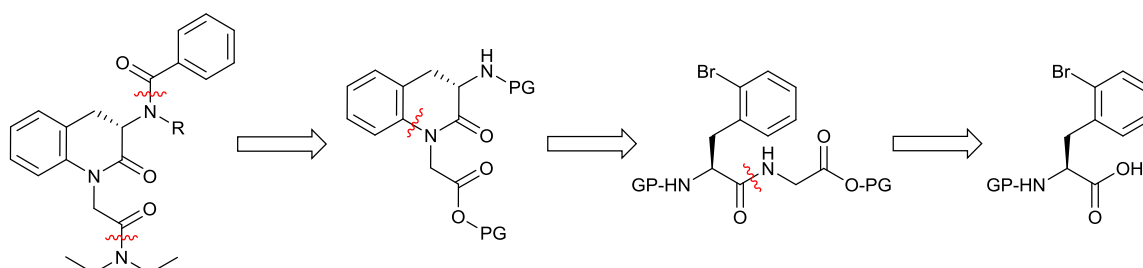


Figure 52 : Stratégie rétrosynthétique

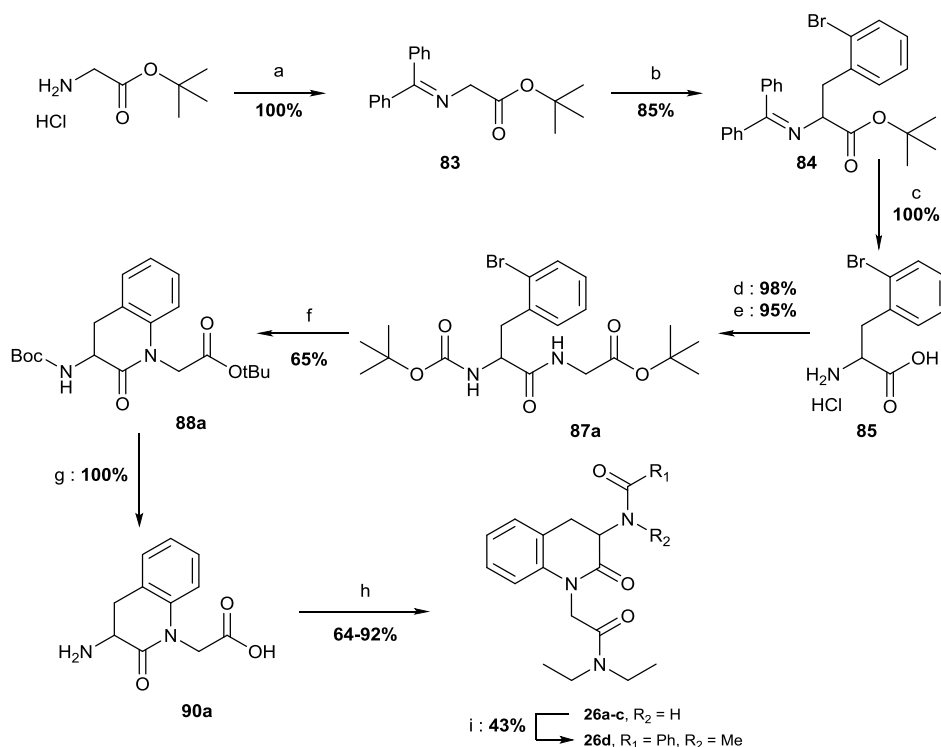
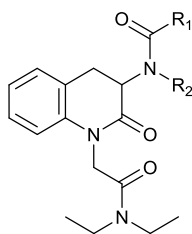


Figure 53 : Schéma d'accès aux dihydroquinolinones fonctionnalisées

Afin d'éviter tout problème d'activité lié à la géométrie des composés, nous avons réalisé la synthèse en version racémique. L'amine de la glycine protégée par un ester de *tert*-butyle est condensée avec la benzophénone imine pour conduire à une glycine doublement protégée **83**. Grâce au fort effet électroattracteur des deux protections, le composé **83** présente un hydrogène α suffisamment acide pour être arraché par la potasse en milieu biphasique et réagir avec le bromure de 2-bromobenzyle pour former la 2-bromophénylalanine racémique **84**.^{191,192} Celle-ci est ensuite déprotégée en milieu acide puis un groupement Boc et une glycine sont greffés en partie N-terminale et C-terminale afin de conduire au dérivé **87a**, précurseur de la cyclisation par une réaction de Buchwald. L'utilisation du Pd₂(dba)₃, XPhos et BTPP dans le dioxane à 65°C nous permet d'obtenir le composé **88a** avec un rendement de 65%. Après déprotection, différentes décorations peuvent être insérées au niveau de l'azote extracyclique, suivi d'un couplage peptidique avec la diéthylamine pour conduire aux dérivés **26a-c**. Nous avons également alkylé l'azote en position 3 par un groupement méthyle afin de mesurer l'effet de l'accepteur de liaisons hydrogène à cette position.

Nous avons évalué ces composés sur leur capacité à induire la production de prégnénolone chez les cellules C6 et leur affinité au niveau de la fraction mitochondriale de glande sous maxillaire de rat, effectué chez le Pr. Ostuni du laboratoire de biologie intégrée du globule rouge (INSERM). Ces résultats sont présentés dans le tableau 12.



Entrée	Composé	R ₁	R ₂	K _i (nM)	%Prégnénolone
1	26a		H	772	-4
2	26b		H	nd	nd
3	26c		H	nd	-3
4	26d		Me	nd	-18

Tableau 12: Effet des dérivés de dihydroquinolinone sur la production de prégnénolone

On voit que les dihydroquinolinones sont des ligands du TSPO présentant une affinité submicromolaire lors du test de binding sur la fraction mitochondriale de glande sous-maxillaire de rat. Ce résultat est à pondérer avec le fait qu'un de nos ligands nanomolaires comme le **55a** (Phe) à une affinité diminuée sur ce modèle de test de liaison ($K_i = 365$ nM) et la même perte d'affinité est retrouvée pour le Ro5-4864 ($K_i = 94.6$ nM) ainsi que le XBD-173 ($K_i = 17.4$ nM). L'effet sur la production de prégnénolone est quant à lui surprenant puisqu'il s'agit de la première observation de ligands bloquant le transport du cholestérol. Il est toutefois nécessaire de reproduire ces résultats lorsque nous aurons terminé de mettre au point le test de production de prégnénolone chez les autres lignées cellulaires.

Entrée	Nom	Solubilité (µg/mL)
1	RF3074	29
2	NCS1026	4.2
3	26a	203
4	XBD-173	3.7

Tableau 13 : Solubilité du châssis dihydroquinolinone

Nous avons par contre pu vérifier nos hypothèses quant à la solubilité de cette famille car, sans ajouter de fonctions solubilisantes, nous avons réussi à augmenter la solubilité d'un facteur 50 par rapport au NCS1026.

3. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre nous avons pu aborder une nouvelle manière de développer des ligands du TSPO basée sur des tests fonctionnels. Cette démarche est justifiée par la récurrence du manque de corrélations entre l'affinité et l'activité de ligands du TSPO. Grâce à l'utilisation de références validées de la littérature (SSR-180,575 et XBD-173), nous avons pu comparer l'effet de nos ligands sur des modèles de stéroïdogénèse, de production énergétique et de neuroprotection. Des mises au point

restent toutefois nécessaires pour valider le transfert de protocole sur d'autres lignées cellulaires. Nous avons également pu aborder l'aspect physico-chimique de dérivés actifs par des mesures de solubilités, des études de digestion enzymatiques restent néanmoins nécessaires pour continuer à étudier cet aspect pratique de la pharmacochimie.

L'avenir thérapeutique des ligands du TSPO reste cependant très prometteur si l'on arrive à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la neuroprotection observée *in vitro*. Les seules références de la littérature testées sur des modèles *in vivo* sont des dérivés qui se sont montrés peu actifs sur les tests *in vitro*, il serait très intéressant de pouvoir réaliser des études *in vivo* sur des modèles de maladies neurodégénératives afin de mieux apprécier les différences qui ont pu être observées *in vitro*.

Partie C - TSP02 et malaria

1. Introduction

1.1. Le paludisme¹⁹³

Le paludisme est une maladie parasitaire endémique causée par plusieurs espèces de protozoaires du genre *Plasmodium*. Il s'agit encore d'un énorme problème de santé publique chez les pays en voie de développement causant plus de 500 000 morts par an et 198 millions de nouvelles infections chaque année.¹⁹⁴ Le paludisme est transmis à l'homme par la pique d'un moustique infecté du genre *Anopheles*.

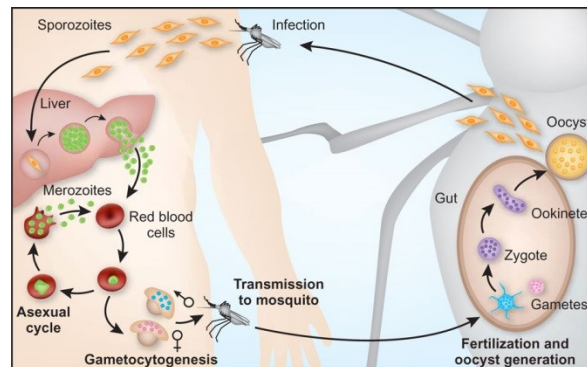


Figure 54 : Cycle de vie du *Plasmodium falciparum*¹⁹⁵

Le cycle de vie du plasmodium se déroule successivement chez l'homme et chez l'anophèle. Chez l'homme, le cycle est divisé en 2 phases :

- La phase hépatique, correspondant à l'incubation asymptomatique
- La phase érythrocytaire (sanguine), correspondant aux symptômes cliniques (Figure 55)

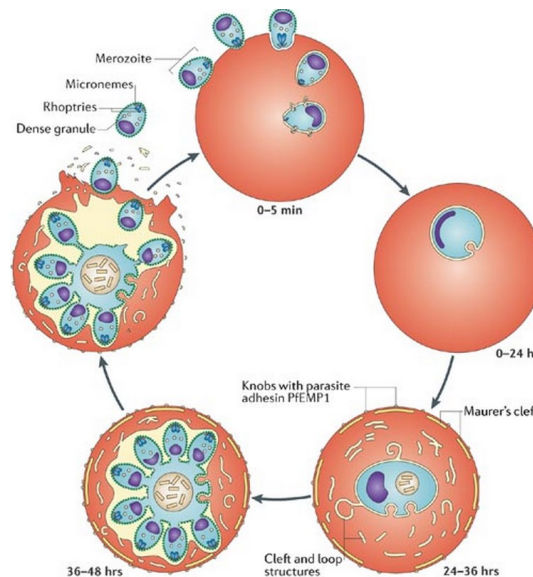


Figure 55 : Cycle érythrocytaire¹⁹⁶

Les sporozoïtes inoculés par l'anophèle gagnent les hépatocytes où ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires. 7 à 15 jours après inoculation, ces schizontes éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes dans le sang. Les mérozoïtes pénètrent alors dans les globules rouges et la maturation

d'un seul d'entre eux conduit à la destruction de la cellule hôte et au relargage de 8 à 32 nouveaux mérozoïtes. Ces derniers infectent de nouveaux érythrocytes et entament un nouveau cycle de réplication. Après plusieurs cycles de maturation érythrocytaire, certains mérozoïtes subissent une différenciation sexuée sur une dizaine de jours et se transforment en gamétocystes mâles ou femelles qui vont circuler dans le système sanguin pendant 10 à 15 jours. Ces gamétocystes sont ingérés par l'anophèle lors du repas sanguin et vont pouvoir évoluer en gamètes mâles et femelles pour former ensuite un ookinète qui va évoluer en oocyste pour donner des sporozoïtes pouvant infecter l'homme.¹⁹⁷

Au niveau des globules rouges, l'infection au *Plasmodium falciparum* (PF) induit des modifications de la membrane plasmique des globules rouges hôtes en y exportant ses propres protéines qui modifient les propriétés et la rhéologie de ces cellules.¹⁹⁸

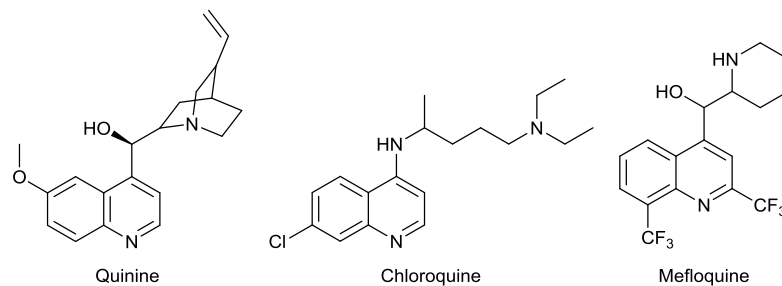


Figure 56 : Quinine et analogues

Les médicaments antipaludéens dérivés de la quinine présentent des propriétés schizonticides par accumulation toxique dans la vacuole digestive du parasite après pénétration du globule rouge et du parasite intra-érythrocytaire. Cette accumulation inhibe la dégradation de l'hème nécessaire à la survie du parasite mais les résistances à ces traitements sont de plus en plus importantes.¹⁹⁹ Face à cette augmentation des résistances, il est nécessaire de développer de nouvelles molécules capables de limiter l'expansion de l'infection, seules ou combinées à d'autres médicaments antipaludiques. L'accès à de nouveaux traitements passe par la compréhension des mécanismes d'action des composés développés et de leurs cibles biologiques.

1.2. TSPO2 et Erythrocytes

Une nouvelle isoforme du TSPO a récemment été découverte par Fan *et al.*²⁰⁰ en 2009. Cette isoforme, appelée TSPO2 est issue d'un gène différent du *Tspo* codant pour le TSPO abordé depuis le début de ce manuscrit, il s'agit du gène *Tspo2*. L'équipe à l'initiative de cette découverte a réalisé des études phylogénétiques afin de déterminer l'origine de cette isoforme qui conserve tout de même une bonne homologie de séquence avec la protéine TSPO native.

On peut voir dans la figure 57 que le *Tspo1* est un gène constitutif fortement conservé au travers de l'évolution et des espèces² tandis que le gène *Tspo2* apparaît seulement chez les oiseaux et les mammifères. Cette découverte suppose que la duplication du gène *Tspo1* en *Tspo2* est ancienne et a eu lieu avant même la séparation des oiseaux et des mammifères. Ils ont également montré que les

deux gènes étaient impliqués dans des réseaux de gènes différents, supposant ainsi des fonctions différentes ayant évoluées au cours du temps.

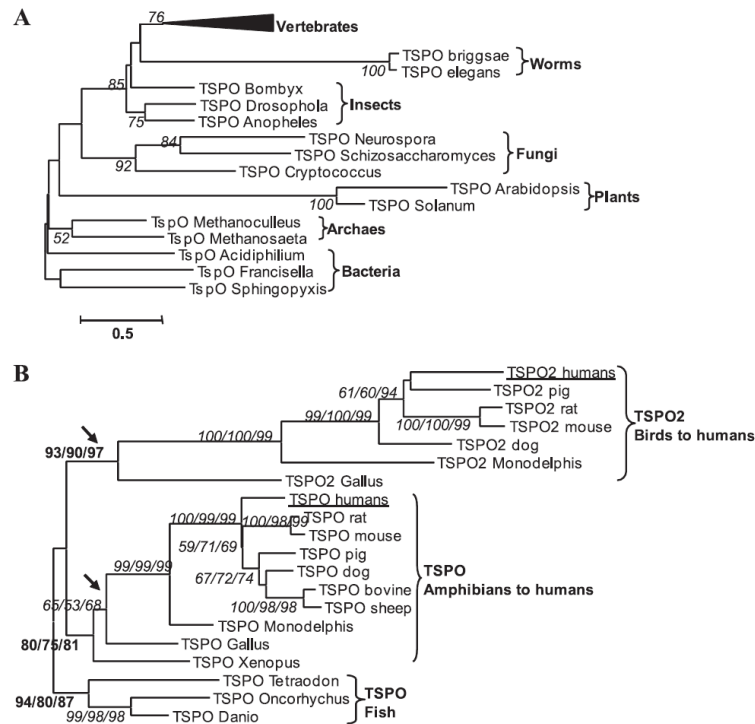


Figure 57 : Arbre phylogénétique (neighbour joining) de comparaison entre les protéines TSPO et TSPO2 de différentes espèces, réalisé par Fan *et al.*²⁰⁰

A la différence du TSPO1 mitochondrial, la protéine TSPO2 est principalement exprimée au niveau des membranes du réticulum endoplasmique et du noyau. On retrouve particulièrement son expression au niveau de cellules hématopoïétiques et des érythrocytes. Ces derniers sont hautement spécialisés et on retrouve le TSPO2 au niveau de la membrane plasmique des globules rouges.

Bien que fonctionnellement différent du TSPO1, le TSPO2 a conservé son activité de transporteur de cholestérol et reste seul responsable de la régulation du trafic intracellulaire de cholestérol chez les hématies.²⁰⁰ Il exprime d'ailleurs toujours le domaine CRAC au niveau de la partie C-terminale de la protéine. Par contre, l'affinité spécifique pour le PK-11195 a disparu à cause de la substitution des Trp₄₂ et Trp₁₀₇ par une méthionine et une leucine, ces deux acides aminés étant essentiels pour la liaison au PK-11195. Le cholestérol influe sur la fluidité et l'intégrité des membranes et participe ainsi à l'élasticité des hématies pour leur permettre de circuler dans certains capillaires étroits. Le cholestérol a également un rôle majeur dans le développement des érythrocytes et subit une redistribution intracellulaire vers la membrane nucléaire des érythroblastes pour la maturation en érythrocytes.²⁰¹ Une trop grande quantité de cholestérol dans le cytoplasme peut inhiber cette maturation.

Le TSPO1 est capable de faciliter le transport de la protoporphyrine IX (PPIX) à l'intérieur de la mitochondrie (voir Partie A -3.2.) et, malgré sa localisation au niveau des érythrocytes, aucune étude n'a porté le regard sur la capacité du TSPO2 à faciliter le transport de la PPIX. Afin d'étudier le rôle du

TSPO2, il est nécessaire d'étudier son effet sur le transport des précurseurs porphyriques et l'éventuel effet des ligands sur ce transport.

Le rôle des isoformes du TSPO dans la redistribution intracellulaire du cholestérol semble ainsi établi, mais qu'en est-il du transport des précurseurs de l'hème ? Les ligands du TSPO1 ont montré un effet protecteur par le biais des neurostéroïdes, est-il également possible d'envisager un rôle protecteur du TSPO2 par le biais des neurostéroïdes ou des précurseurs porphyriques ?

1.3. TSPO2 et *P. falciparum*

Le complexe TSPO2/VDAC est impliqué dans les « New Permeability Pathways » (NPPs), des complexes membranaires activés lors de l'infection au *P. falciparum* et essentiels au cycle de développement intra-érythrocytaire du parasite.²⁰² L'expression de ces deux protéines est augmentée dans la membrane des globules rouges (GR) infectés, augmentant ainsi la conductance de ces membranes. La composition et la fonction de ces NPPs ne sont pas encore établies mais l'administration de ligands du TSPO à des concentrations micromolaires induit un blocage de ce changement de conductance et entraîne l'inhibition de la croissance du parasite.²⁰³

Un projet est en cours de développement avec le Dr. Mariano Ostuni (UMR_S1134 Biologie Intégrée du Globule Rouge, INTS, Paris) afin de déterminer comment les changements conformationnels induits par les ligands du TSPO peuvent moduler la fonction des canaux NPPs. Nous cherchons ainsi à déterminer les éléments structuraux des ligands du TSPO impliqués dans cet effet antiparasitaire pour réaliser une optimisation de hit à partir des meilleurs ligands testés. L'équipe de M. Ostuni a pu étudier l'expression du TSPO2 et du VDAC dans les membranes des GR, l'impact de cette expression sur le transport des précurseurs porphyriques afin de tenter d'établir le mécanisme d'action qui conduit à l'inhibition de la croissance du parasite en présence de ligands du TSPO. Dans ce contexte, nous avons resynthétisé les substances de référence (Ro5-4864, SSR-180-575) et nous avons envoyé une sélection de composés issus des familles imidazo[1,2-c]quinazolinones et phénylalanines pour évaluer l'impact de ces différents ligands de TSPO sur l'infection parasitaire. Ce projet en est encore dans sa phase de démarrage, et seuls les premiers résultats préliminaires seront présentés dans ce manuscrit.

2. Effet des ligands du TSPO sur les GR infectés au *P. falciparum*.

La doctorante Irène Marginedas de l'équipe du Dr. Ostuni a travaillé avec des souches du *P. falciparum* présentant des résistances à la Chloroquine (FCR3). Ils ont réalisé des cultures présentant 1 à 5% de parasitémie au stade trophozoïte, synchronisés grâce à l'utilisation de sorbitol. Ils ont utilisé ces cultures pour déterminer :

- L'effet de l'infection sur l'affinité des ligands de référence pour le TSPO2
- L'inhibition de la croissance du parasite induite par les ligands du TSPO
- L'effet des ligands du TSPO sur le transport du ZnPPiX, un analogue fluorescent de l'hème
- L'effet de l'accumulation de ZnPPiX sur la production de ROS et la survie du parasite.

2.1. Effet de l'infection sur l'affinité du Ro5-4864 et SSR-180,575

La taille du complexe impliquant le TSPO2 dans les membranes des GR diminue lors de l'infection au *P. falciparum* (Données non publiées). L'affinité des ligands du TSPO peut être dépendante de la composition du complexe protéique dans lequel la protéine translocatrice se trouve.²⁰⁴ L'équipe du Dr. Ostuni a ainsi étudié l'effet de l'infection au PF sur l'affinité des ligands de référence Ro5-4864, PK-11195 et SSR-180,575.

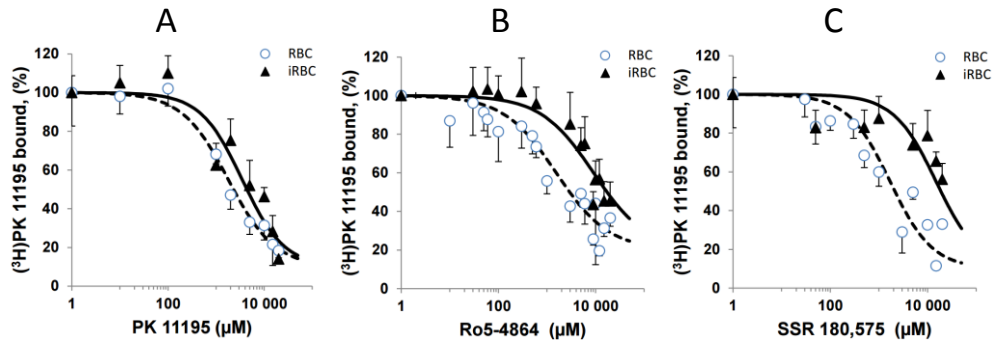


Figure 58 : Affinité des ligands du TSPO pour les membranes de GR sains (RBC) et infectés (iRBC) vs [³H]PK-11195. (Marginedas-Freixa et al. Soumis)

	IC ₅₀ (μM)		
	PK-11195	Ro5-4864	SSR-180,575
GR sains	1.8 ± 0.5	1.5 ± 0.6	1.7 ± 0.5
GR infectés	3.5 ± 0.7	9.0 ± 1.1	15 ± 6

Tableau 14 : IC₅₀ vs [³H]PK-11195 des ligands du TSPO pour les membranes de GR sains et infectés. (Marginedas-Freixa et al. Soumis)

Les ligands de référence testés ont des affinités micromolaires pour les membranes de GR sains et infectés mais l'infection au PF induit une diminution significative de leur affinité et plus particulièrement avec Ro5-4864 et SSR-180,575. Utilisant le [³H]-PK11195 comme sonde radioactive, il est assez logique de ne pas observer de décalage d'affinité avec le PK11195 froid.

2.2. Les ligands du TSPO inhibent la croissance du parasite

2.2.1. Ligands de référence

Les ligands PK-11195, Ro5-4864, Diazépam et flurazépam ont déjà montré un effet inhibiteur de la croissance du PF en culture en inhibant la conductance de la membrane des GR infectés, induisant ainsi la mort du parasite. L'équipe du Dr. Ostuni a pu réitérer ces résultats en utilisant une souche résistante à la chloroquine (souche FCR3).

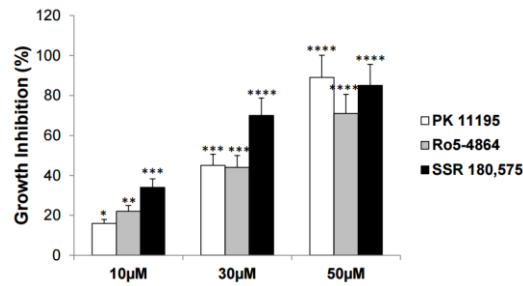


Figure 59 : Inhibition de la croissance du parasite induite par les ligands du TSP0 (souche FCR3). (Marginedas-Freixa et al. Soumis)

Les ligands de référence testés aux concentrations de 10, 30 et 50 µM inhibent d'une manière dose-dépendante la croissance du PF. L'effet antiparasitaire du SSR-180,575 est plus marqué que pour PK-11195 et Ro5-4864. Tous les ligands sont capables d'induire la mort du parasite après 2 cycles complets de développement parasitaire (96h).

La réduction de la parasitémie peut résulter d'une inhibition de la croissance intra-érythrocytaire et/ou de l'inhibition de l'intégration du parasite par des GR sains. Des analyses de réinfections ont été réalisées et aucun de ces ligands n'a montré d'effets significatifs sur la protection contre l'infection de GR sains. La parasitémie semble ainsi diminuée par l'inhibition de la croissance intracellulaire du parasite, et non par une protection contre l'infection d'autres GR sains.

2.2.2. Ligands du laboratoire

L'effet sur la croissance du parasite de quelques représentants des trois familles imidazo[1,2-c]quinazolinones, phénylalanines et dihydroquinolinones à 10µM et 50 µM a été testé sur la souche FCR3 résistante à la chloroquine par le groupe de M. Ostuni (Figure 60).

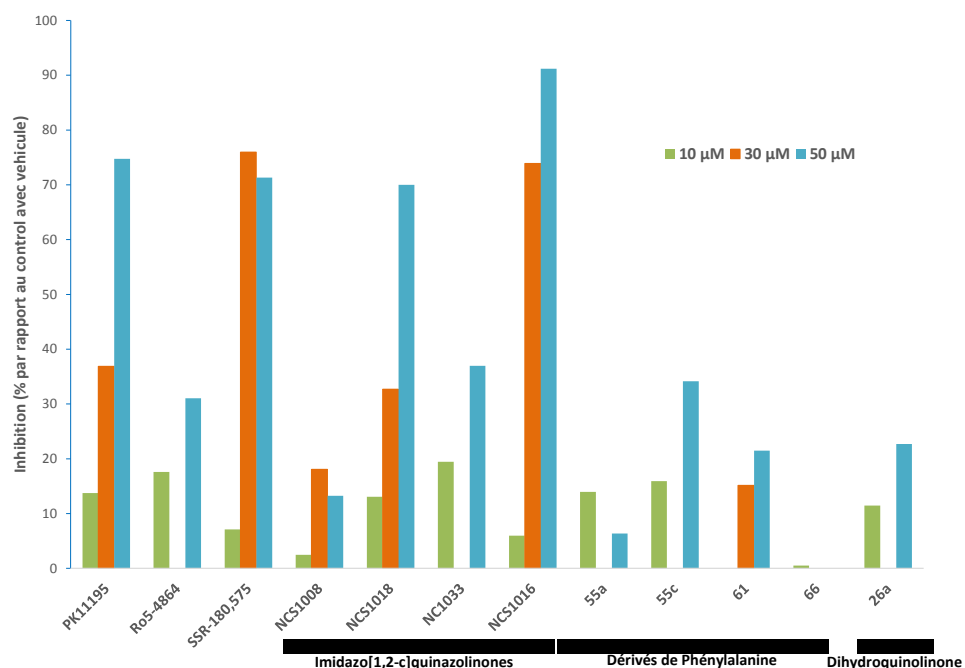


Figure 60 : Inhibition de la croissance du PF après 48h (souche FCR3).

On peut voir à la figure 60 que certains membres de la famille des imidazo[1,2-c]quinazolinones présente une bonne activité inhibitrice de la croissance du PF comparable à l'effet des ligands de référence. Plus particulièrement, les dérivés SSR-180,575 et NCS1016 présentent une bonne activité inhibitrice à 30 μM au bout de 48h. Les dérivés de phénylalanine et des dihydroquinolinones ne présentent pas un effet antiparasitaire très important après 2 jours d'application à 10, 30 ou 50 μM .

Même si l'ensemble des problèmes de relations structure-activité rencontrés avec le TSPO semblent également s'appliquer à l'isoforme TSPO2, l'ensemble de ces résultats montre l'intérêt du développement des ligands du TSPO pour la découverte de nouveaux traitements antiplasmodiques.

2.3. Les ligands du TSPO modulent le transport de la ZnPPiX

Le TSPO est connu pour être impliqué dans le transport des précurseurs de l'hème. Bien que cette fonction n'ait été caractérisée que pour l'isoforme TSPO1, la localisation érythrocytaire du TSPO2 rend possible la conservation de cette fonction à travers l'évolution. Afin de mesurer si le transport des analogues de l'hème est stimulé par les ligands du TSPO, il est possible d'utiliser du ZnPPiX, un analogue fluorescent de l'hème qui peut être internalisé par les GR infectés par le PF.²⁰⁵

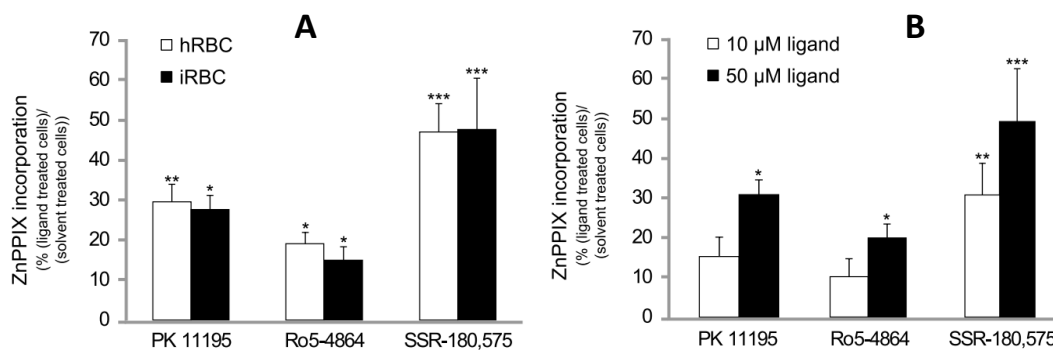


Figure 61 : Effet des ligands du TSPO sur le transport du ZnPPiX chez les GR sains (hRBC) et infectés (iRBC). (Marginedas-Freixa et al. Soumis)

Quelle que soit l'état infectieux ou sain des GR, les ligands de référence du TSPO stimulent l'internalisation du ZnPPiX de manière dose-dépendante. Le SSR-180,575 montre même un effet très important à 50 μM par rapports aux autres références de la littérature.

2.4. L'accumulation de Zn-PPIX induit une production de ROS

Les voies métaboliques impliquées dans l'inhibition de la croissance du parasite par les ligands du TSPO ne sont pas encore établies mais l'équipe du Dr. Ostuni a testé l'effet des ligands du TSPO sur la production de ROS par les GR.

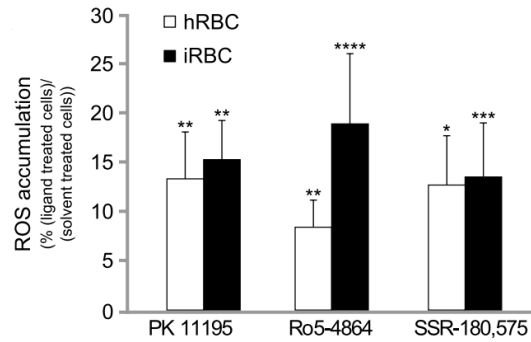


Figure 62 : Stimulation de la production de ROS chez les GR sains (hRBC) et infectés au PF (iRBC) après une application de ligands du TSPO à 50 μ M. (Marginedas-Freixa et al. Soumis)

On voit ici que l'utilisation *in vitro* de ligands du TSPO induit une augmentation de la production de ROS érythrocytaires de 7 à 13% chez les GR sains et de 12 à 18% pour les GR infectés au PF. Nous avons montré dans ce manuscrit l'effet protecteur des ligands du TSPO vis-à-vis du stress oxydatif chez les cellules du SNC. Au niveau des GR, on observe un effet totalement inversé d'augmentation du stress oxydatif induit par les ligands du TSPO. Ce stress oxydatif pourrait avoir un effet protecteur des érythrocytes infectés par le PF en inhibant le développement du parasite intracellulaire.

2.5. Discussion

La fonction du TSPO2 au niveau des GR n'est pas encore totalement déterminée mais ces résultats semblent indiquer un rôle dans le transport de l'hème qui est induit par la présence de ligands du TSPO. Cet effet sur l'incorporation du ZnPPIX est à l'inverse de celui observé chez le TSPO1, où le transport du PPIX est bloqué par la présence de ligands exogènes.²⁰⁶ Les ligands du TSPO induisent un stress oxydatif chez les GR par le biais du TSPO2, il s'agit également d'un effet inversé par rapport au TSPO1 dont l'impact reste à étudier.

Ces deux propriétés mises en avant par ces tests permettent de confirmer qu'il existe une voie métabolique par l'intermédiaire du TSPO2 qui semble mettre en jeu des mécanismes ioniques²⁰² et oxydatifs qui peuvent agir en synergie pour la protection des GR vis-à-vis d'une infection au PF. Cet effet protecteur est particulièrement encourageant car il ne dépend pas du parasite et pourrait peut-être limiter l'apparition de résistances.

3. Conclusion

Le TSPO1 et le TSPO2 semblent être des isoformes qui présentent des propriétés complètement différentes. Ces propriétés sont-elles différentes en fonction des complexes protéiques dans lesquels ils sont engagés ou seulement dues aux différences entre ces deux protéines ? A l'avenir, il sera intéressant de développer des ligands spécifiques du TSPO2 afin de pouvoir mieux comprendre sa fonction, sa structure et mode d'action pour essayer de développer de nouveaux traitements antipaludiques.

Partie D - Méthodologie de synthèse des 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-ones

1. Introduction – Etat de l’art

Nous avons vu dans la Partie B -2.5. l’intérêt d’utiliser des plateformes hétérocycliques non planaires présentant un nombre faible de cycles aromatiques afin d’améliorer les propriétés physicochimiques de certains composés intéressants. Nous avons alors décidé de remplacer le scaffold imidazo[1,2-c]quinazolin-2-one par le châssis moléculaire 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one qui peut s’apparenter à une phénylalanine rigidifiée (Figure 63).

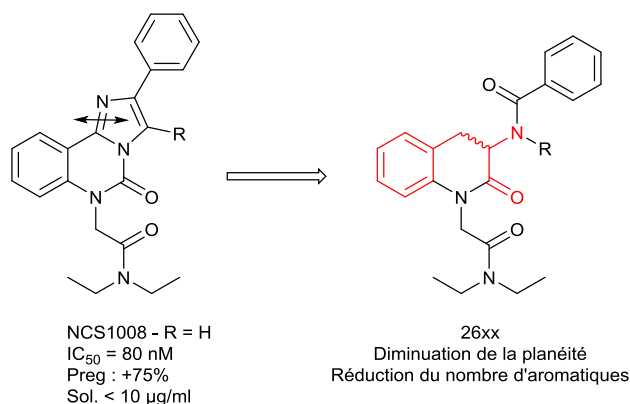


Figure 63 : Coupure de l’imidazo[1,2-c]quinazolinone

La 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one est une plateforme moléculaire utilisée dans de multiples champs d’application en chimie médicinale comme des antagonistes de la cholécystokinine (**C**),²⁰⁷ des inhibiteurs de l’enzyme de conversion (**A**),²⁰⁸ des anticoagulants (**E**)²⁰⁹ ou encore des inhibiteurs de la glycogène phosphorylase (**B**) ou de la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) dans le traitement du diabète (**D**) (Figure 64).²¹⁰⁻²¹²

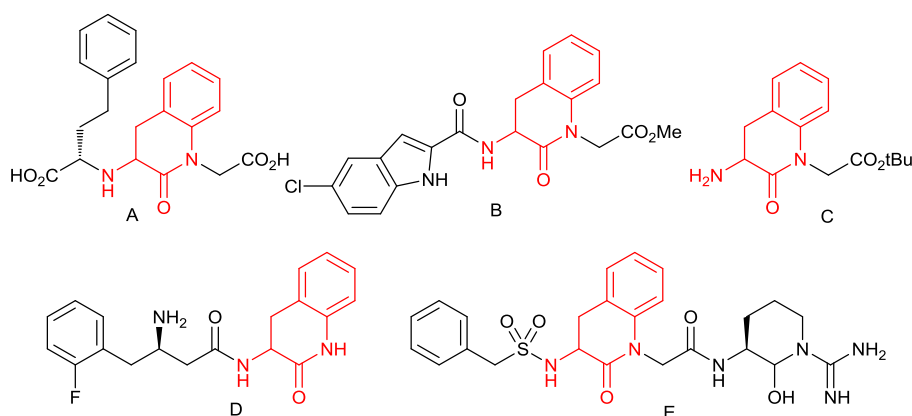
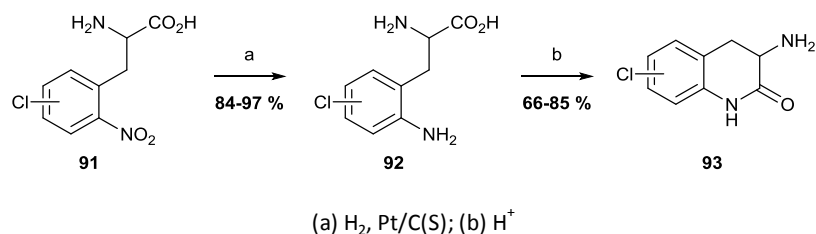


Figure 64 : Composés d’intérêt contenant le squelette 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one

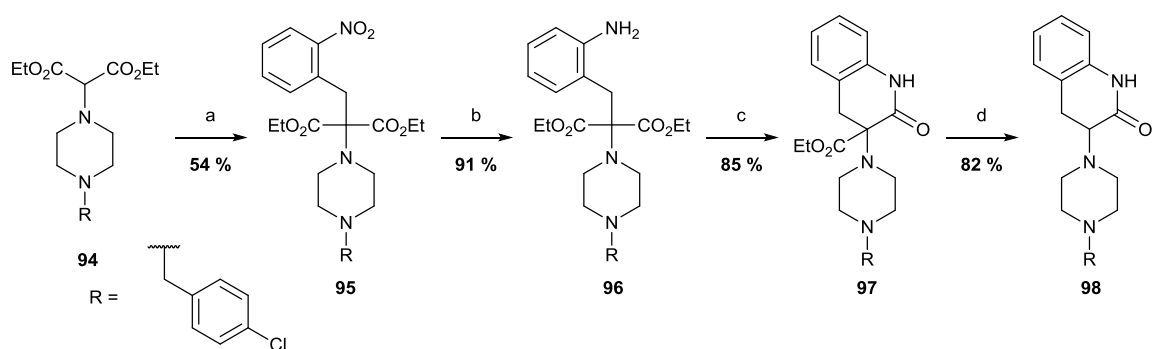
Il existe différentes manières d’y accéder, certaines respectant la chiralité de la phénylalanine cyclisée et certaines n’en tenant pas compte. Ces méthodes sont présentées ci-après.

1.1. Méthodes racémiques

La première méthode permettant d’obtenir le scaffold 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one racémique a été décrite par Davis *et al.* en 1975.²¹³ Cette synthèse met en jeu l’*o*-aminophénylalanine **92** qui permet l’accès au lactame **93** par une cyclisation en présence d’une catalyse acide (Figure 65).

Figure 65 : Méthode décrite par Davis pour accéder aux 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one²¹³

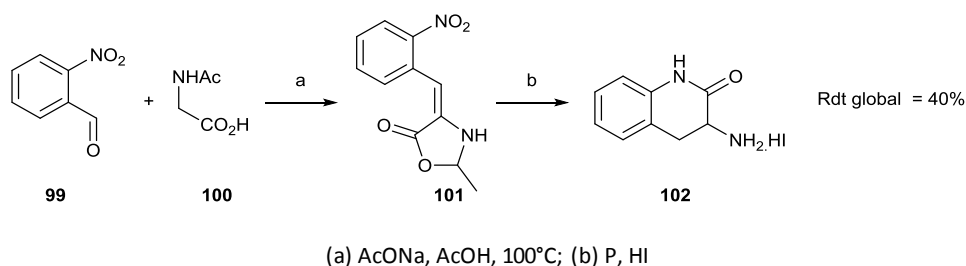
L'équipe de Zhao²¹⁴ a décrit l'alkylation d'un dérivé du chlorure de 2-nitrobenzyle par un dérivé aminomalonate d'éthyle à chaud (Figure 66). Le nitro **95** est réduit en amine **96**, qui est ensuite cyclisée par une réaction nucléophile de l'amine sur l'ester pour former le cycle δ -lactame avec un rendement de 85%. Le composé **97** est ensuite décarboxylé à chaud pour donner la 3-pipérazinyl-3,4-dihydroquinolin-2-one **98** dans sa forme racémique.



(a) Chlorure de 2-nitrobenzyle, NaOEt, EtOH, reflux, 15h; (b) H₂, 10% Pd/C, 1 atm, EtOAc, ta, 24h; (c) EtOH, reflux, 4h; (d) 20% NaOH, MEOH, reflux, 18h.

Figure 66 : Méthode de Zhao *et al.* pour accéder au squelette 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one²¹⁴

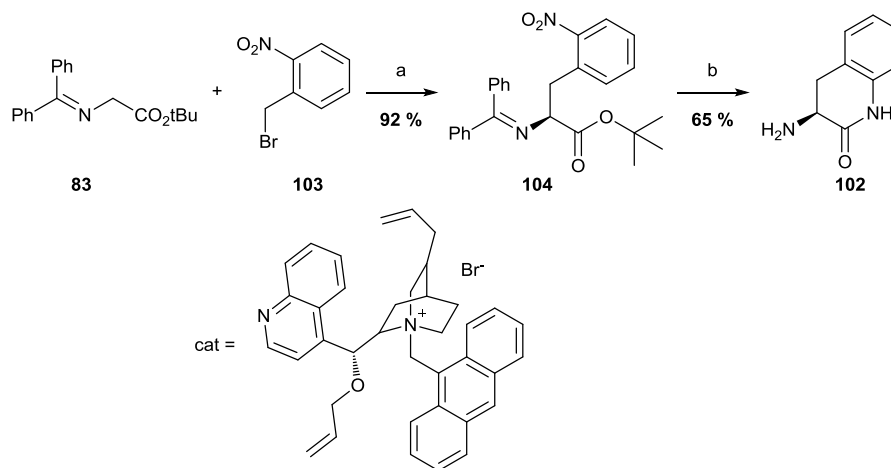
L'équipe d'Albrecht²¹⁵ utilise la condensation du nitrobenzaldéhyde **99** avec la N-acétylglycine **100** pour former l'arylisoxazoline résultante **101**. En présence d'iodure d'hydrogène et de phosphore rouge, le nitro est réduit et l'aniline peut attaquer l'ester cyclique pour libérer de l'acétaldéhyde. La réduction *in situ* de la double liaison intracyclique entraîne la formation du squelette 3-amino-3,4-dihydroquinolinone **102**.

Figure 67 : Synthèse selon Albrecht *et al.* du squelette 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one racémique²¹⁵

Pour accéder à des dérivés chiraux, l'équipe de Watthey a décrit la synthèse en version racémique puis a formé des diastéréoisomères séparables sur colonne chromatographique. Ils ont ainsi pu accéder à ces dérivés optiquement purs.²¹⁶

1.2. Méthodes respectant la chiralité

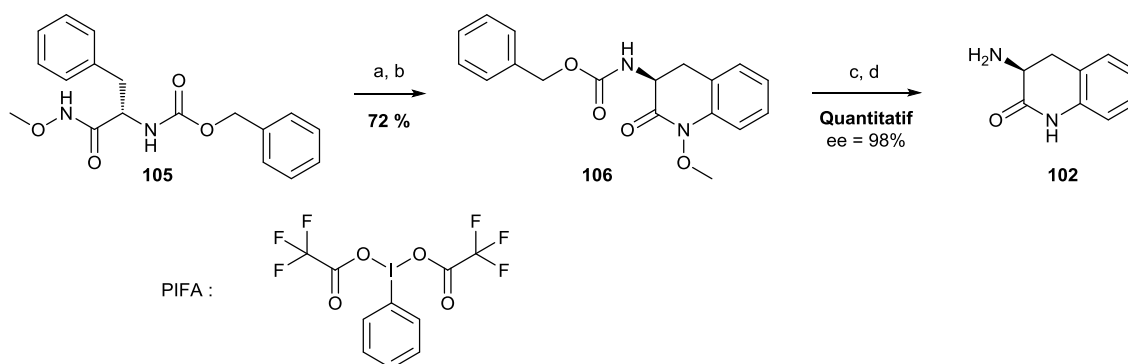
Afin d'accéder à ces composés de manière chirale, il est possible d'utiliser la méthode décrite par Hulin *et al.*²¹⁷ qui consiste en une alkylation énantiosélective de la glycine **83** avec le bromure de 2-nitrobenzyle **103** en présence d'un agent de transfert de phase chiral en milieu biphasique afin d'obtenir la 2-nitrophénylalanine **104** énantiomériquement pure. Cette étape est suivie d'une hydrogénation catalytique en milieu acide qui réduit le groupe nitro, déprotège les fonctions amine et acide carboxylique et cyclise pour donner la 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one **102** optiquement pure (Figure 68).



(a) cat, CsOH.H₂O, DCM, -30°C; (b) H₂, Pd-C, MeOH, 2M HCl.

Figure 68 : Synthèse du squelette 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one par Hulin *et al.*²¹⁷

Birch²¹⁸ décrit cette cyclisation en utilisant du PIFA, une espèce hypervalente d'iode²¹⁹⁻²²¹ permettant la cyclisation oxydante du méthoxycarboxamide **105** en dihydroquinoline **106** qui peut ensuite être déprotégée par hydrogénation de manière quantitative pour donner la 3-amino-3,4-dihydroquinolinone **102** avec 98% d'excès énantiomérique (Figure 69).



(a) PIFA, TFA, DCM, 0°C, 1.5h; (b) NaHCO₃ 10% aq; (c), H₂, 10% Pd/C, 1 bar, EtOAc; (d) EtOH/Eau, H₂, 10% Pd/C, 1 bar, pH 3.

Figure 69 : Synthèse du squelette 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one par Birch *et al.*²¹⁸

1.3. Objectifs

D'après la littérature, des dérivés peptidomimétiques présentant un carbone chiral directement branché sur l'azote intracyclique de la 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one n'ont jamais été décrits

(Figure 70). Les cyclisations présentées précédemment nécessitent obligatoirement le passage par une amine libre ou une amine substituée par un méthoxy et l'alkylation du squelette ainsi formé ne permettrait pas la conservation de la chiralité du carbone greffé.

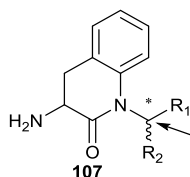


Figure 70 : 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one avec un carbone chiral branché sur l'azote endocyclique

Notre laboratoire a une bonne expérience dans l'utilisation de réactions pallado-catalysées pour accéder à des plateformes hétérocycliques. L'utilisation d'une catalyse par les métaux de transitions pour cycliser un dipeptide contenant la 2-bromophénylalanine chirale permettrait d'accéder à des dérivés peptidomimétiques présentant le scaffold 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-one **107** avec un centre chiral sur l'azote endocyclique. Néanmoins, avec ce substrat dipeptidique **87a**, deux cyclisations différentes peuvent résulter et conduire soit à une dihydroquinolinone **88a** dite « C6 » dans ce manuscrit, soit une indoline **89a** dite « C5 ».

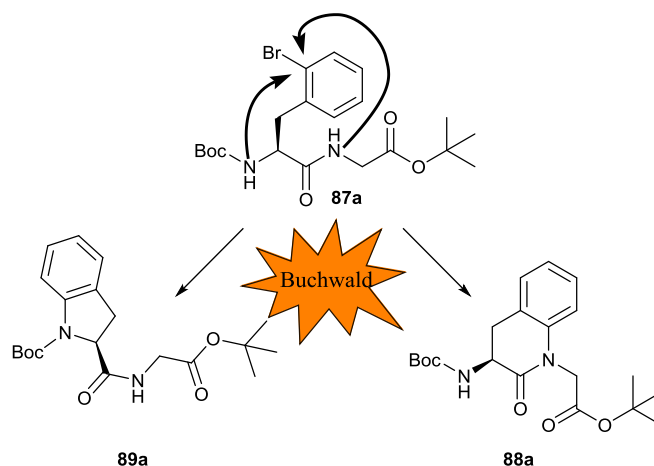


Figure 71 : Cyclisation envisagée

Nous avons donc décidé d'étudier la réaction de cyclisation d'un dipeptide contenant la 2-bromophénylalanine par une réaction d'amination pallado-catalysée de type Buchwald-Hartwig afin d'évaluer la régiosélectivité de la réaction, et déterminer les conditions réactionnelles permettant d'orienter la réaction vers le C5 ou le C6.

1.4. Réaction de Buchwald-Hartwig

La réaction de Buchwald-Hartwig est une réaction de couplage pallado-catalysée permettant de former une liaison carbone-azote entre un halogénure d'aryle et une amine, un amide, un carbamate ou une urée. Elle met en œuvre un système catalytique composé d'une espèce de Pd(0) et d'un ligand. Les ligands utilisés sont généralement des dérivés de phosphine. Le cycle catalytique débute par la formation de l'espèce catalytique par fixation du ligand sur le Palladium (Figure 72). Le Palladium(0) s'insère ensuite sur la liaison halogène aryle par une addition oxydante. L'amine (ou amide) vient

ensuite se fixer à ce complexe puis est déprotonée par une base. La formation de la nouvelle liaison carbone-azote intervient lors de l'élimination réductrice qui conduit à la formation du dérivé ArNR_1R_2 et l'espèce catalytique $\text{LnPd}(0)$. Cette réaction présente 4 étapes clés pour sa survenue : l'addition oxydante, l'insertion de l'amine, la déprotonation et l'élimination réductrice.

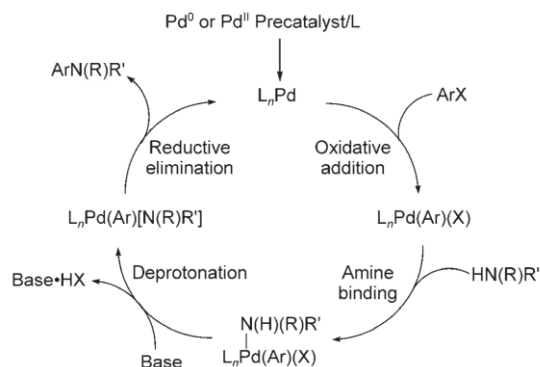


Figure 72 : Mécanisme de la réaction de Buchwald-Hartwig²²²

L'espèce de palladium utilisé joue sur la vitesse de formation de l'espèce catalytique. Le $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ ou le $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ sont classiquement utilisés.

La nature du ligand utilisé va influencer sur la vitesse de l'addition oxydante ainsi que sur la vitesse de l'élimination réductrice. Il existe plusieurs catégories de ligands développés pour la réaction de Buchwald. La plupart sont des dérivés de phosphine qui peuvent être monodentates ou bidentates.

Les ligands monodentates du type biarylephosphine sont les plus utilisés et présentent des propriétés différentes selon les substituants du biaryle ou ceux sur le phosphore (Figure 73).

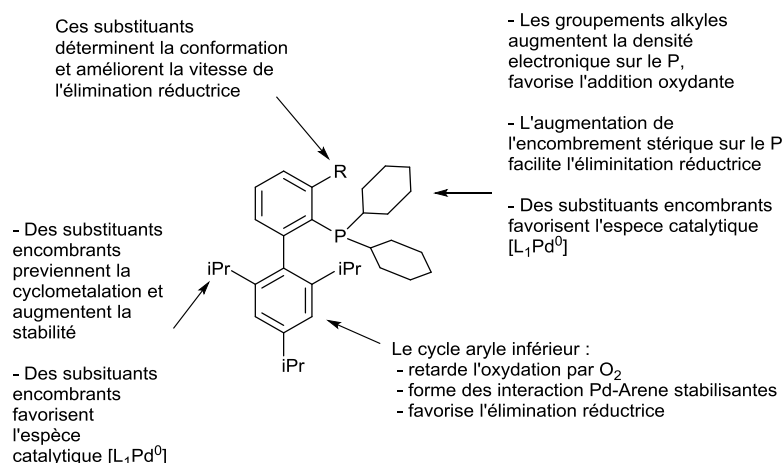


Figure 73 : Résumé des effets des décorations sur les phosphines de type biaryle²²²

La base, par sa nature et son pKa, va être déterminante pour la déprotonation de l'azote et influencer sur la conduite de la réaction.

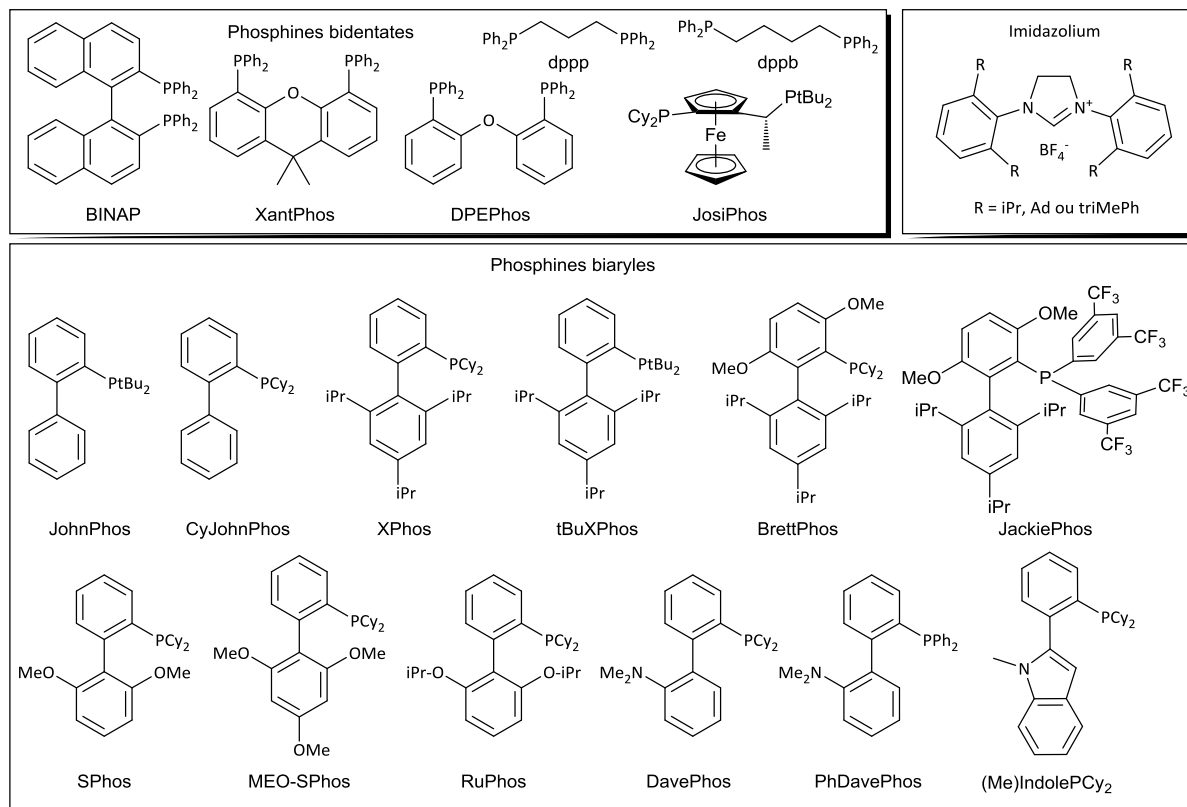


Figure 74 : Ligands utilisés dans la réaction de Buchwald (non exhaustif)

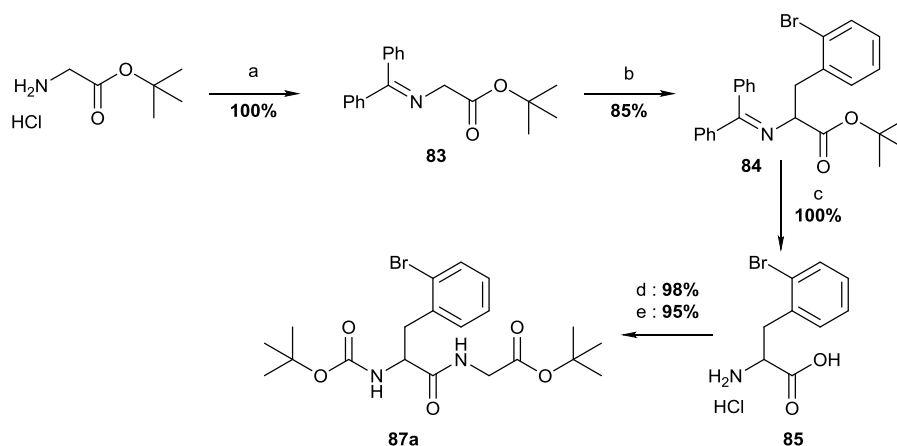
Pour les systèmes complexes comme le nôtre, tous ces paramètres nécessitent d'être étudiés afin de déterminer les meilleures conditions réactionnelles pour synthétiser sélectivement le C5 ou le C6.

2. Développement de la réaction en phase liquide

2.1. Préparation du substrat

Nous avons décidé de réaliser les essais de mise au point en utilisant un substrat modèle Boc-2BrPhe-Gly-OtBu **87a** qui nous permet d'observer une régiosélectivité en nous affranchissant des contraintes stériques potentielles imposées par l'ajout d'un substituant sur la glycine. Pour des raisons de coûts, nous avons réalisé la première partie de l'étude en série racémique en synthétisant nous-mêmes la 2-bromophénylalanine. Pour l'étude en série chirale, nous avons acheté chez la société Chem-Impex la Boc-L-2-bromophénylalanine.

La glycine-OtBu est condensée avec la diphenylimine à froid pour conduire à la base de Schiff **83**. Celle-ci peut ensuite alkyliser le bromure de bromobenzyle en milieu biphasique en utilisant le chlorure de tétrabutylammonium comme agent de transfert de phase. Cette méthode a été décrite dans les travaux de Nun *et al.* cependant il est possible d'utiliser un agent de transfert de phase chiral pour obtenir des acides aminés chiraux à partir de la glycine.¹⁹¹ Après déprotection de l'imine et de l'ester du dérivé **84**, la 2-bromophénylalanine **85** obtenue est protégée par un *tert*-butoxycarbonyl (Boc) puis couplée avec la glycine pour conduire au substrat Boc-2BrPhe-Gly-OtBu **87a** (Figure 75).



(a) Benzophenone imine, DCM, ta, 3h; (b) 2-bromobenzylbromide, KOH, TBAC, DCM, ta, 4h; (c) HCl, eau, 90°C, 15h; (d) Boc₂O, NaOH, eau, Dioxane, 0-25°C, 4h; (e) Glycine *tert*-butyl ester hydrochloride, HATU, DIEA, DCM/DMF (3/1), ta, 30min

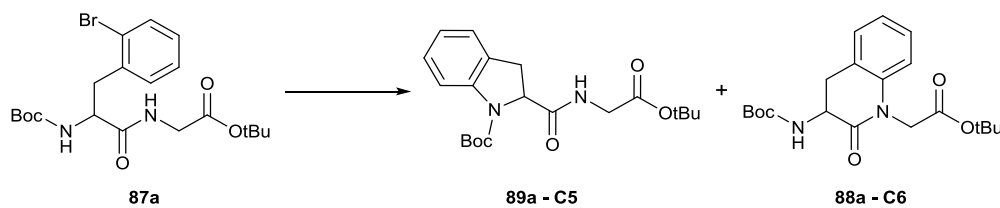
Figure 75 : Accès au substrat modèle Boc-2BrPhe-Gly-OtBu

La Boc-2-bromophénylalanine-glycine-OtBu **87a** présente deux fonctions amides pouvant réagir avec l'halogénure en condition de Buchwald Hartwig, et nous avons étudié les paramètres réactionnels (Pd, ligand, base, solvant, température) permettant une cyclisation régiosélective, soit pour donner le cycle à 5 chaînons C5 **89a**, soit le cycle à 6 chaînons C6 **88a** (Figure 71). La première partie de ce travail a été réalisée en série racémique.

2.2. Screening des conditions

Afin de déterminer quelle fonction amide réagirait en priorité dans des conditions de Buchwald, nous avons débuté l'étude par l'utilisation de conditions classiques d'aminations pallado-catalysées, incluant Pd₂(dba)₃ comme source de palladium, en présence de carbonate de césium dans le toluène à 100°C.²²³ Nous avons testé en première intention deux ligands classiques de cette réaction, BINAP et XantPhos (Figure 74).

Les résultats de ces premières expériences sont présentés dans le tableau 15. Les dérivés dihydroquinolinone **88a** et indoline **89a** ont été purifiés et caractérisés et nous avons effectué des courbes étalons sur HPLC pour pouvoir ensuite doser les produits des réactions par HPLC en utilisant la caféine comme étalon externe. L'influence des paramètres réactionnels sur le rendement de chaque composé a ainsi pu être facilement évaluée.



Entrée	Ligand	%C5 ^a	%C6 ^a
1	BINAP	50	22
2	XantPhos	50	50

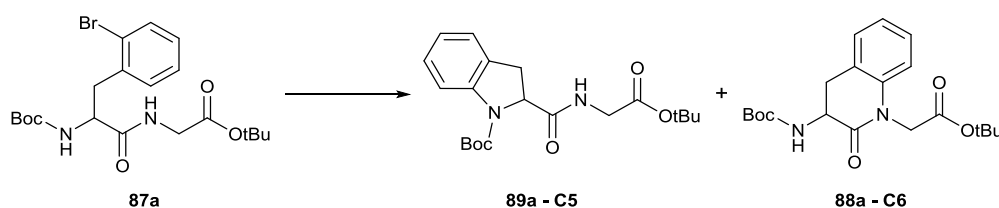
5mol% Pd₂(dba)₃, 10mol% Ligand, 2eq Cs₂CO₃, 1,5mL Toluène, 100°C, 24h, ^adéterminé par HPLC

Tableau 15 : Résultats préliminaires - conditions classiques de Buchwald

Le XantPhos ne joue pas sur la sélectivité et on obtient un ratio 1/1 de C5 et de C6. Le BINAP ne semble pas favoriser le déroulement de la réaction puisqu'on observe 50% de C5 et seulement 22% de C6. Ces deux ligands bidentates testés ne nous ont pas permis d'observer une sélectivité mais l'utilisation de ligands de type biaryle phosphine pourra peut-être jouer sur l'orientation de la réaction.

Screening des ligands

Afin de vérifier si le ligand influence la régiosélectivité de la réaction, nous avons réalisé un criblage de ligands. Nous nous sommes focalisés sur les dérivés de biaryle phosphine, mais nous avons également testé d'autres systèmes phosphiniques (PPh_3 et analogues, dppb et dppp) ainsi que des imidazoliums (Tableau 16). Les structures des différents ligands sont présentées dans la figure 74.



Entrée	Type	Classe	Ligand	%C5 ^a	%C6 ^a
1	MD	PR_3	PPh_3	3	0
2	MD	PR_3	PCy_3	4	0
3	BD	Bisphosphine	dppb	10	4
4	BD	Bisphosphine	dppp	11	3
5	BD	Bisphosphine	BINAP	50	22
6	BD	Bisphosphine	XantPhos	50	50
7	BD	Bisphosphine	DPEPhos	68	9
8	MD	BiarylPhosphine	JohnPhos	6	2
9	MD	BiarylPhosphine	CyJohnPhos	14	5
10	MD	BiarylPhosphine	XPhos	34	63
11	MD	BiarylPhosphine	tBuXPhos	4	1
12	MD	BiarylPhosphine	SPhos	73	15
13	MD	BiarylPhosphine	RuPhos	67	23
14	MD	BiarylPhosphine	MeO-SPhos	63	36
15	MD	BiarylPhosphine	BrettPhos	64	8
16	MD	BiarylPhosphine	JackiePhos	80	20
17	MD	BiarylPhosphine	DavePhos	39	13
18	MD	BiarylPhosphine	PhDavePhos	70	11
19	MD	Indole	MeIndolPCy ₂	54	42
20	MD	Imidazolium	IPr	81	5
21	MD	Imidazolium	IAd	0	0
22	MD	Imidazolium	IMe-Ph	0	0

5mol% $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, 10mol% Ligand, 2eq Cs_2CO_3 , 1,5mL Toluène, 100°C, 24h, ^adéterminé par HPLC, MD = Monodentate, BD = Bidentate

Tableau 16 : Effet du ligand sur la sélectivité C5/C6

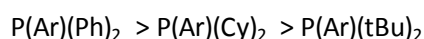
Les phosphines simples comme PPh₃, PCy₃, dppb ou dppp ne permettent pas de réaliser la réaction (entrées 1 à 4). L'ajout d'une flexibilité à la structure du XantPhos permet de favoriser le C5 tandis que la version rigide n'apporte aucune sélectivité (entrées 6 et 7).

Les ligands de type biaryle phosphine non enrichis comme le JohnPhos et CyJohnPhos ne permettent pas la réaction (entrées 8 et 9). L'addition d'un encombrement stérique sur le phényle inférieur favorise le C6 (XPhos, entrée 10). L'utilisation de phosphines présentant un groupement *tert*-butyle sur le phosphore bloque totalement la réaction (entrées 8 et 11).

L'utilisation de phosphines biaryles riches en électrons est censée favoriser le scope des réactions dans lesquelles elles sont engagés.²²³ Les ligands présentant des substituants composés d'hétéroatomes (O ou N), censés augmenter la richesse électronique, favorisent la formation du C5 (entrées 12 à 19). Seul le ligand encombré XPhos permet d'accéder majoritairement au C6 et les versions enrichies du XPhos, les BrettPhos et JackiePhos,²²⁴ orientent la réaction vers la formation du C5.

Les imidazolium sont des carbènes hétérocycliques non phosphorés chélateurs des métaux de transition.²²⁵ La version substituée par des isopropyles permet de synthétiser presque exclusivement du C5 tandis que les versions encombrées avec des adamantanes ou des triméthylphényles, probablement pour des raisons stériques, n'arrivent pas à initier la réaction (entrées 20 à 22).

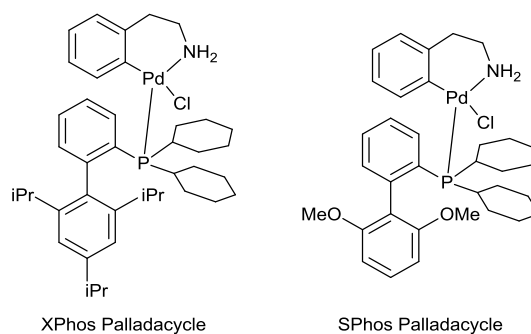
D'une manière générale, on observe une réactivité accrue avec les ligands présentant des phényles par rapport aux cyclohexyles sur le phosphore :



La richesse en électrons des substituants du phosphore est déterminante pour améliorer l'addition oxydante, mais la présence de groupements trop riches ralentit en contrepartie l'élimination réductrice. Ceci pourrait expliquer les problèmes rencontrés lors de l'utilisation de ligands *tert*-butyles et justifier la meilleure réactivité des ligands phényles par rapport au cyclohexyles.

Le XPhos est un ligand hydrophobe encombré et peu électrodonneur et c'est le seul qui permet de favoriser la formation du C6. Il n'existe malheureusement pas de ligands commercialement disponibles qui présentent également ces propriétés, nous n'avons donc pas pu tester l'effet de ligands encombrés et appauvris sur la sélectivité de la réaction.

Les palladacycles sont des précatalyseurs au palladium qui libèrent directement l'espèce catalytique LPd(0) en milieu basique. Ils améliorent généralement les résultats dans la plupart des réactions pallado-catalysées dans lesquelles ils sont engagés (dont couplage de Buchwald-Hartwig).^{226,227} Nous avons tenté d'utiliser des palladacycles de XPhos et de SPhos (Tableau 17). L'utilisation du palladacycle de XPhos a diminué la régiosélectivité que nous avons observé en utilisant le couple Pd₂(dba)₃/XPhos tandis que l'utilisation du palladacycle de SPhos a diminué la conversion par rapport au couple Pd₂(dba)₃/SPhos.



Entrée	Catalyseur	%C5 ^a	%C6 ^a
1	XPhos palladacycle	47	53
2	SPhos Palladacycle	65	9

3mol% Palladacycle, 2eq Cs₂CO₃, 1,5mL Toluène, 100°C, 24h, ^adéterminé par HPLC

Tableau 17 : Structures et résultats avec les Palladacycles

Il n'y a que le XPhos qui nous a permis de favoriser la réaction pour la formation du C6, nous avons donc continué à utiliser ce ligand pour optimiser les autres paramètres de la réaction comme la base, le solvant, la température et la durée.

Effet du solvant

De par ses interactions avec le substrat, le solvant peut influencer sur la conformation d'un composé en solution et donc, dans ce type de réaction, être un paramètre déterminant dans la régiosélectivité.

Entrée	Solvant	Polarité relative ²²⁸	Concentration Molaire (mM)	%C5 ^a	%C6 ^a
1	Toluène	0.099	73	34%	63%
2	Dioxane	0.164	73	12%	71%
3	Dioxane	0.164	146	30%	63%
4	Dioxane	0.164	36.4	24%	67%
5	THF	0.207	73	6%	68%
6	AcOEt	0.228	73	4%	66%
7	DME	0.231	73	17%	66%
8	DMF	0.386	73	0%	34%
9	DMSO	0.444	73	0%	0%
10	MeCN	0.460	73	0%	47%

5mol% Pd₂(dba)₃, 10mol% Ligand, 2eq Cs₂CO₃, Solvant, 100°C, 24h, ^adéterminé par HPLC

Tableau 18 : Effet du Solvant sur la sélectivité C5/C6

L'utilisation de solvants peu polaires comme le dioxane, le THF, l'acétate d'éthyle ou encore le diméthoxyéthane a permis d'obtenir des résultats comparables à ceux du toluène. Les solvants polaires tels que le DMF, le DMSO et l'acétonitrile ne favorisent pas la réaction. Le dioxane est le solvant qui nous a permis d'obtenir le meilleur rendement de C6 (71%) et aucune amélioration significative n'a été notée lors de la dilution ou de la concentration du milieu réactionnel (entrées 3 et 4)

Effet de la température et de la durée

Nous avons ensuite étudié l'impact de la température sur le rendement ainsi que sur la sélectivité de la réaction de cyclisation (Tableau 15).

Entrée	Température	Durée	%C5a	%C6a
1	100°C	6 h	35%	65%
2	80°C	6 h	34%	66%
3	65°C	6 h	39%	61%
4	50°C	15 h	51%	49%
5	40°C	15 h	32%	21%

5% Pd₂(dba)₃, 10% XPhos, 2 eq Cs₂CO₃, 1.5mL Dioxane (73 nM). ^adéterminé by HPLC

Tableau 19 : Effet de la température sur la conversion et la sélectivité

La diminution de la température jusqu'à 80°C pour une durée de 6h n'engendre pas d'effet sur la sélectivité observée à des températures et durées supérieures, le C6 est obtenu avec un rendement similaire à celui de 24h à 100°C (tableau précédent, 66 et 71%). Par contre, la quantité de C5 obtenue à 80°C pendant 6h est supérieure à celle obtenue à 100°C pendant 24h (35 et 12%). Cet écart est attribuable à la faible stabilité du Boc sur l'indoline à des températures élevées. Pour des températures inférieures à 65°C, on observe une augmentation du C5 par rapport au C6. Le C5 semblerait ainsi être favorisé d'une manière cinétique tandis que le C6 serait favorisé d'une manière thermodynamique.

Effet de la base

Dans la réaction de Buchwald, la base intervient pour arracher le proton après insertion de l'azote sur le palladium.²²² Il n'est pas nécessaire d'en utiliser 2 équivalents et notre substrat présente un hydrogène relativement acide sur le carbone α de la phénylalanine qui pourrait être arraché par une base présente en trop grande quantité et ainsi induire la racémisation. Pour observer des effets sur la cinétique de la réaction et limiter la racémisation, nous avons fixé la durée à 4h avec 1.1 équivalent de base.

Entrée	Base	Eq.	Conv.	%C5 ^b	%C6 ^b
1	Na ₂ CO ₃	1,1	7%	3%	3%
2	K ₂ CO ₃	1,1	26%	12%	14%
3	Cs ₂ CO ₃	1,1	80%	39%	41%
4	K ₃ PO ₄	1,1	50%	20%	30%
5	BTPP	1,1	100%	35%	65%

5% Pd₂(dba)₃, 10%XPhos, 1.5mL Dioxane, 80°C, 4h, ^b determined by HPLC

Tableau 20 : Effet de la base sur la conversion et la sélectivité

Les bases inorganiques classiquement utilisées dans la réaction de Buchwald comme les carbonates de césium, de potassium ou encore de sodium ne permettent pas de terminer la réaction sur 4h. L'utilisation d'une base jamais utilisée dans la réaction de Buchwald, le (tert-Butylimino)-tris(pyrrolidino)phosphorane (BTPP), a permis d'améliorer la cinétique de la réaction tout en conservant la sélectivité. Il s'agit d'une superbases non-nucléophile de type phosphazène et l'utilisation

de composés de la même famille dans ce type de couplages n'a été que très récemment décrite.²²⁹ Elle a un pKa d'environ 17 dans le DMSO et de 28 dans l'acétonitrile.^{230,231} Malgré cette forte basicité, nous n'avons pas observé de racémisation (voir Partie D -2.3.). L'utilisation d'une base soluble était déterminante dans le choix de la base lors du transfert de la réaction sur phase solide expliqué en Partie D -3.

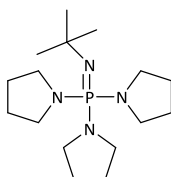


Figure 76 : Structure du BTTPP

A la vue de la cinétique rapide liée à l'utilisation du BTTPP, nous avons voulu observer son effet à des températures plus faibles que 80°C (Tableau 21).

entrée	Température	Conv.	%C5 ^b	%C6 ^b
1	80°C	100%	35%	65%
2	65°C	96%	33%	63%
3	50°C	44%	10%	25%
4	40°C	29%	4%	10%

5% Pd₂(dba)₃, 10% XPhos, 1,1eq BTTPP, 1.5mL Dioxane, 4h, ^b determined by HPLC

Tableau 21 : Effet de la température sur la conversion et la sélectivité

Il est possible d'utiliser le BTTPP sur 4h à 65°C en obtenant une conversion satisfaisante tout en conservant le ratio C5/C6.

Screening des palladiums

Le Pd₂(dba)₃ est l'espèce de Pd(II) dont l'utilisation est la plus répandue dans la réaction de Buchwald. La nature des ligands du pré-catalyseur peut impacter sur l'efficacité de la formation de l'espèce active du catalyseur et jouer sur la cinétique de réaction. Nous avons ainsi testé leur effet sur la cinétique de la réaction à 65°C (Tableau 22).

Entrée	Palladium	Conv.	%C5	%C6
1	Pd ₂ (dba) ₃	96%	33%	63%
2	(Pd(cynamyl)Cl) ₂	33%	8%	16%
3	Pd(dppf)Cl ₂	36%	9%	15%
4	PdCl ₂	29%	5%	12%
5	Pd(OAc) ₂	35%	8%	18%
6	[Pd(Cl)(C ₃ H ₅)] ₂	44%	11%	23%

5% (Pd), 10% XPhos, 1,1eq BTTPP, 1.5mL Dioxane, 65°C, 4h, ^b determined by HPLC

Tableau 22 : Effet de l'espèce de Palladium sur la conversion et la sélectivité

Aucune des autres espèces testées n'a été en mesure d'améliorer la cinétique de réaction et seul le Pd₂(dba)₃ nous permet d'obtenir une conversion suffisante au bout de 4h à 65°C.

Deuxième screening des ligands

L'effet du BTTP sur la cinétique de la réaction nous a poussés à évaluer de nouveau l'influence des ligands sur la sélectivité en présence de cette base.

Entrée	Ligands	Conv.	%C5	%C6
1	XPhos	96%	33%	63%
2	Sphos	42%	19%	6%
3	DavePhos	55%	17%	6%
4	JackiePhos	63%	31%	28%
5	tBuXPhos	52%	40%	2%
6	BrettPhos	46%	36%	6%
7	Cy-cBRIPD	77%	44%	32%

5% Pd₂(dba)₃, 10% Ligand, 1,1eq BTTP, 1.5mL Dioxane, 65°C, 4h

Tableau 23 : Effet du ligand sur la conversion et la sélectivité

Seul le XPhos a une cinétique favorable pour la réaction par rapport aux autres ligands testés pendant 4h à 65°C et seulement 1.1 équivalents de BTTP.

2.3. Racémisation

Le but du développement de cette réaction est de réussir à synthétiser des 3-amino-2,4-dihydroquinolini-2-ones chirales. Il est possible de mesurer la racémisation en utilisant une colonne HPLC chirale mais nous n'en disposons pas au laboratoire. Après déprotection, il est toutefois possible de faire réagir le C6 formé avec une autre molécule chirale pour obtenir des diastéréoisomères qui sont séparables en HPLC.

Le produit de départ **88a** a été synthétisé à partir de la Boc-L-2-bromophénylalanine commerciale afin d'obtenir des dérivés optiquement purs.

Nous avons tenté l'expérience avec différents réactifs chiraux comme des acides aminés mais seul le couplage peptidique avec l'acide camphanique nous a permis d'obtenir des diastéréoisomères séparables en HPLC classique (Figure 77).

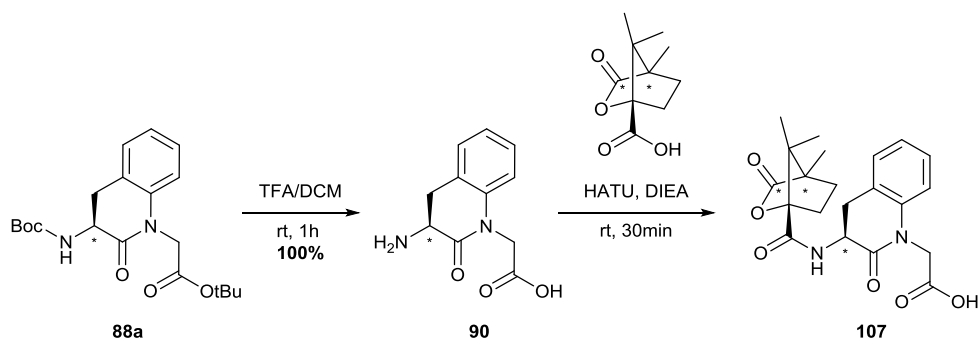


Figure 77 : Couplage avec l'acide camphanique

Cette synthèse a été réalisée en série L et en série racémique. Après couplage, on obtient le spectre HPLC présenté en figure 78. Un seul pic de diastéréoisomère est observé lors de l'utilisation du produit

chiral de conformation L tandis que la série racémique présente 2 pics de taille équivalente. La série D a également été réalisée mais la Boc-D-2-bromophénylalanine commerciale que nous avons utilisé n'était pas optiquement pure et présentait 20% de racémisation avant cyclisation. Néanmoins, ce ratio a été conservé après cyclisation.

L'ensemble de ces résultats montre que nos conditions réactionnelles ne sont pas racémisantes.

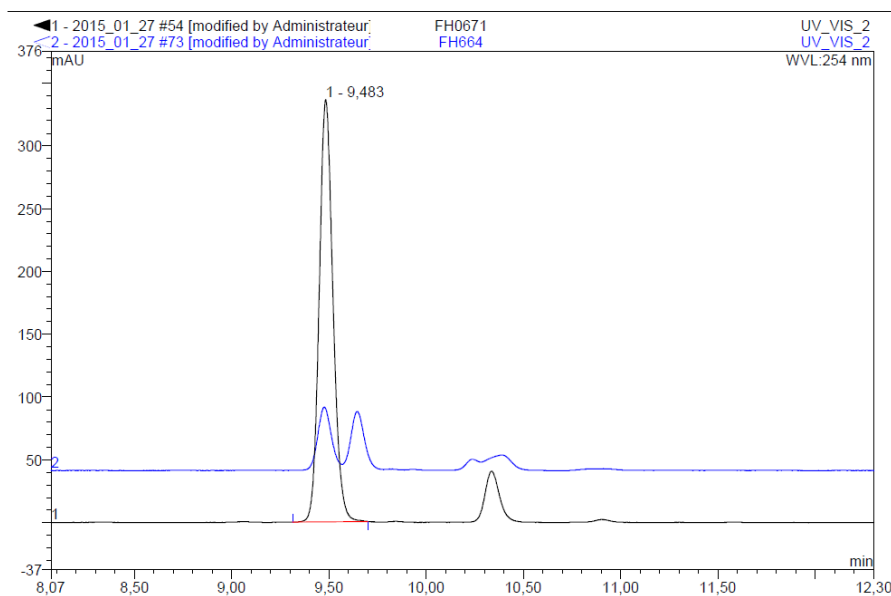
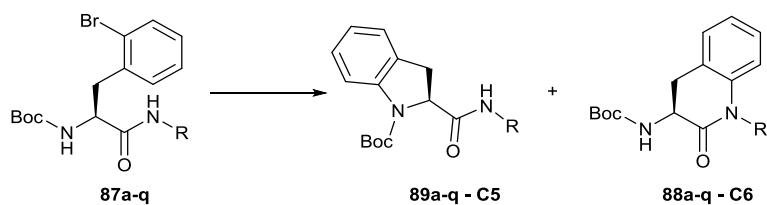


Figure 78 : Séparation des diastéréoisomères (noir : série L, bleu : série racémique)

2.4. Scope de la réaction

Cette étude a été réalisée sur un dipeptide modèle Boc-2-BrPhe-Gly-OtBu **87a** afin de s'affranchir des effets stériques et électroniques qui pourraient être liés à une décoration en partie C-terminale. Après la mise au point des conditions, nous avons alors synthétisé différents substrats pouvant être cyclisés et présentant d'autres acides aminés ou des chaînes carbonées en C-terminal (Tableau 24).



Entrée	Produit de départ	R	% C5	% C6
1 ^a	87a		35	65
2 ^a	87b		100	0
3 ^a	87c		91	0
4	87d		18	82
5	87e		47	26
6	87f		45	16
7	87g		49	23
8	87h		0	0
9 ^a	87i		23	77
10 ^a	87j		60	8
11 ^a	87k		51	25
12	87l		14	15
13	87m		28	20
14	87n		35	21
15	87o		65	17
16	87p		61	22
17	87q		26	15

Conditions : 5% Pd₂(dba)₃, 10% XPhos, 1.1eq BTPP, Dioxane, 65°C, 4h, ^a Estimé par HPLC

Tableau 24 : Effet de la substitution C-terminale

Le passage de la glycine à des acides aminés substitués sur le carbone alpha comme l'alanine et la phénylalanine entraîne une inversion de la sélectivité établie avec la glycine et favorise la formation du C5 (entrées 1, 2 et 3). Le remplacement de la glycine par un méthyle conserve la sélectivité établie (entrée 4). De manière surprenante, les homologues supérieurs éthyle et propyle entraînent une inversion de sélectivité (entrées 4, 5 et 6). La présence d'un groupe allyle favorise la formation du C5

tandis que le propargyle, à cause probablement de sa plus grande capacité à interagir avec le palladium, est dégradé lors de la réaction (entrées 7 et 8). La présence d'un acétonitrile permet par contre de conserver la régiosélectivité C6 établie avec la glycine (Entrée 9). La substitution par des groupements aromatiques encombrés comme le benzyle et le phénéthyle ne permet pas de former le C6 lors de la cyclisation (entrées 10 et 11) et l'utilisation de dérivés de pyridine posent les mêmes problèmes de régiosélectivité (entrées 12, 13 et 14). Enfin, nous avons essayé de réaliser la cyclisation avec des dérivés de type éthyldiméthylamine ou encore des éthers linéaires mais aucun n'a permis de favoriser la formation du C6 (entrées 15, 16 et 17).

Nous n'expliquons pas la différence de réactivité observée lors du passage du méthyle à l'éthyle ou au propyle, ces deux derniers présentant la même flexibilité de chaîne latérale que la glycine. Il serait intéressant de réaliser une étude théorique sur la conformation de ces dérivés afin de mieux comprendre cette différence de réactivité que nous ne pouvons expliquer avec un simple effet électronique ou stérique. Des contacts ont été pris avec les Drs. Vincent Robert et Christophe Gourlaouen (Laboratoire de Chimie Quantique - UMR 7177) mais une première approche théorique a montré des difficultés quant à la faisabilité de l'étude à cause du trop grand nombre de point de rotation de notre substrat, ce qui engendre un nombre de conformères très important et rend plus difficile la détermination des différents états de transition.

Nous avons aussi pensé qu'il pouvait y avoir un effet conformationnel du substituant sur l'azote pouvant induire la formation d'une pince chélatant le palladium avec le carbonyle de la glycine ou la triple liaison du nitrile (entrées 1 et 9) et permettre de favoriser le C6 par rapport au C5. Nous avons ainsi testé d'autres décorations C-terminales pouvant potentiellement présenter cette caractéristique comme les dérivés d'allyle, de propargyle, de pyridine, d'éther ou encore de diméthylamine. Aucun de ces composés n'a permis d'accéder au C6 correspondant, infirmant ainsi cette hypothèse de pince chélatante qui permettrait de favoriser le C6 dans certains cas.

Pour résumer, la plupart des substituants testés, même s'ils n'engendrent pas un fort encombrement stérique, bloquent la formation du C6 au bénéfice du C5. Cet effet pourrait être expliqué par la conformation *trans* du doublet libre de l'azote qui pourrait être imposée par l'utilisation de groupements moins flexibles que la glycine et rendant ainsi indisponible le doublet pour la formation de la liaison avec le palladium après l'addition oxydante.

Il aurait été intéressant de réaliser le blocage des deux hydrogènes de l'azote en utilisant une double protection comme un groupe phtalimide ou un double Boc mais l'effet électroattracteur de ces groupements protecteurs aurait rendu très acide le proton alpha de la phénylalanine et contribué à l'apparition de racémisation au cours de la cyclisation. Nous avons essayé des systèmes de doubles protections présentant moins d'effet électroattracteurs que les amides ou carbamates comme les stabases,²³² les bases de schiff enrichies²³³ ou encore les dioxazinane²³⁴ mais aucune n'a permis d'obtenir un produit stable pouvant être utilisé comme substrat de la réaction de Buchwald (Figure 79).

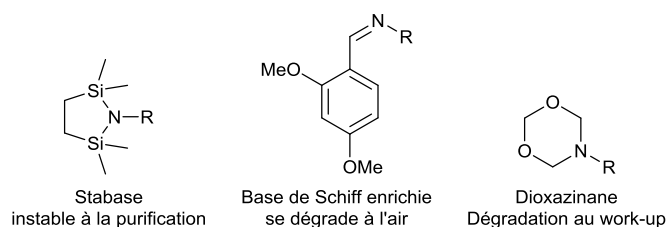


Figure 79 : Groupements protecteur instables

Nous avons tout de même tenté la cyclisation d'un dipeptide Phe-Val protégé par la Benzophenonimine en partie N-terminale mais nous avons observé d'une part la racémisation et d'autre part la formation d'un produit secondaire pouvant résulter de l'attaque de l'amide sur l'imine en milieu basique (Figure 80).²³⁵

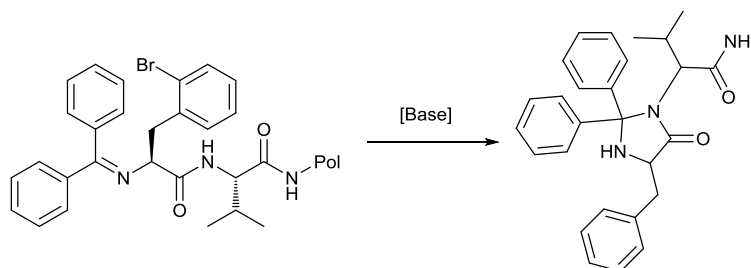


Figure 80 : Réaction secondaire observée lors de la cyclisation avec double protection par une base de Schiff

3. Transfert vers la phase solide

Les réactions pallado-catalysées sur support solide sont de plus en plus utilisées pour la synthèse de polymères ou d'hétérocycles complexes.²³⁶ L'utilisation conjointe de ces deux technologies permet d'obtenir des produits avec une grande pureté après clivage car la plupart des impuretés et sous-produits sont éliminés lors des lavages successifs.

L'utilisation de dihydroquinolinones comme peptidomimétiques rigidifiés de la phénylalanine ou encore d'indolines pour imiter une proline pouvant induire un β -turn dans des chaînes peptidiques peut présenter un intérêt certain pour accéder à de nouveaux dérivés. Nous avons ainsi essayé de transférer les conditions mises au point en phase liquide sur phase solide.

Le transfert d'une réaction pallado-catalysée sur phase solide impose certaines contraintes liées aux lavages par filtration. Il est en effet nécessaire de travailler avec des réactifs solubles, ce qui n'est pas le cas des bases inorganiques pouvant être utilisées pour la réaction de Buchwald-Hartwig. Des questions de dilutions se posent également puisque les quantités utilisées sur support solide sont largement réduites par rapport à la phase liquide, il est donc nécessaire d'adapter la quantité de catalyseur utilisée.

3.1. Première mise au point

Nous avons réalisé les premiers essais sur un peptide modèle Ac-SF(Br)V-Rink **108**. Cette séquence a été choisie pour mimer la présence de chaînes latérales fonctionnalisées encombrantes autour de la 2-

bromophénylalanine. L'objectif était de pouvoir faire une cyclisation de type C6 avec un carbone chiral sur l'azote endocyclique.

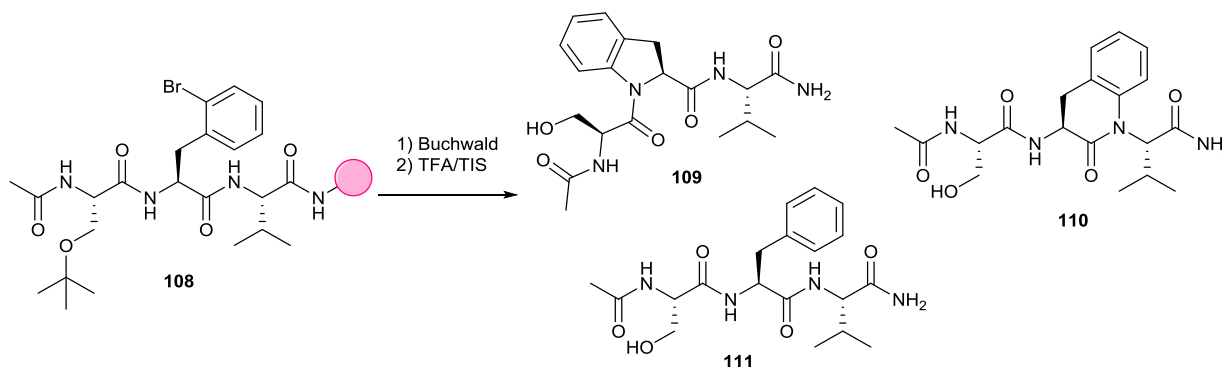
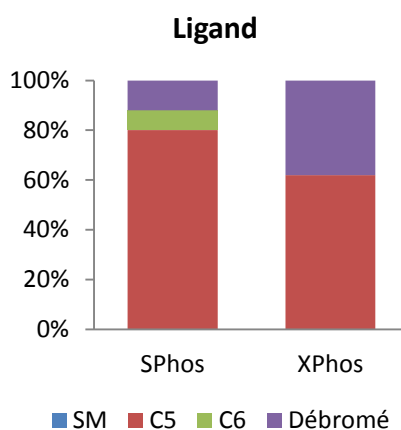


Figure 81 : Schéma de la cyclisation du peptide Ac-SF(Br)V-Rink

La réaction s'effectue en deux étapes après la synthèse du peptide dans son intégralité. La première étape est la cyclisation par réaction de Buchwald suivi dans un deuxième temps du clivage de la résine et de la déprotection des groupements fonctionnels par le TFA en présence de Triisopropylsilane (TIS). Le TIS est un scavenger des carbocations issus de la déprotection des groupements *tert*-butyle protégeant les alcools et son utilisation limite l'apparition de réactions secondaire de *tert*-butylation durant l'étape de clivage et déprotection au TFA.

Nous avons utilisé une nouvelle base non décrite pour la réaction de Buchwald, ni en phase liquide, ni en phase solide : le BTPP (voir Partie D -2.2.). Il s'agit d'une base organique liquide qui facilite l'utilisation en phase solide puisqu'elle peut être filtrée lors des lavages successifs. Grâce à l'utilisation de cette base, nous avons réussi à observer la formation, en petite quantité, du C6 (**110**) avec un carbone chiral sur l'azote endocyclique. De par la géométrie de la chaîne peptidique, cette réaction n'est clairement pas favorisée mais elle reste mécanistiquement réalisable.



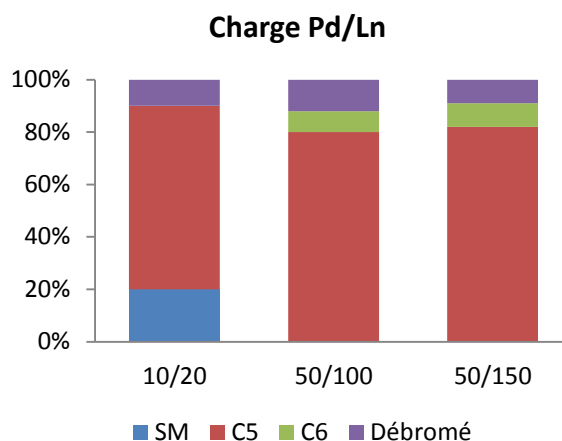
Conditions : Ac-SF(Br)V-NH₂, Pd₂(dba)₃ 50 mol%, Ln 100mol%, BTPP 3 eq, Dioxane, 120°C, 5h. Rendements estimés par HPLC

Figure 82 : Essais comparés avec le XPhos et le SPhos

L'utilisation du SPhos sur phase solide permet d'obtenir près de 80% de C5 (**109**), moins de 10% de C6 (**110**) et 12% de produit débromé (**111**). Ce produit débromé provient d'une réaction secondaire de déhalogénéation décrite par Buchwald qui apparaît lorsque l'amine n'arrive pas à s'insérer sur le

complexe Pd(Ar)(Ln)X, le Pd(Ln)X est alors éliminé et remplacé par un hydrogène.²²² Sur phase solide, le XPhos ne permet pas d'obtenir du C6 et semble favoriser la survenue de cette réaction secondaire. On peut penser que le XPhos favorise la formation du C6, mais la rigidité de la chaîne peptidique limite l'accès à l'amine, entraînant la formation de la réaction secondaire de déhalogénéation et favorise ainsi la formation du produit débromé (Figure 82).

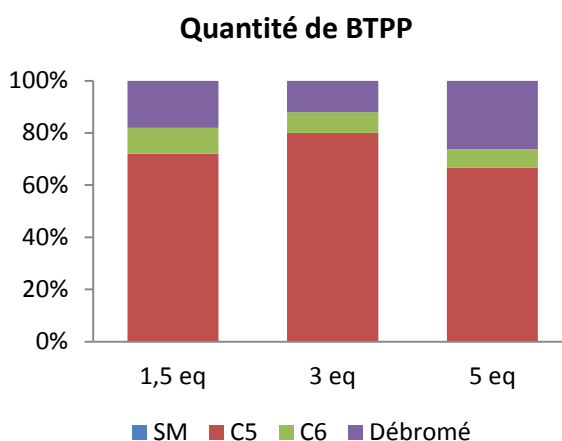
Les réactions pallado-catalysées sur phase solide nécessitent de plus grandes quantités de catalyseurs du fait de la très grande dilution. L'utilisation de 10mol% de Pd₂(dba)₃ avec 20mol% de SPhos ne permet pas de terminer la réaction en 5h à 120°C tandis qu'une charge de 50/100 mol% permet de terminer la réaction (Figure 83).



Conditions : Ac-SF(Br)V-NH₂, Pd₂(dba)₃, SPhos, BTTP 3 eq, Dioxane, 120°C, 5h. Rendements estimés par HPLC

Figure 83 : Essais comparés de charge de Pd/Ln

L'augmentation de la quantité de ligand n'a pas d'effet sur le déroulement de la réaction. Cette « grande quantité » de catalyseur est à comparer avec le poids de la résine, en effet, une charge de 50/100mol% correspond à environ 4 mg de Pd₂(dba)₃ pour 20 mg de résine fonctionnalisée.

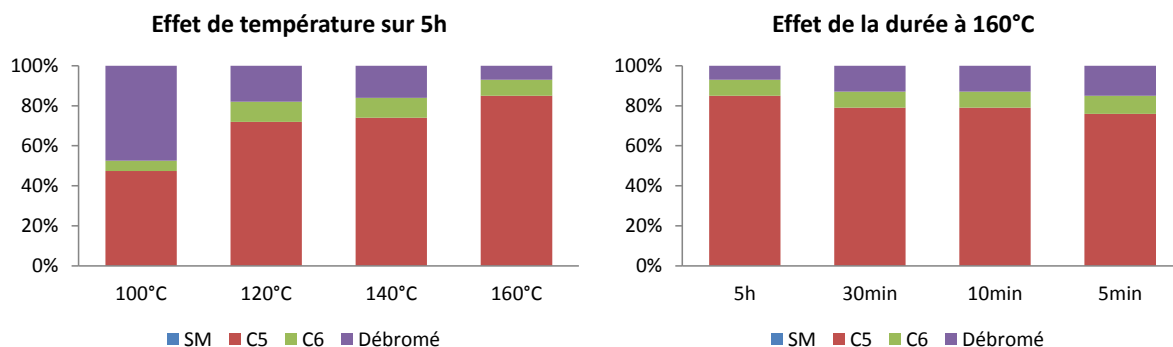


Conditions : Ac-SF(Br)V-NH₂, Pd₂(dba)₃ 50mol%, SPhos 100mol%, BTTP, Dioxane, 120°C, 5h. Rendements estimés par HPLC

Figure 84 : Essais comparés sur la quantité de base

Du fait du grand nombre de fonctions amides présentes sur cette résine Rink-Polystyrène fonctionnalisée, il aurait été possible qu'une partie de la base utilisée soit neutralisée. L'augmentation de la quantité de base augmente l'apparition du produit débromé (Figure 84).

La diminution de la température entraîne une diminution de la quantité de C5 récupérée au bénéfice du produit débromé tandis qu'une augmentation de cette température jusqu'à 160°C induit une diminution de la réaction secondaire au profit de la formation de la cyclisation en C5. La quantité de C6 observée reste stable malgré ces variations (Figure 85).



Conditions : Ac-SF(Br)V-NH₂, Pd₂(dba)₃ 50mol%, SPhos 100mol%, BTTP 1.5 eq, Dioxane. Rendements estimés par HPLC

Figure 85 : Essais comparés sur la température et la durée

A 160°C, la durée de la réaction peut être réduite jusqu'à 5 minutes sans modifier la proportion des produits formés. Après précipitation dans l'éther, le chromatogramme HPLC est propre et aucune racémisation des produits finaux n'a été observée malgré l'utilisation de températures assez élevées (Figure 86).

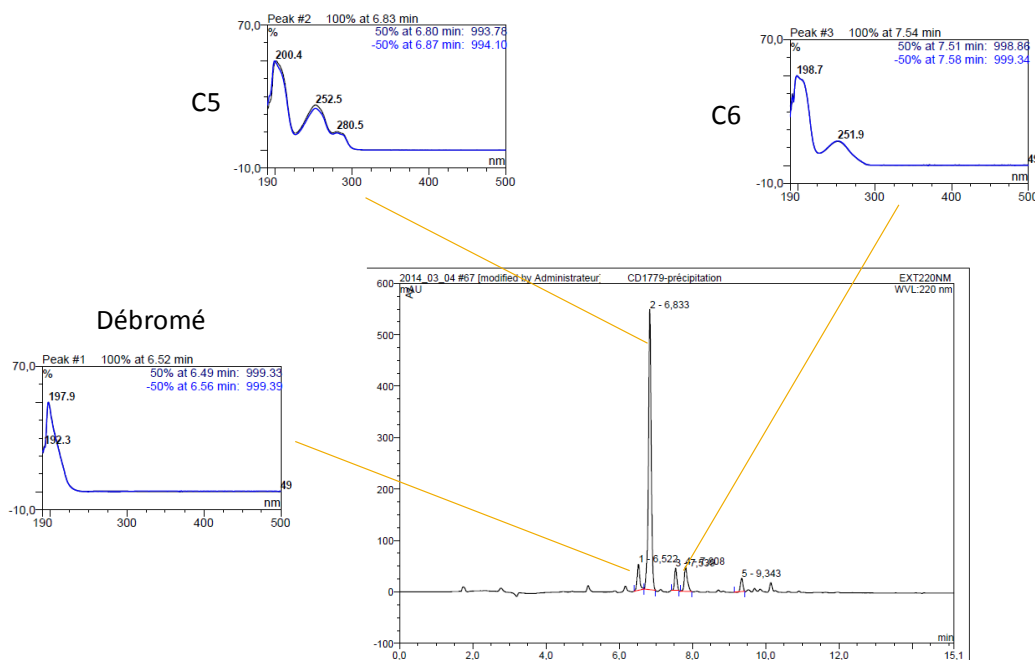
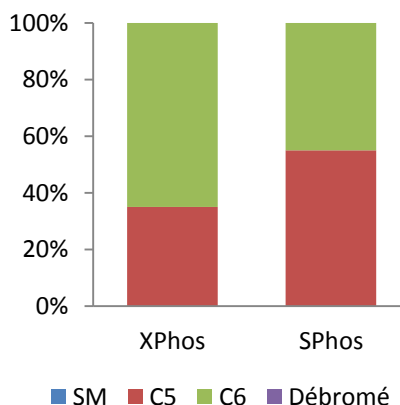


Figure 86 : Après clivage et précipitation à l'éther - Ac-SF(Br)V-NH₂

Dans la plupart des conditions testées, le C5 est largement favorisé sur ce substrat Ac-SF(Br)V-NH₂ **108** et la formation du C6 est aussi possible mais largement défavorisée par la présence d'une chaîne latérale isopropyle sur l'acide aminé en position C-terminale par rapport à la 2-bromophénylalanine.

Afin de vérifier que cette régiosélectivité était bien due à la présence de la valine, nous avons testé la cyclisation d'un hexapeptide ne présentant pas d'encombrement stérique sur les acides-aminés entourant la 2-bromophénylalanine : GSGF(Br)GV-Rink **112** (Figure 87).



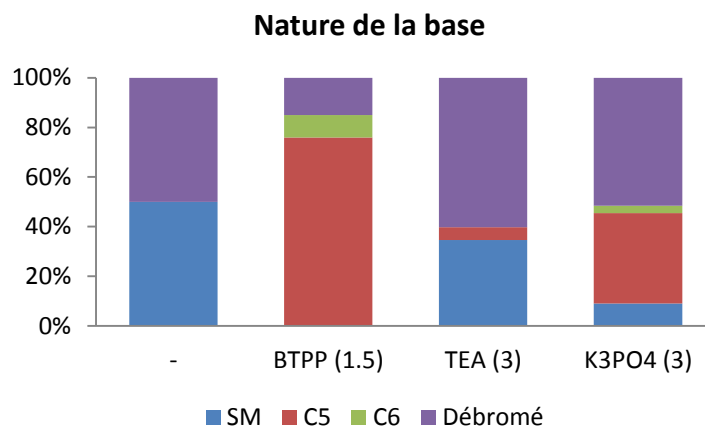
Conditions : GSGF(Br)GV-Rink, 50% Pd₂(dba)₃, 100% Ligand, 1.5eq BTTP, Dioxane, 160°C, 5min. Rendements estimés par HPLC

Figure 87 : Cyclisation de l'hexapeptide GSGF(Br)GV-Rink **112**

Lorsque l'acide aminé en partie C-terminale de la 2-bromophénylalanine ne comporte pas de chaîne latérale, il y a une flexibilité suffisante de la chaîne peptidique pour que la cyclisation en C6 soit favorisée avec l'utilisation du XPhos et ainsi retrouver des résultats comparables avec ceux de la phase liquide. Avec le SPhos, le C5 se trouve même moins favorisé qu'en phase liquide. Aucune trace de débromé n'a été observée, ce résultat peut indiquer que le débromé obtenu dans la cyclisation du peptide Ac-SF(Br)V-Rink **108** pourrait provenir d'une cyclisation en C6 qui n'a pas pu être terminée à cause du manque de flexibilité de la chaîne peptidique dû à la présence de chaînes latérales sur les acides aminés entourant la 2-bromophénylalanine.

Débromation

Nous nous sommes demandé si la réaction de débromation intervenait lors de la montée en température à l'intérieur du tube de réaction, qui peut être assez lente sur plaques chauffantes même préchauffées. L'utilisation d'un chauffage aux micro-ondes pourrait permettre de monter plus rapidement en température mais le milieu réactionnel est très hétérogène et un dépôt de palladium non solubilisé sur les parois du tube peut entraîner son explosion, il n'a donc pas été possible d'explorer cette voie.



Conditions : Ac-SF(Br)V-NH₂, Pd₂(dba)₃ 50mol%, SPhos 100mol%, Base (eq), Dioxane. Rendements estimés par HPLC

Figure 88 : Nature de la base (quantité).

Nous avons voulu tester si l'apparition de ce produit débromé était due à la base utilisée. La réaction lancée sans base génère 50% de produit débromé, ce résultat correspond à la survenue de l'addition oxydante avec tout le palladium mais l'absence de base ne permet pas l'élimination réductrice, entraînant la réaction de déhalogénéation lors du lavage de la résine. L'utilisation de bases trop faibles pour déprotoner l'azote avant l'élimination réductrice induit le même effet. Nous avons voulu diminuer la quantité de produit secondaire en essayant différents paramètres : ordre d'addition des réactifs, type de résine ou humidité présente dans la résine. L'ordre d'addition des réactifs n'a rien changé à la survenue de cette réaction secondaire. Les résines PEG ou polystyrène présentent le même taux de produit débromé après cyclisation, qu'elles soient ou non lyophilisées avant la manipulation. L'origine de ce produit débromé provient sûrement des impuretés pouvant rester à l'intérieur des billes de résine et il est impossible de contrôler cet effet dû à la porosité. On peut aussi penser qu'il peut s'agir du manque de flexibilité imposé par la chaîne peptidique et ne facilite pas l'insertion de l'amide en C-terminal de la 2-bromophénylalanine sur le Palladium, entraînant ainsi la survenue de cette réaction secondaire.

Problèmes de reproductibilité

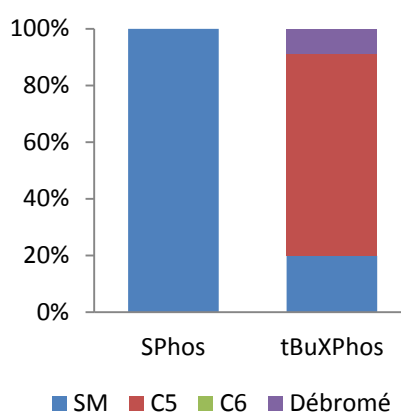
Toutes ces réactions ont été lancées conjointement avec le Dr. Christelle Doebelin jusqu'en juillet 2014 avec des résultats similaires mais nous nous sommes heurtés à des problèmes de reproductibilité lorsque le pot de Pd₂(dba)₃ que nous utilisons a été remplacé par un neuf. Il nous a alors été totalement impossible de reproduire les rendements obtenus lors de la mise au point décrite précédemment. Nous avons relancé la réaction en utilisant un à un tous les pots de Pd₂(dba)₃ que nous avons pu trouver au sein de la faculté de pharmacie, mais aucun d'entre eux ne nous a permis de retrouver les résultats établis avant l'été 2014, pourtant validés par deux personnes différentes. Il existe des publications annonçant que l'espèce catalytique « utile » identifiée dans un pot de Pd₂(dba)₃ pouvait être les nanoparticules de palladium issues de sa solubilisation.²³⁷ Nous avons essayé de reproduire des nanoparticules de différentes sources de palladium²³⁸ mais cela n'a pas fonctionné et l'utilisation d'un produit commercial est au-dessus de nos moyens. Il pourrait également

être possible que les rendements obtenus jusque-là aient pu être dus à une contamination du pot de $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ par un autre métal non identifié. Nous avons alors abandonné ces résultats et tenté de réaliser une autre mise au point.

3.2. Deuxième mise au point

Nous avons donc repris le projet de cyclisation sur phase solide afin de déterminer de nouvelles conditions permettant de terminer la réaction sur le tetrapeptide GSF(Br)V-Rink (**112**). La présence d'une glycine en partie N-terminale permet de faciliter la précipitation du peptide dans l'éther.

Buchwald a décrit que pour certains couplages difficiles il était intéressant d'utiliser le tBuXPhos préactivé à haute température dans un vial à part en présence de Pd(0) et de la base.²³⁹ Ce précatalyseur est ensuite plus actif et permet le couplage avec un plus grand nombre d'amines ou d'amides. Nous avons essayé de préactiver le catalyseur en utilisant le SPhos et le tBuXPhos (Figure 89).

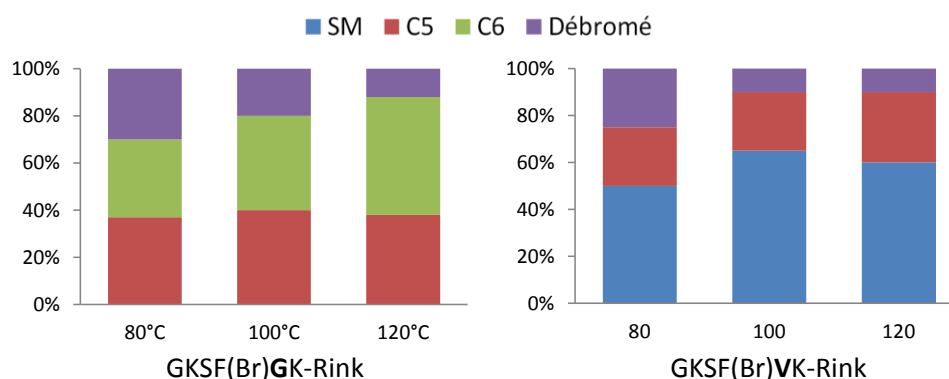


Conditions : GSF(Br)V-Rink 50% $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, 100% Ligand, 1.5eq BTPP, Dioxane, 120°C, 15h. Rendements estimés par HPLC

Figure 89 : Essais de préactivation du catalyseur et cyclisation de GSF(Br)V-Rink 109

La préactivation du SPhos et du $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ n'apporte pas de différence et la réaction ne se fait pas. Lorsqu'on utilise du tBuXPhos, on observe un bon effet de conversion. La reproduction sans préactivation a permis d'obtenir les mêmes résultats, la conversion observée avec le tBuXPhos n'est donc dû qu'à la seule nature du ligand. Cependant, nous n'arrivons pas à observer la formation du C6 avec ces nouvelles conditions catalytiques.

Nous avons observé des problèmes d'agrégation dus à l'hydrophobicité de nos peptides, nous avons donc réalisé la suite des expériences en utilisant des peptides contenant des résidus de lysine afin d'éviter ce phénomène. Afin de vérifier que la cyclisation est bien possible, nous avons étudié les peptides GKSFB(V)K-Rink **113**, encombré, et GKSFB(G)K-Rink **114**, non encombré en C-terminal de la 2-bromophénylalanine.

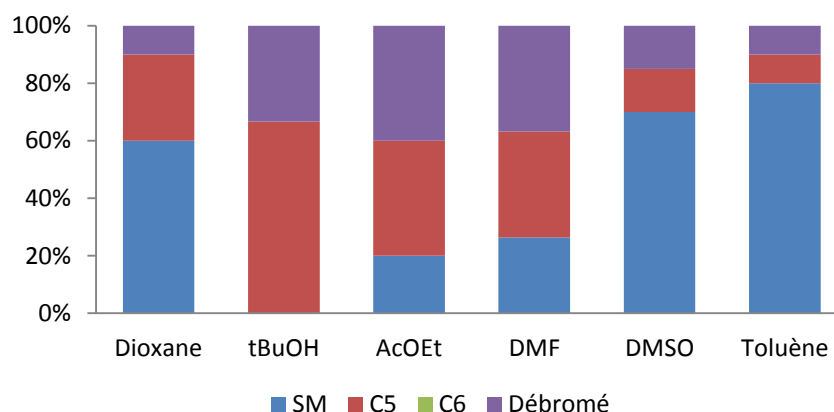


Conditions : Peptide, 50% Pd₂(dba)₃, 100% tBuXPhos, 1.5eq BTTP, Dioxane, T°C, 15h. Rendements estimés par HPLC

Figure 90 : Cyclisation des peptides GKSF(Br)GK-Rink 113 et GKSF(Br)VK-Rink 114

On peut voir à la figure 90 que la cyclisation est largement favorisée par l'absence de chaîne latérale sur l'acide aminé en C-terminal de la 2-bromophényllalanine. La présence de la glycine à droite de la 2-bromophényllalanine favorise la cyclisation du peptide GKSF(Br)GK-Rink **113** en C6 à 120°C et l'utilisation d'une température moins élevée favorise la formation de produit débromé.

Dans le dioxane, quelle que soit la température de réaction, aucune trace du C6 n'a été observée lors de la cyclisation du peptide GKSF(Br)VK-Rink **114**. Le composé C5 est obtenu avec un rendement de 20% et le produit de départ est largement majoritaire. La quantité de produit débromé augmente aussi lorsque la température diminue.



Conditions : GKSF(Br)VK-Rink, 50% Pd₂(dba)₃, 100% tBuXPhos, 1.5eq BTTP, 120°C, 15h. Rendements estimés par HPLC

Figure 91 : Effet du solvant sur la cyclisation du GKSF(Br)VK-Rink 114

Le solvant a un effet sur l'enroulement du peptide GKSF(Br)VK-Rink **114** qui permet de faciliter l'accès du catalyseur au bromure d'aryle, mais il a également un effet sur la formation du produit débromé. Seule l'utilisation de tBuOH à 120°C sur la nuit permet de terminer la réaction mais aucune trace de C6 n'a été observée et la part de produit débromé est très importante.

Ces nouvelles conditions ne nous permettent plus d'observer la formation du C6 ni d'accéder au C5 avec des rendements satisfaisants. Nous n'avons pas réussi à optimiser les conditions permettant de

synthétiser sur support solide une dihydroquinolinone présentant un carbone chiral sur l'azote endocyclique.

Bien que nous n'ayons pas réussi à reproduire les résultats obtenus lors de la première mise au point, il s'agissait tout de même du premier exemple de la faisabilité de ce type de structures. Cette cyclisation observée sur phase solide en utilisant ce pot dégradé de $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ nous fait nous interroger sur la nature de la réaction qui a été mise en jeu, s'agissait-il réellement d'une réaction de Buchwald ? Quelles impuretés ou produits de dégradation présents dans le flacon ont permis cette cyclisation ?

Partie E - Benzodiazépines dans l'inhibition de la PDE5

1. Introduction : généralités sur les Phosphodiesterases

Il existe plus de 12 familles de Phosphodiesterases (PDE) des nucléotides cycliques qui ont comme substrats l'AMPc et le GMPc. Ces derniers sont des messagers intracellulaires impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques et la seule voie physiologique de leur hydrolyse est assurée par les PDE. Selon la famille de PDE impliquée, l'AMPc ou le GMPc sont sélectivement hydrolysés en AMP5' ou GMP5', respectivement. Ces familles sont différenciées par leur structure primaire, leur spécificité au substrat ainsi que leur sensibilité à des modulateurs endogènes ou exogènes.^{240,241} Il existe également des sous-types de chaque famille de PDE mais qui ne seront pas abordés dans ce manuscrit.

Les inhibiteurs des PDE provoquent ainsi une augmentation de la quantité intracellulaire d'AMPc ou de GMPc qui peut agir dans différentes affections telles que les maladies inflammatoires ou auto-immunes.

Les 5 premières familles sont les plus étudiées et leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 25. Il existe de nombreux médicaments ayant l'inhibition des PDE pour mécanisme d'action.^{240,242-247}

Famille	Tissus	Implications pharmacologiques
PDE1	Cerveau, cœur, muscles lisses, testicules	Athérosclérose, cancer, troubles de la mémoire
PDE2	Cerveau, cœur, foie, endothélium, plaquettes	Acné, anti-arythmique, anti-thrombique, anti-tumoral, sédatif
PDE3	Cœur, muscles lisses, foie, adipocytes, plaquettes	Antihypertenseur, anti-thrombique, bronchorelaxant, insuffisance cardiaque.
PDE4	Cerveau, cœur, muscles lisses, poumons, endothélium, cellules inflammatoires	Anti-thrombique, asthme, cancer, dépression, dommages neuronaux, inflammation, ischémie.
PDE5	Poumons, Muscles lisses, corps caverneux, plaquettes	Acné, adhésion plaquettaire, athérosclérose, douleurs neuropathiques, hypertension vasculaire, impuissance.

Tableau 25 : Effets pharmacologiques et répartition tissulaire des cinq premières familles de PDE

En France, il n'existe pas d'inhibiteurs de la PDE1 disponible sur le marché mais la vinpocétine est utilisée dans les médecines alternatives comme agent nootropique. Elle provient de l'hémisynthèse à partir de la vincamine extraite de la petite pervenche (*Vinca minor*). L'inhibition de la PDE1 entraîne une vasodilatation qui améliore le flux sanguin cérébral chez les patient ayant subi un choc ischémique.²⁴⁸

Il n'existe actuellement aucun inhibiteur sélectif de la PDE2 disponible pour une utilisation clinique mais l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs comme l'EHNA a permis d'identifier son rôle dans la régulation des voies de signalisation faisant intervenir l'AMPc ou la GMPc. Plus spécifiquement, elle intervient au niveau des cellules du myocyte ventriculaire, en action conjointe avec la PDE3, pour réguler le courant calcique.²⁴⁹ Au niveau des plaquettes, la régulation du taux de GMPc lié à l'activité de la PDE2 a un effet sur l'agrégation plaquettaire.²⁵⁰ Dans le cerveau, elle est largement surexprimée dans les neurones du cortex cérébral et de l'hippocampe et participe à la régulation du GMPc. L'inhibition de la PDE2 améliore la dépolarisation à long-terme de certains neurones sans affecter la transmission synaptique basale.²⁵¹ Au niveau des cellules endothéliales des capillaires veineux, la PDE2 semble réguler les phénomènes d'extrasation dans les réponses inflammatoires.²⁵²

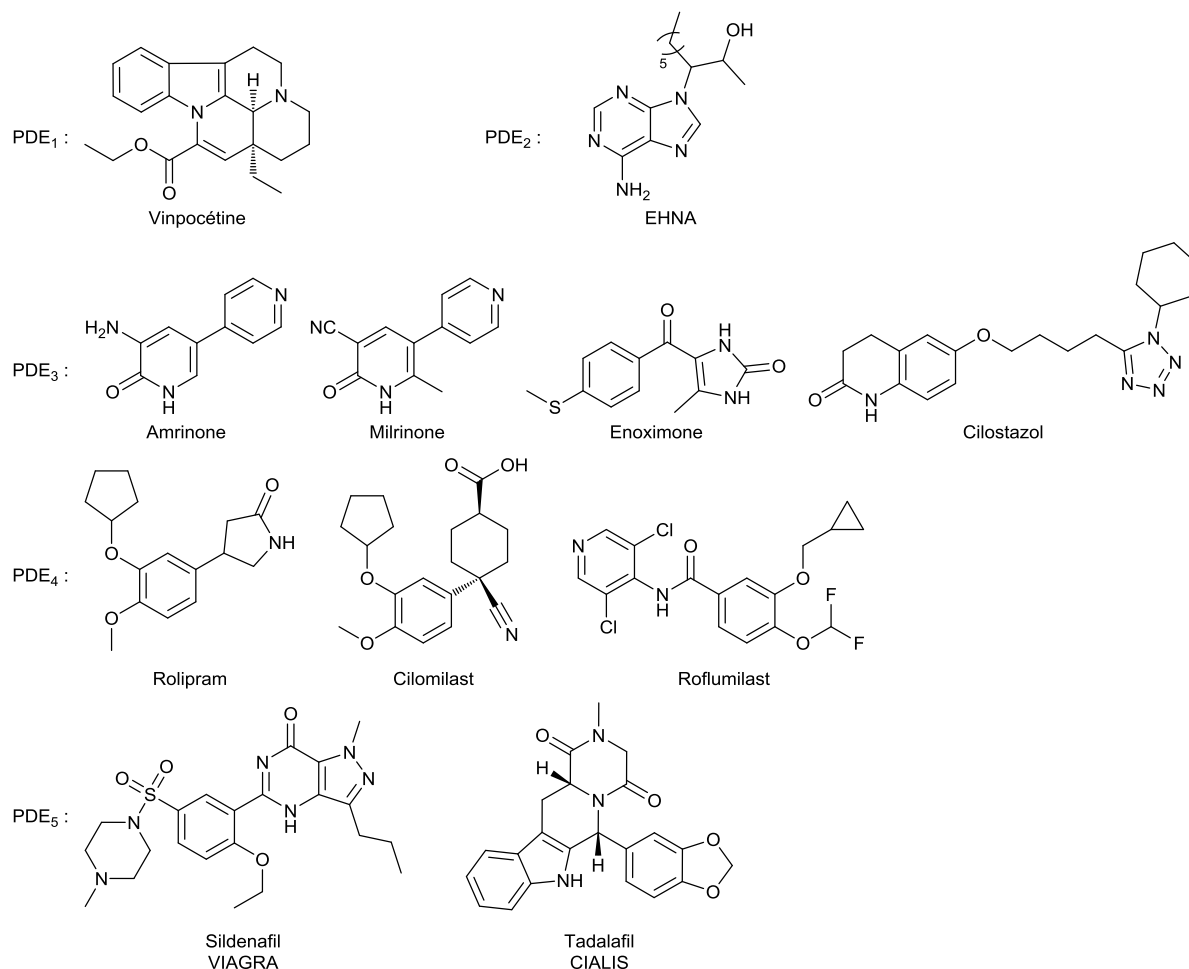


Figure 92 : Inhibiteurs des PDEs

Il existe de nombreux inhibiteurs de la PDE3 pouvant être utilisés dans le traitement de l'insuffisance cardiaque par effet vasodilatateur (Amrinone, Milrinone, Enoximone) ou de la claudication intermittente par un effet vasodilatateur artériel au niveau des membres inférieurs couplé à un effet antiagrégant plaquettaire (Cilostazol, approuvé par la FDA).²⁴¹ La PDE3 est également impliquée dans la maturation des ovocytes et son inhibition entraîne un blocage de l'ovogénèse au stade de vésicule germinative.^{253,254}

La PDE4 a été largement plus étudiée que les autres sous-familles de PDE et l'inhibiteur prototypique rolipram présente un profil pharmacologique intéressant pour le traitement de l'anxiété ou la dépression, la schizophrénie,^{255,256} les maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer²⁵⁷ ou la sclérose en plaque.²⁵⁸ Des recherches sont également en cours pour l'utilisation d'inhibiteurs de la PDE4 dans les maladies inflammatoires comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme ou l'arthrite rhumatoïde.²⁵⁹ Malheureusement, le sous-type PDE4D est exprimé au niveau de l'area postrema et son inhibition entraîne des effets secondaires émétisants qui limitent l'utilisation clinique des inhibiteurs de première génération comme le rolipram. Une nouvelle génération d'inhibiteurs de la PDE4 est en cours de développement pour le traitement de la BPCO (cilomilast et roflumilast) et présentent une affinité réduite pour la PDE4D, diminuant ainsi l'effet émétisant.²⁶⁰

La PDE5 est impliquée dans la régulation de la contraction des muscles lisses par la régulation du GMPc et on la retrouve principalement au niveau du pénis et des poumons. Les inhibiteurs de la PDE5 sont utilisés dans le traitement du dysfonctionnement érectile et des études ont montré un effet dans l'hypertension pulmonaire.^{261,262} Récemment, il a été démontré que des inhibiteurs de la PDE5 avaient aussi des effets sur les douleurs neuropathiques ainsi que sur les résultats cognitifs liés à la maladie d'Alzheimer.^{263,264}

2. Du TSPO aux PDEs

Le laboratoire d'innovation thérapeutique a un long historique dans la synthèse de benzodiazépines comme inhibiteurs des phosphodiesterases. Notre équipe a essayé de développer des inhibiteurs des PDEs 2 et 4 dans le but de traiter les affections psychiatriques comme la schizophrénie, la dépression ou l'anxiété mais se sont heurtés aux problèmes de l'effet émétique. Ils ont travaillé sur des dérivés de 1,4-benzodiazépinones et réalisé des profils de sélectivité de composés de la littérature présentant ce squelette et d'autres dérivés présentant des scaffolds et décorations proches. On peut voir dans le tableau 26 que le Ro5-4864, ligand de référence du TSPO, présente une IC_{50} de 6 μ M pour la PDE5.

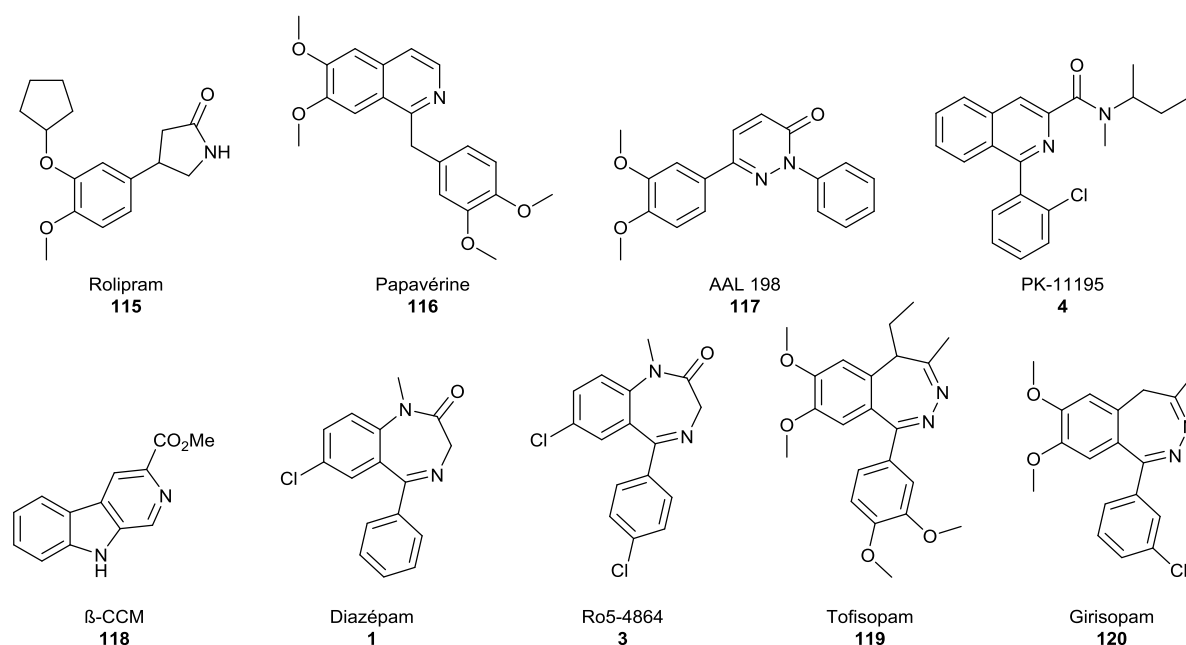


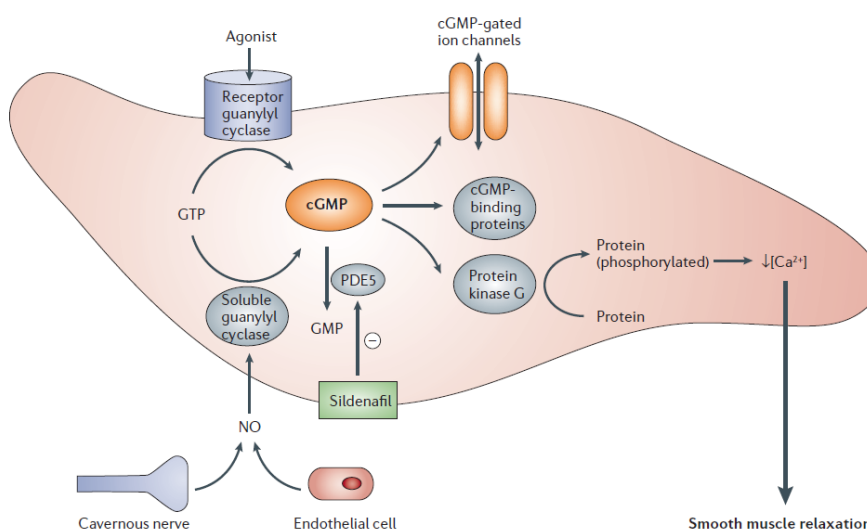
Figure 93 : Composés testés sur les PDEs 2 à 5

Entrée	Composé	Nom	%inhib à 10µM ou IC ₅₀ (µM)			
			PDE2	PDE3	PDE4	PDE5
1	115	Rolipram	ns	ns	1.1	Ns
2	116	Papavérine	5.7	2.7	2.8	9
3	117	AAL 198	ns	15	0.8	40
4	4	PK-11195	106	ns	74	203
5	118	β-CCM	-	-	103	13
6	1	Diazépam	41	ns	14	11
7	3	Ro5-4864	-	ns	13	6
8	119	Tofisopam	0.9	5.9	0.7	37%
9	120	Girisopam	4	22%	3	12

ns : IC₅₀ > 200µM

Tableau 26 : Inhibiteurs de PDE

La PDE5 intervient dans la régulation de la contraction et de la relaxation des muscles lisses au travers de la voie NO/GMPc. Le protoxyde d'azote (NO) sécrété dans l'environnement cellulaire active la guanylate cyclase qui va contribuer à augmenter la concentration intracellulaire en GMPc. Ce dernier va alors activer les canaux ioniques des nucléotides cycliques (CNG) ainsi que la protéine kinase G, qui vont induire une diminution de la concentration intracellulaire en ions Ca²⁺ et provoquer la relaxation du muscle lisse. La PDE5 régule alors cette voie en contrôlant la dégradation du GMPc, et donc sa concentration intracellulaire (Figure 94).²⁶¹ C'est ce mécanisme qui est impliqué dans le traitement des dysfonctionnements érectiles par les inhibiteurs de la PDE5 comme le sildénafil ou le tadalafil.

Figure 94 : Voie de signalisation du NO/GMPc²⁶¹

A la vue de l'affinité du Ro5-4864 et des autres dérivés de benzodiazépines, nous avons décidé de développer, en collaboration avec le Pr. Claire Lugnier, des dérivés de la famille des 1,4- ou 2,3-benzodiazépines comme inhibiteurs de la phosphodiesterase 5 dans le but de traiter les douleurs neuropathiques.

2.1. Analyses et stratégies

En observant le tableau 26 on peut extraire un motif général des composés capables de bloquer l'activité enzymatique des PDE (représenté en figure 95).

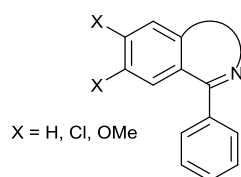


Figure 95 : Motif 121

En se basant sur cette observation, nous avons modifié les décorations et le squelette du Ro5-4864 comme présenté à la figure 96. On peut déterminer 4 zones à étudier :

- La partie « Nord » de la molécule, avec différentes alkylations en position 1
- La partie « Est » peut être explorée avec différentes décorations sur le carbone 3 hybridé sp^3 afin de tester l'effet d'un encombrement sur cette position ou le changement de scaffold vers des 2,3-benzodiazépines

Les parties « Sud » et « Ouest » ont été explorées avec des substitutions des positions aromatiques.

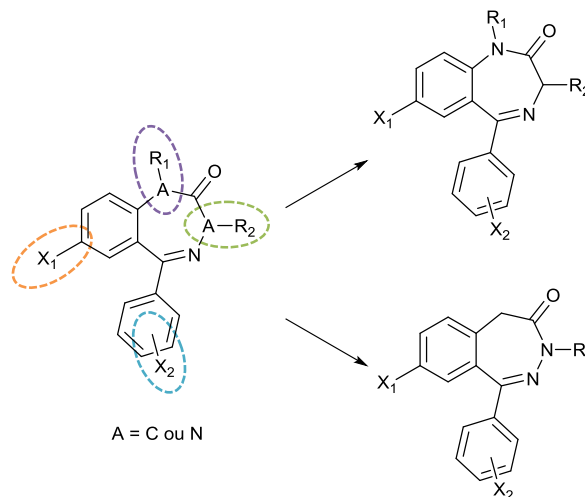


Figure 96 : Modifications effectuées autour du Ro5-4864

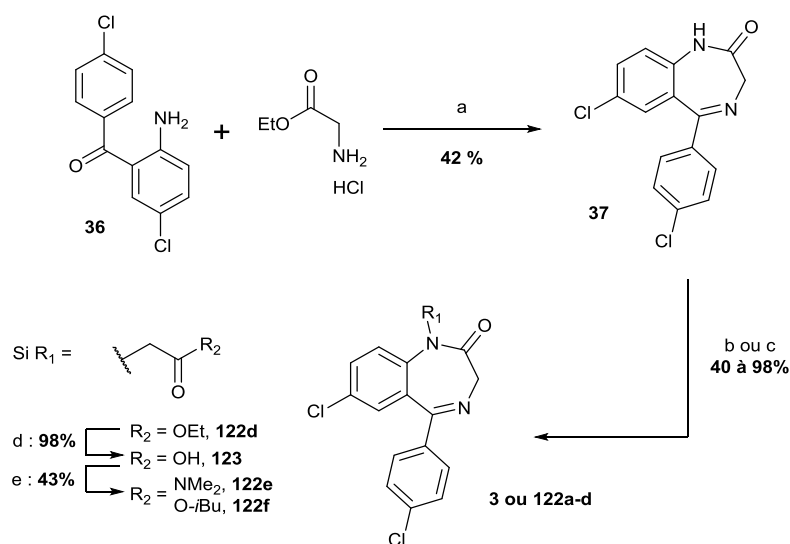
2.2. Modifications sur les 1,4-Benzodiazépin-2-ones

Les voies de synthèse de dérivés des 1,4-benzodiazépin-2-ones sont largement décrites dans la littérature et dans d'anciens travaux du laboratoire. Nous nous sommes inspirés des travaux de thèse du Dr. Christophe Salomé pour accéder à ces composés.²⁶⁵ Nous avons également pu accéder à des composés déjà présents dans la chimiothèque interne au laboratoire.

2.2.1. Méthodes générales de synthèse

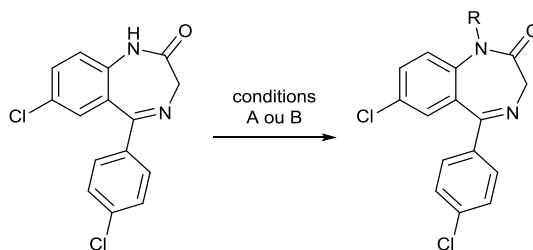
2.2.1.1. Exploration des substituants en position 1 (Nord)

Pour étudier l'effet d'une substitution du Ro5-4864 en position 1, il est possible d'accéder aux 1,4-benzodiazépines par la condensation de la 2-amino-4',5-dichlorobenzophénone **36** avec le glycinate d'éthyle (Figure 97).



Conditions : (a) pyridine, 116°C, 15h; (b) NaH, R₁X, DMF, 0°C à ta, 1 à 12h; (c) NaOH, R₁X, Aliquat 336, toluène, 25 à 80°C, 48h; (d) NaOH, Ethanol/Eau, 2h, ta; (e) Chloroformate d'isobutyle, diméthylamine, DIEA ou N-méthylmorpholine, DCM, 2h, 0°C

Figure 97 : Synthèse de composés substitués en position 1



Entrée	Composé	R	Conditions	Rdt
1	3		A	83%
2	122a		A	99%
3	122b		B	37%
4	122c		A	98%
5	122d		A	96%

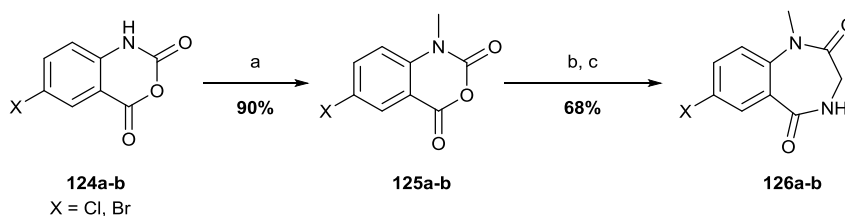
Conditions A : NaH, RX, DMF, 0°C à ta, 2h.

Conditions B : NaOH, RX, Aliquat 336, toluène, 25 à 80°C, 16h.

Tableau 27 : Différentes méthodes d'alkylation de l'amide

Pour des halogénures d'alkyls suffisamment électrophiles, la réaction d'alkylation s'effectue facilement avec des conditions classiques mettant en œuvre l'hydrure de sodium. Pour les halogénures moins réactifs comme le bromure d'isobutyle, nous avons utilisé une méthode alternative d'alkylation en milieu biphasique avec de la soude et permettant de pallier au manque de réactivité de cet halogénure (Tableau 27).²⁶⁶

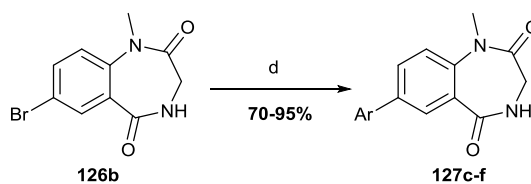
2.2.1.2. Exploration des substituants en position Sud et Ouest



(a) NaH, MeI, DMF, 0 à 25°C, 12h; (b) Glycinate d'éthyle HCl, Pyridine, reflux, 4h; (c) AcOH, 130°C, 12h

Figure 98 : Synthèse du scaffold 1,4-benzodiazépin-2-ones

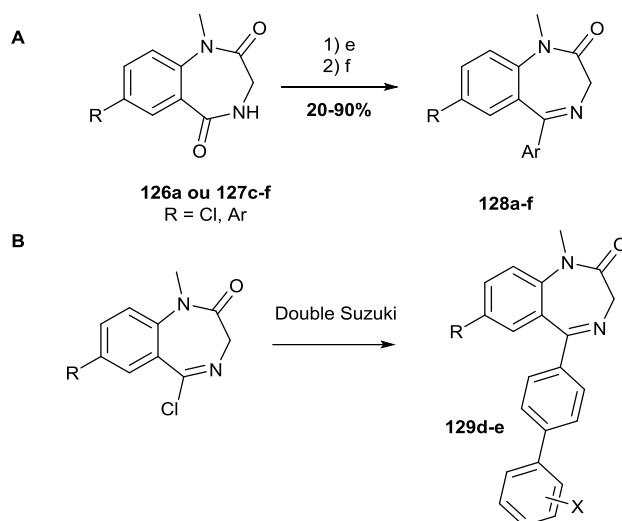
La synthèse des 1,4-benzodiazépin-2-ones présentant un groupement méthyle en position 1 débute par l'alkylation de l'anhydride isatoïque **124** à l'aide de l'iodure de méthyle en présence d'hydrure de sodium. Après cette alkylation, le scaffold 1,4-benzodiazépinone **126** est constitué par la condensation du glycinate d'éthyle en présence de pyridine, suivie par une cyclisation dans l'acide acétique. Cette méthode permet d'alkyler facilement l'azote en position 1 et ne présente qu'un faible nombre d'étapes pour accéder au squelette 1,4-benzodiazépin-2,5-dione **126**.



(d) ArB(OH)₂, Na₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, Toluène/Ethanol/Eau, 100°C, 2h.

Figure 99 : Insertion de décorations en partie ouest

Selon les substitutions souhaitées, il est possible de réaliser une réaction de Suzuki sur l'atome de brome présent en position 7 du composé **126b**. Selon l'acide boronique utilisé, on peut insérer différents substituants comme des phényles diversement substitués. La convergence de cette synthèse permet une exploration facile de dérivés substitués en position 5 mais ne facilite pas l'accès à des bibliothèques de composés dérivés en position 1 et en position 3.

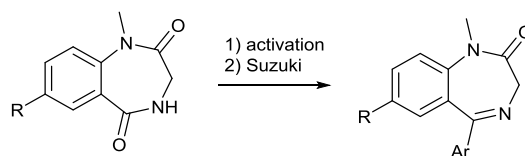


(e) POCl_3 , DMA, Toluène, 90°C , 2h; (f) ArB(OH)_2 , K_2CO_3 , Pd(OAc)_2 , SPhos, Toluène, 100°C , mw, 15min

Figure 100 : Insertion d'une plateforme aromatique en position 5

L'activation de la fonction amide en position 5 de **126** ou **127** est réalisée par la formation d'un iminochlorure sous action du POCl_3 dans le toluène à chaud.²⁶⁷ Il peut servir de substrat à la réaction de Suzuki qui permet d'insérer différents groupements phényles substitués au niveau de la position 5 comme le Ro5-4864 ou le Diazépam (Figure 100, **A**). Selon les décorations présentes en position 7, l'iminochlorure formé est plus ou moins stable et l'utilisation de conditions classiques de Suzuki (ArB(OH)_2 , Na_2CO_3 , $\text{Pd(PPh}_3)_4$, Toluène/Ethanol/Eau, 100°C , 2h) mène toujours à l'hydrolyse de l'iminochlorure en amide à cause de la présence d'eau. Pour limiter cette hydrolyse, nous avons utilisé des conditions anhydres avec chauffage aux micro-ondes (ArB(OH)_2 , K_2CO_3 , Pd(OAc)_2 , SPhos, Toluène, 100°C , mw, 15min) et obtenu des rendements plus ou moins bons selon la décoration en position 7. Les mauvais rendements correspondent à l'hydrolyse de l'iminochlorure avant la réaction aux micro-ondes (Tableau 28).

Lors de ce couplage de Suzuki avec les acides 4-chlorophénylboroniques, le chlore présent sur l'aromatique couplé réagit avec un second acide boronique pour conduire aux dérivés biaryles présentés en figure 100, **B**.



Entrée	Composé	R	Ar	Rendement
1	128a	Cl		46%
2	128b	Cl		22%
3	128c			19%
4	128d			5%
5	128e			32%
6	128f			11%

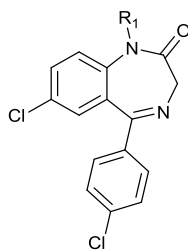
1) POCl₃, DMA, Toluène, 90°C, 2h; 2) ArB(OH)₂, K₂CO₃, Pd(OAc)₂, SPhos, Toluène, 100°C, mw, 15min

Tableau 28 : Rendements obtenus lors de l'activation en iminochlorure puis couplage de Suzuki

Grace à ces synthèses décrites en 2.2.1.1. et aux composés déjà présents dans la chimiothèque du laboratoire, nous avons pu étudier l'effet des différentes substitutions sur l'inhibition de l'activité enzymatique de la PDE5 afin d'établir une étude des relations structures activités des benzodiazépines avec la PDE5.

2.2.2. Résultats

La mesure de l'activité des composés a été effectuée dans le laboratoire du Pr. Claire Lugnier. Il s'agit d'un test d'inhibition enzymatique dont le substrat est le [³H]GMPC. La dégradation est quantifiée en présence d'un inhibiteur et comparée par rapport au véhicule. On obtient des résultats exprimés en pourcentage d'inhibition à 10 μM et, lorsque le composé est plus puissant, une IC₅₀ est déterminé par la mesure de l'inhibition à 9 concentrations différentes. La courbe issue de ces résultats permet de déterminer une IC₅₀ du composé pour la PDE5.

Exploration de la partie « Nord »

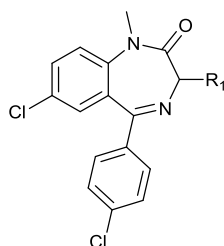
Entrée	Composé	R ₁	%inhib à 10 μM ou IC ₅₀
1	3	Me	4,7 μM
2	37	H	19,8 μM
3	122a		14%
4	122b		17%
5	122c		13%
6	122e		0%
7	122f		15%

Tableau 29 : Effets des substitutions en position 1

Nous avons débuté cette exploration en mesurant l'effet de différentes substitutions en position 1 sur le Ro5-4864. Nous avons essayé des dérivés présentant des groupements aromatiques, alkyl, accepteurs donneurs de liaisons H ou seulement accepteurs de liaisons H. La place disponible au niveau de la partie nord semble limitée puisque seule la présence d'un méthyle (Ro5-4864) en position 1 permet d'inhiber la PDE5, les autres substitutions entraînant une perte d'activité (Tableau 29). Comme la présence d'aucun autre groupement n'a montré une meilleure activité, nous conserverons la présence d'un méthyl en position 1 pour la suite de l'étude des relations Structure-Activité.

Exploration de la partie « Est »

Nous avons continué l'exploration topologique en testant l'ajout un groupement encombrant en position 3. Nous avons trouvé dans la chimiothèque deux dérivés du Ro5-4864 substitués en position 3 par un groupement méthyle ou un groupement benzyle. L'ajout d'un groupement méthyle permet un gain d'activité d'un facteur 3, mais l'espace disponible semble limité puisque l'ajout d'un benzyle fait chuter l'activité (Tableau 30).



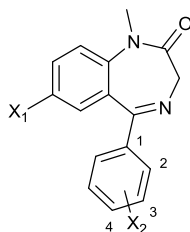
Entrée	Composé	R ₁	%inhib à 10 μM ou IC ₅₀
1	3	H	4,7 μM
2	130	Me	1,5 μM
3	131	Bn	28%

Tableau 30 : Effet de la substitution en position 3 du Ro5-4864

Nous n'avons testé cette substitution qu'avec des composés racémiques mais il pourrait être intéressant d'étudier l'inhibition de chaque énantiomère.

Exploration des parties « sud et ouest »

Nous avons réalisé différentes substitutions au niveau des atomes de chlores sur le cycle en position 4 et en position 7 (Tableau 31).



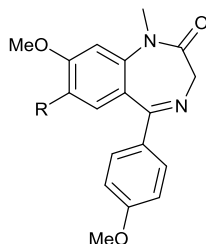
Entrée	Composé	Nom	X ₁	X ₂	%inhib à 10 μM ou IC ₅₀
1	132	Ro5-3464	H	H	13%
2	133	-	H	3'-Cl	24-29%
3	134	Ro5-5115	H	4'-Cl	38%
4	1	Diazépam	Cl	H	28%
5	3	Ro5-4864	Cl	4'-Cl	4,7 μM
6	128a	-	Cl	3'-Cl	7.1 μM
7	128b	-	Cl	3',4'-diCl	0.72 μM
8	135	-	H	3'-OMe	2%
9	136	Nitrazépam	NO ₂	H	29%

Tableau 31 : Exploration des positions 5 et 7

On observe un effet additif des atomes de chlore : l'inhibition passe de 13 % à 10 μM pour le Ro5-3464 (**132**, entrée 1) à 38% et 28% lorsqu'il est substitué par un chlore en position 4' et 7, respectivement (**134**, **1**, entrées 3 et 4). Le Ro5-4864 présente ces deux substitutions et une IC₅₀ de 4.7 μM, on a bien un effet additif des atomes de chlore. Le déplacement de l'atome de chlore de la position 4' à la position 3' entraîne une légère baisse d'activité (**3**, **128a**, entrées 5 et 6), mais la présence des 2 chlores en 3' et 4' permet un gain significatif avec une IC₅₀ de 0.72 μM, confirmant l'effet additif des chlores (**128b**, entrée 7). Par contre, l'insertion, sur l'aromatique en position 5, d'un groupement accepteur de liaison H comme un méthoxy en 3', engendre une perte totale d'activité (**135**, entrée 8).

Par conséquent, on peut imaginer que les interactions obtenues avec le cycle aromatique en position 5 sont majoritairement de type hydrophobe.

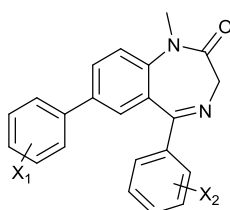
D'anciens travaux du laboratoire ont montré que l'addition d'une décoration de type méthoxyphényle en position 7 permet de gagner en affinité d'une manière non sélective (Tableau 32).



Entrée	Composé	R	IC ₅₀ (μM)				
			PDE 1	PDE 2	PDE 3	PDE 4	PDE 5
1	137	MeO-	>100	7.8	>100	10	>100
2	138		10	0,5	>>100	7	3
3	139		8	0,017	>>100	5	5

Tableau 32 : Gain d'affinité non sélective par addition de fonction méthoxy sur l'aromatique en 7.

Pour valider ce potentiel effet bénéfique, nous avons inséré une plateforme aromatique en position 7, décorée de groupements méthoxys à différentes positions.



Entrée	Composé	X ₁	X ₂	IC ₅₀ (μM)
1	128c	o-OMe	4'-Cl	5.87
2	128d	m-OMe	4'-Cl	6.49
3	128e	p-OMe	4'-Cl	8.4
4	128f	o,o'-diOMe	4'-Cl	0.56
5	129e	p-OMe	4'-(p-ClPh)	0.87
6	129d	m-OMe	4'-(p-ClPh)	0.45

Tableau 33 : Effet des décorations sur l'aromatique en positions 7 et 4

Lorsque le groupement méthoxy se trouve en position *ortho* de l'aromatique en position 7, on observe une activité comparable à celle du Ro5-4864 (**128c**, entrée 1). Les positions 3 et 4 ne sont pas plus favorables à l'insertion d'un groupement accepteur de liaison H (**128d**, **128e**, entrées 2 et 3). Par contre, on observe un effet additif des méthoxy et lorsqu'ils sont présents en positions *ortho*, *ortho*' de l'aromatique en position 7, le composé **128f** a une IC₅₀ de 0.56 μM (entrée 4).

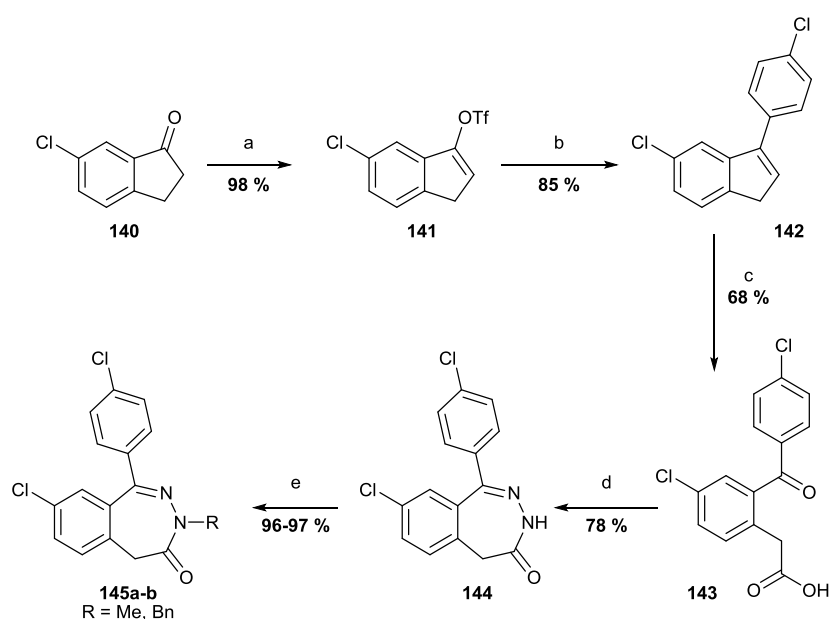
Les produits secondaires issus de la double Suzuki ont aussi été testés pour leur capacité à inhiber la PDE5. Les composés **129e** et **129f** présentent une activité inhibitrice submicromolaire (entrées 5 et 6).

Ces résultats montrent la présence au niveau du site actif de PDE5 de grandes poches plutôt hydrophobes, capables d'interagir avec les systèmes polyaromatiques très encombrés dans les zones sud et ouest de la benzodiazépinone.

2.3. 2,3-benzodiazépin-4-ones

2.3.1. Synthèses

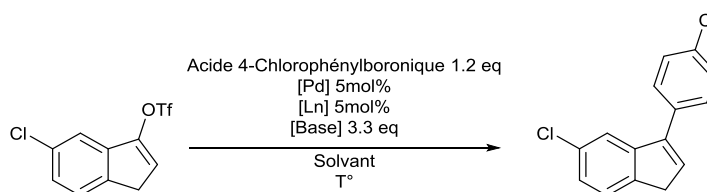
Si les 1,4-benzodiazépines ont été énormément développées depuis les années 60, la synthèse des 2,3-benzodiazépines n'a été décrite que récemment par le Dr. Malik Hellal au sein de notre laboratoire.^{268,269} Les 2,3-benzodiazépines présentent l'intérêt d'avoir un azote en position du 3 du cycle à 7, ce qui permet d'explorer plus facilement cette position en comparaison avec 1,4-benzodiazépines.



(a) Tf_2O , 2,6-ditertbutylpyridine, DCM, ta, 20min; (b) acide 4-chlorophénylboronique, Na_2CO_3 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Toluène/Ethanol/Eau, 100°C , 14h; (c) $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, H_2SO_4 , Acétone, Eau, 0°C à ta, 5h; (d) Hydrazine, nBuOH, 130°C , 48h; (e) NaH, RX, THF, 0°C à ta, 15h.

Figure 101 : Synthèse des 2,3-benzodiazépin-4-ones

La synthèse des 2,3-benzodiazépinones commence par l'activation de la fonction cétone du 6-chloroindan-1-one **140** par l'anhydride triflique pour former un éther d'énol triflique **141** suffisamment stable pour être purifié par chromatographie. Un couplage de Suzuki avec l'acide 4-chlorophénylboronique permet ensuite de générer l'indène **142**. Les conditions décrites par Malik Hellal ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, PCy_3 , KF dans le THF à 100°C) ont conduit à une polysubstitution par manque de sélectivité entre le triflate et le chlore et résultant en une dégradation du produit de départ en multiples produits. Les conditions réactionnelles de ce couplage de Suzuki a donc nécessités une mise au point décrite dans le tableau 34.

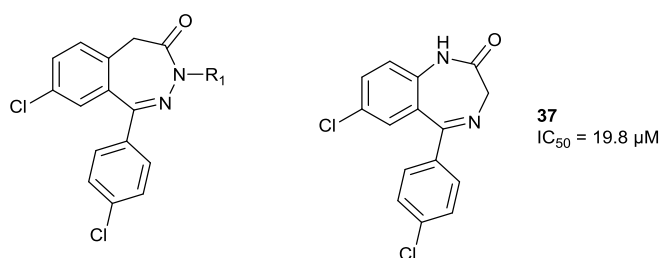


Entrée	Palladium	Ligand	Base	Solvant	Temp.	Durée	142	Observations
1	Pd ₂ (dba) ₃	PCy ₃	KF	THF	100°C	1 nuit	0%	Dégradation
2	Pd(OAc) ₂	PCy ₃	KF	THF	100°C	1 nuit	0%	Dégradation
3	Pd(OAc) ₂	PCy ₃	KF	THF	ta	24h	0%	Dégradation
4	Pd(OAc) ₂	PPh ₃	KF	THF	ta	24h	0%	Dégradation
5	Pd(PPh ₃) ₄	/	K ₃ PO ₄	THF	ta	24h	0%	Dégradation
6	Pd(PPh ₃) ₄	/	Na ₂ CO ₃	Tol/EtOH/H ₂ O (5/1/1)	100°C	1 nuit	85%	/

Tableau 34 : Mise au point des conditions réactionnelles pour la Suzuki sur l'énol triflique 141

Le groupement triflate est souvent sensible au milieu aqueux, mais dans notre cas, c'est finalement l'utilisation d'un mélange toluène, d'éthanol et d'eau en présence de palladium tétrakis à 100°C qui a permis la formation de l'indène **142** avec un bon rendement de 85%. Ce dernier est ensuite engagé dans un clivage oxydatif au dichromate de sodium pour donner l'acide δ-cétonique **143**.²⁷⁰ La condensation avec l'hydrazine conduit au squelette de 2,3-benzodiazépin-4-ones **144**. L'azote 3 est ensuite alkylé dans des conditions classiques avec du bromure de benzyle ou de l'iodure de méthyle en présence d'hydrure de sodium pour accéder aux 2,3-benzodiazépin-4-ones fonctionnalisées **145a-b** (Figure 101).

2.3.2. Résultats des 2,3-benzodiazépin-4-ones



Entrée	Composé	R ₁	%inhib à 10 μM
1	144	H	32%
2	145a	Me	50%
3	145b	Bn	40%

Tableau 35 : Effet de la substitution en position 3

Le composé **144** est moins actif que le Ro5-4864, mais semble similaire au dérivé desméthyl du Ro5-4864 (**37**, IC₅₀ = 19.8 μM). On observe également que la présence d'un groupement méthyle en position 3 est légèrement favorable à l'activité (**145a**, entrée 2), comme observé avec le scaffold 1,4-benzodiazépinone. Le remplacement du méthyle par un benzyle n'améliore pas l'activité (**145b**, entrée 3).

La superposition des structures cristallographiques du Ro5-4864 **3** avec la 2,3-benzodiazépinone simple **146** permet de confirmer la similarité du positionnement des deux châssis moléculaire et la même orientation de l'imine comme accepteur de liaisons H, confirmant ainsi la pertinence du remplacement du châssis 1,4-benzodiazépinone par une 2,3-benzodiazépinone

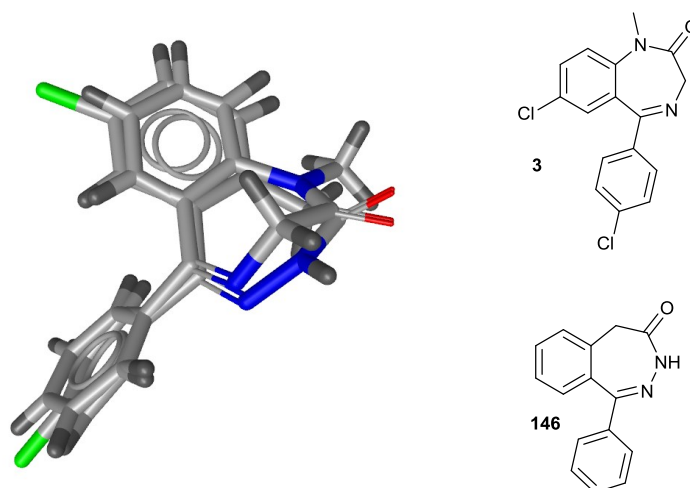


Figure 102 : Alignement 3D des dérivés **3** et **146**

Afin de peut-être gagner en affinité, il serait intéressant de synthétiser le dérivé méthyle en position 9 ou des composés basés sur le châssis 1,3-diméthyl-1,3,4-benzotriazépin-2-one.

2.4. Conclusion sur la RSA autour du Ro5-4864

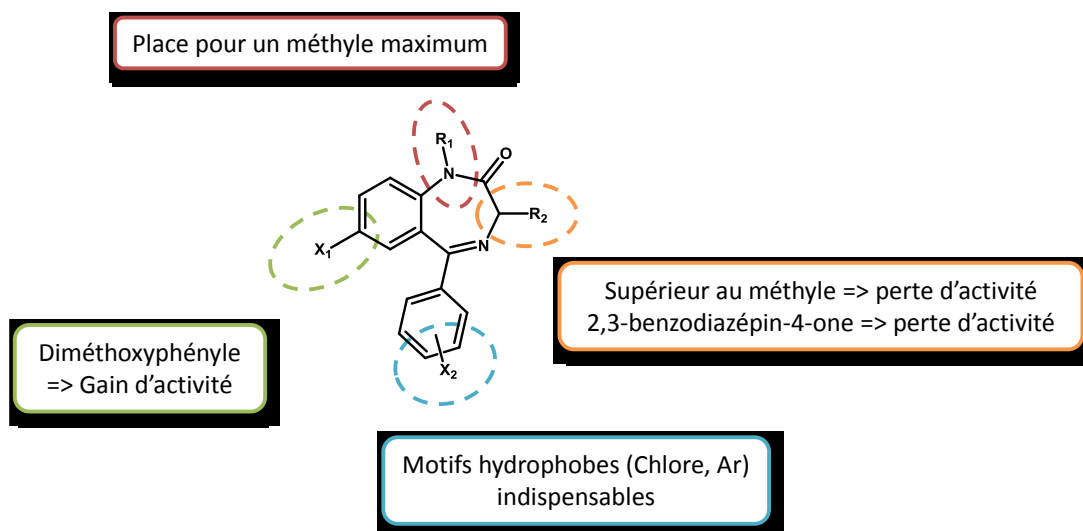


Figure 103 : Schéma récapitulatif de l'inhibition de la PDE 5 par les 1,4 benzodiazépin-2-ones

Les différentes conclusions que l'on peut tirer de l'étude de relations structures-activité sont résumées dans la figure 103. Pour aller au bout de ces effets additifs, il serait intéressant de synthétiser et tester le dérivé incluant le motif 3',4'-dichlorophényle en position 5, le motif o,o'-diméthoxyphényle en position 7, ainsi que l'insertion d'un méthyle en position 3, et dont la configuration optimale reste à déterminer.

Il faut cependant noter que cette RSA nous a conduits à introduire de nombreux motifs hydrophobes, altérant fortement les critères de « druggabilité » de ces composés, notamment la solubilité. Ces composés restent néanmoins des outils pharmacologiques d'intérêt, notamment pour évaluer leur sélectivité vis-à-vis des autres PDEs.

Partie F - Zolpidem et fluorophore

Pour mesurer la constante d'affinité d'un ligand pour une cible donnée, il est souvent nécessaire de recourir à la mesure du déplacement d'un ligand marqué radioactif par un ligand « froid » et cette technique présente plusieurs contraintes. En effet, la manipulation d'éléments radioactifs nécessite une formation appropriée, l'investissement dans des équipements particuliers et un traitement spécifique des déchets. Selon l'élément radioactif incorporé à la molécule à tester, la durée de vie peut être assez courte (^{125}I : 59 jours, ^3H : 12 ans) et la synthèse soumise à des autorisations du CEA. Toutes ces contraintes poussent les industriels à rechercher de nouveaux moyens de test de leurs molécules et certains se spécialisent dans ce genre de prestation.

L'entreprise CisBio Assays a mis au point une technologie appelée HTRF® permettant, grâce à l'utilisation de fluorophores et du FRET associé, le remplacement des ligands radioactifs par des ligands marqués par des fluorophores. Ils cherchent à rendre leur technologie accessible pour de nombreux récepteur et notre laboratoire fait partie des partenaires pour la mise au point de ces nouveaux ligands de référence. C'est dans cette approche que m'a été confié le travail de mettre au point un ligand fluorescent pour un des sites du récepteur canal GABA_A. Ce site est couramment appelé récepteur central aux benzodiazépines, et comme annoncé dans la partie introduction de ce manuscrit, les ligands TSPO sont très proches structuralement parlant des ligands ciblant les récepteurs centraux aux benzodiazépines. J'étais ainsi le mieux placé pour synthétiser ce composé.

1. Introduction

1.1. Fluorescence

Les molécules luminescentes peuvent émettre de la lumière selon un phénomène de luminescence que l'on distingue en deux catégories : la photoluminescence (phénomène non radiatif consécutif à une excitation lumineuse comme les photons ou UV) et la chimioluminescence (phénomène radiatif consécutif à une réaction chimique ou enzymatique). On classe la photoluminescence selon le mode d'excitation en fluorescence ou phosphorescence. Le diagramme de Jablonski (Figure 104) représente les différents états électroniques impliqués dans ces émissions de lumière. Des niveaux vibrationnels sont associés à chaque état électronique, caractérisés par des singulets (S_0 (état fondamental), S_1 , S_2 , etc) ou des triplets (T_1 , T_2 , etc).

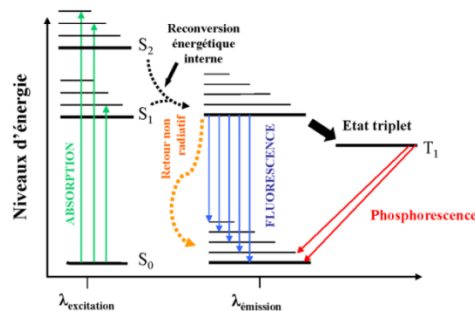


Figure 104 : Diagramme de Jablonski²⁷¹

L'émission de lumière produite au passage entre deux états de multiplicité différents est appelée phosphorescence. Le retour à l'état fondamental S_0 s'effectue lentement (10^{-6} à 1 seconde).

L'émission de lumière produite au passage entre un état singulet S_1 à l'état fondamental S_0 est appelé fluorescence. En l'absence d'excitation, les fluorophores sont au plus bas niveau vibrationnel de l'état fondamental S_0 . Le premier état excité du niveau S_1 est atteint par l'absorption rapide (10^{-15} seconde) d'un photon à une certaine longueur d'onde (longueur d'onde d'excitation). Le fluorophore excité va perdre de l'énergie pour retourner au plus bas état vibrationnel de l'état excité S_1 en 10^{-12} secondes puis retourner à n'importe quel niveau de l'état fondamental S_0 en émettant un photon. Comme cette fluorescence émise sera de plus basse énergie du fait de la dissipation de l'énergie d'excitation par des processus non radiatifs, le photon émis présentera des longueurs d'onde supérieures à celles du photon absorbé.²⁷² Ce décalage des spectres d'absorption et d'émission est mesuré par le déplacement de Stokes qui représente la distance entre les maxima des deux spectres. La mesure de la fluorescence est facilitée par un grand déplacement de Stokes.

Le rendement quantique est la grandeur représentant l'efficacité de fluorescence pour une molécule donnée et indique le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés par la molécule. Il peut être exprimé par la formule suivante :

$$\varphi = \frac{I_f}{I_a} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \cdot \tau$$

avec I_f l'intensité de fluorescence, I_a l'intensité d'absorbance, k_r le taux de désexcitation radiative, k_{nr} le taux de désexcitation non radiative et τ le temps de vie de fluorescence. Un fluorophore présentant un rendement quantique élevé sera mieux capable de réémettre, sous forme de lumière, une grande partie de l'énergie absorbée. Les facteurs environnementaux comme la concentration, le pH, la polarité ou la température influent sur le rendement quantique.

Le temps de vie de fluorescence τ correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité d'un fluorophore, de l'ordre de la nanoseconde en général. Il dépend de la nature de la molécule ainsi que de son environnement : polarité du milieu, pH, concentration, agrégation ou température. Un temps de vie court rend le fluorophore plus sensible.

L'absorbance spécifique ou coefficient d'extinction molaire ϵ quantifie l'absorption à une concentration molaire donnée. Il est calculé à partir de l'absorbance (A) d'une solution donnée, définie par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon cd$$

avec I_0 l'intensité de lumière incidente, I l'intensité de lumière sortante, ϵ le coefficient d'extinction molaire ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$), c la concentration molaire et d , l'épaisseur de la cuve.

Ces paramètres déterminent, selon le système, le meilleur fluorophore à envisager

1.2. FRET

Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) est un transfert de fluorescence entre un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur (Figure 105).

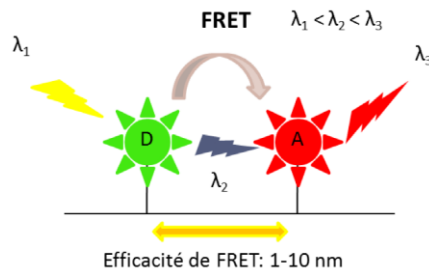


Figure 105 : Représentation schématique du FRET

Pour qu'il y ait un transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur, il est nécessaire qu'il y ait une superposition du spectre d'émission du donneur avec celui d'excitation de l'accepteur comme représenté en figure 106.

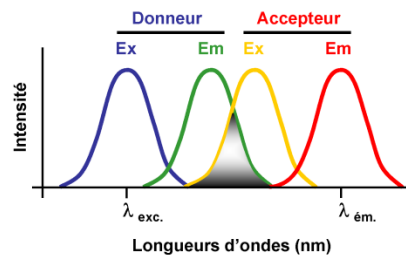


Figure 106 : Spectres d'absorption et d'émission des fluorophores accepteur et donneur pour le FRET²⁷³

Cette technique permet d'étudier les interactions protéine-protéine ou ligand-protéine et de calculer des distances d'interaction.

1.3. Technologie HTRF® de CisBio Assays

Cette technologie combine le FRET et la TR (Time Resolved measurement) et permet d'avoir un délai de 50 à 150 ms entre l'excitation et la lecture de fluorescence. Cela permet de réduire le rapport signal sur bruit et d'avoir une meilleure sensibilité lors du test, car cette technique permet de s'affranchir de l'autofluorescence du matériel biologique. La distance maximum entre les deux fluorophores, nécessaire pour avoir un signal, reste toujours de 10 nm.^{274,275}

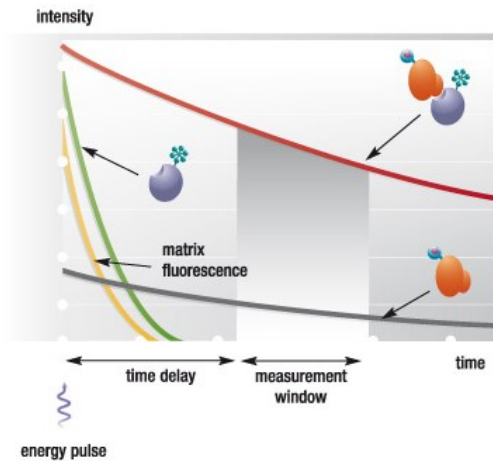


Figure 107 : Un temps de délai suit directement l'excitation avant la mesure, limitant ainsi le bruit de fond²⁷⁵

Les fluorophores couramment utilisés dans cette technologie sont des cryptates de terre rare, constitués d'un lanthanide inséré comme élément central de la cavité d'un ligand macrocyclique. L'euprimum (Eu^{3+}) et le terbium (Tb^{2+}) sont les lanthanides utilisés par l'entreprise CisBio Assays comme ions centraux.

Le fluorophore donneur est directement inséré sur le récepteur par mutation ou des technologies SNAP-tag ou CLIP-tag. Ces techniques ont déjà été éprouvées pour l'étude de RCPG, de kinases, de cytokines de biomarqueurs, d'interactions protéine-protéine, protéine-peptides ou protéine-ADN.

Nous avons ainsi souhaité adapter cette technologie développée par CisBio à la modulation allostérique d'un récepteur canal, le GABA_A .

2. Conception du ligand – Zolpidem et CBR

La conception d'une sonde fluorescente se base sur l'utilisation de ligands de référence de la littérature. Afin que le fluorophore accepteur - porté par la sonde - se trouve à proximité du fluorophore donneur - porté par la cible - il est nécessaire de le fixer sur un bras espaceur qui est, lui, fixé directement sur le ligand « sonde ».

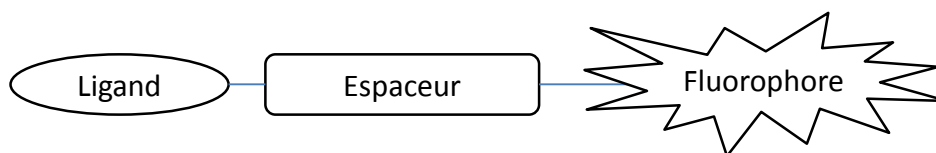


Figure 108 : Représentation schématique de la conception d'une sonde fluorescente

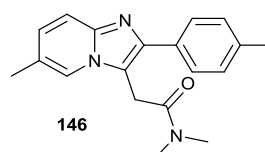


Figure 109 : Structure du Zolpidem 146

Le zolpidem (STILNOX®) est un sédatif hypnotique prescrit pour l'insomnie occasionnelle, transitoire ou chronique. Son effet hypnotique sans effet anxiolytique, myorelaxant ni anticonvulsif est obtenu par son agonisme sélectif sur la sous unité α_1 du récepteur GABA_A ($K_i = 20$ nM sur α_1).^{276,277}

Ce médicament est basé sur un squelette moléculaire de type 2-phénylimidazo[1,2-a]pyridine et les groupements méthyles en positions 4' et 6 sont présents afin de faciliter la métabolisation par le CYP3A4 au niveau du foie, ce qui confère au zolpidem un temps de demi-vie très court (2 h). Ce ligand puissant offre 3 positions qui semblent privilégiées pour l'insertion d'un linker : le méthyle en position 6, le méthyle en position 4' et un des méthyls présents sur l'amide, représentés par des flèches sur la figure 110.

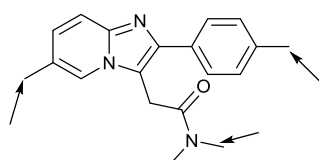


Figure 110 : Positions possibles pour insérer le bras espaceur sur le zolpidem

Le point d'insertion du bras peut être déterminé par analyse RSA autour du ligand choisi. Comme il s'agit d'un premier essai de sonde fluorescente sur le récepteur GABA_A et le zolpidem, il n'y a pas de données existantes concernant les points d'insertion possibles ou encore le type ni la longueur de la chaîne. Pour une première intention, l'expérience du laboratoire dans ce domaine nous a amené choisir les chaînes les plus utilisées comme des éthers ou des alkyl.

3. Stratégie et synthèses

3.1. Fluorophores utilisés

La société CisBio Assays nous a fourni deux fluorophores différents à greffer sur notre sonde :

- Le DYE-647 **147**, un dérivé de cyanine avec un maximum d'absorption à 653 nm et un maximum d'émission de 672 nm dans l'éthanol avec un coefficient d'extinction molaire de $250\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.
- La fluorescéine **148**, un dérivé de xanthène, présentant un maximum d'absorption à 494 nm et un maximum d'émission à 521 nm dans l'eau, a un coefficient d'extinction molaire de $80\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

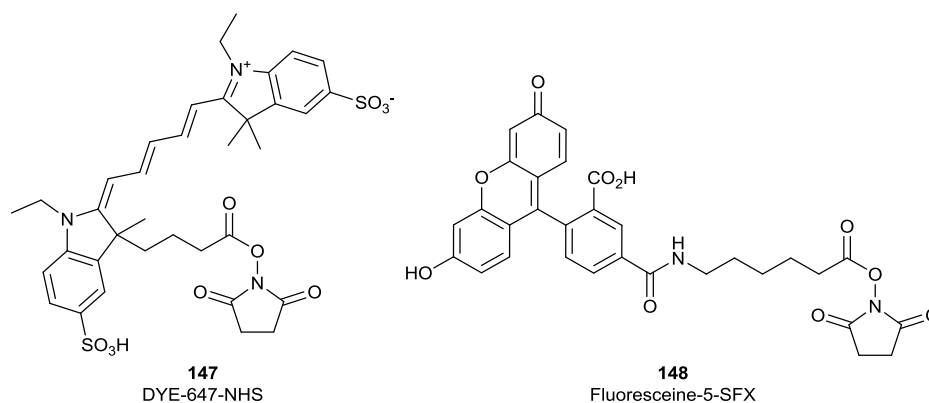


Figure 111 : Structures des fluorophores à insérer sur chaque position

Ces produits présentent tous les deux une fonction ester de *N*-hydroxysuccinimidine permettant la formation très rapide d'une liaison amide après l'attaque nucléophile d'une amine primaire sur le carbonyle. Cela permet d'insérer, facilement et avec de bons rendements, le fluorophore sur le bras espaceur.²⁷⁸

3.2. Bras espaceurs

Pour les positions 6 et 4' du zolpidem, nous avons décidé d'utiliser un linker présentant un alcyne vrai et de le greffer sur l'aromatique selon une réaction de Sonogashira.

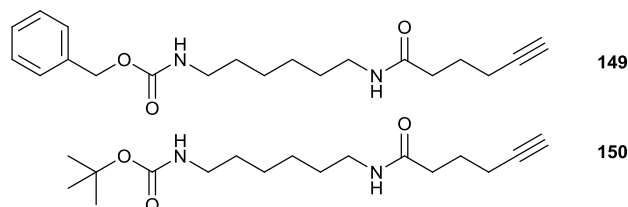
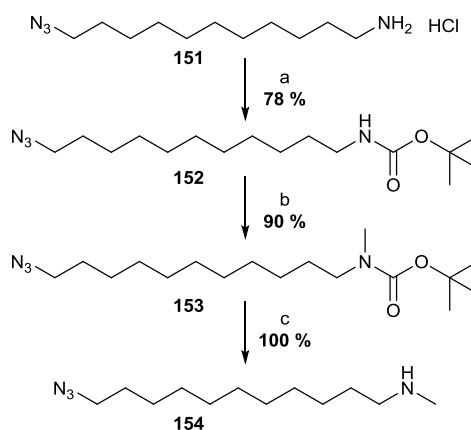


Figure 112 : Linkers 149 et 150, présentant un alcyne vrai

La triple liaison peut ensuite être réduite par hydrogénation pour augmenter la flexibilité du linker et déprotéger l'amine terminale. Les bras espaceurs **149** et **150** présentés en figure 112 ont été synthétisés par les ingénieurs et post-doc du laboratoire travaillant à plein temps sur ce projet de sondes fluorescentes.

Pour l'insertion au niveau de l'amide du zolpidem, il a été nécessaire de construire un linker présentant une amine secondaire *N*-méthylée d'une part, et un groupement azide de l'autre. Le couplage de l'amine secondaire sur le précurseur acide carboxylique du zolpidem permet ainsi de retrouver l'amide disubstitué, importante pour l'affinité envers GABA_A.



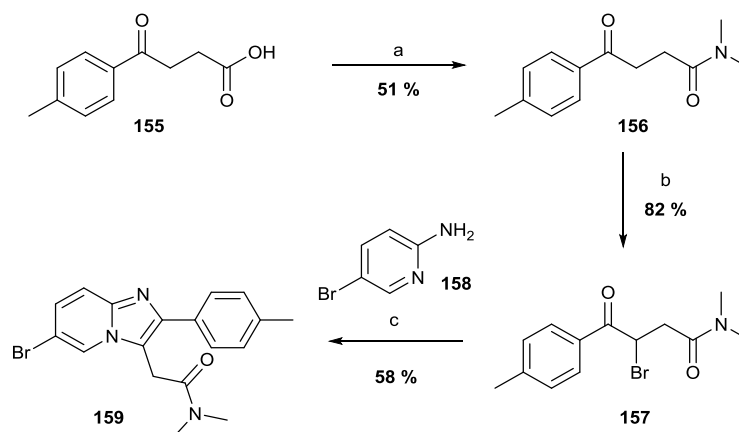
(a) Boc_2O , DIEA, DCM, ta, 12h; (b) NaH, MeI, THF, 0°C à ta, 24h; (c) TFA, DCM, ta, 3h.

Figure 113 : Accès à la chaîne 154 pour l'insertion sur l'amide

La 11-azidoundecanamine **151** est protégée par un groupement Boc par action du Boc_2O dans le dichlorométhane en présence de DIEA. On réalise ensuite la méthylation de **152** dans des conditions classiques d'alkylation en présence d'hydrure de sodium et d'iodure de méthyle dans le THF à 0°C . La chaîne **153** obtenue est ensuite quantitativement déprotégée au TFA pour conduire à la 11-azido-*N*-méthylundécaneamine **154** (Figure 113).

3.3. Linker et Fluorophore en position 6

Afin de réaliser une réaction de Sonogashira en position 6 du zolpidem pour insérer le linker, nous nous sommes inspirés des travaux de Trapani *et al.*¹¹⁴ pour la synthèse de dérivés fonctionnalisés du zolpidem permettant l'intégration d'un atome d'halogène comme le brome en position 6 (Figure 114).



(a) HNMe_2 2M dans le THF, EDCI.HCl, DCM, ta, 12h; (b) Br_2 , DCM, 0 à 25°C , 15h; (c) *n*-BuOH, 130°C , 20h

Figure 114 : Accès au précurseur pour la réaction de Sonogashira en position 6

La synthèse débute par un couplage peptidique entre la diméthylamine et l'acide 3-(*p*-toluoyl)propionique **155** à l'aide d'EDCI permettant d'obtenir le dérivé **156** avec un rendement de 51%. Le dérivé **156** est ensuite bromé par une réaction d' α -cétohalogénéation en présence de dibrome dans le DCM à 0°C , conduisant à la formation de **157** avec un rendement de 82%. La condensation

avec la 2-amino-5-bromopyridine **158** dans le butanol à 130°C permet d'obtenir le composé **159**, précurseur du couplage de Sonogashira avec la chaîne **149**.

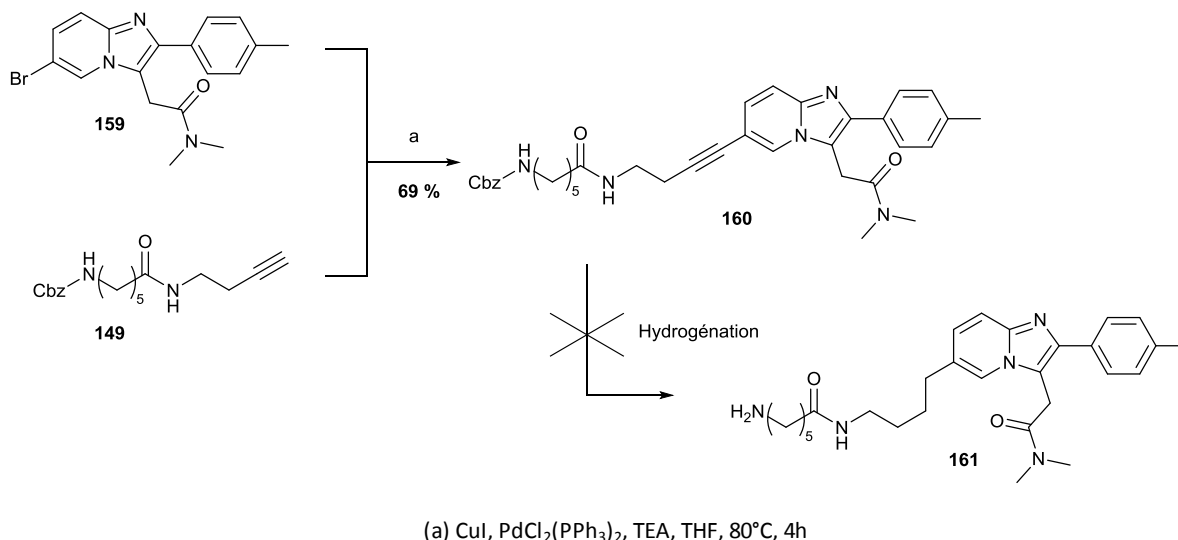


Figure 115 : Sonogashira puis réduction de la triple liaison et du groupement Cbz

Le couplage par une réaction de Sonogashira entre le dérivé **159** et l'alkyne **149** en présence d'iodure de cuivre, de Pd(II) tel que le PdCl₂(PPh₃)₂ et de triéthylamine a permis l'accès au dérivé **160** avec un rendement de 69%. Par une hydrogénation en présence de palladium sur charbon, nous avons essayé de réduire la triple liaison sur le bras espaceur tout en déprotégeant le groupement protecteur Cbz pour accéder au dérivé **161**. La réaction lancée en utilisant du Pd/C dans le méthanol a conduit à un mélange de produits déprotégés, réduits, mono- ou di-méthylés sur l'amine primaire. Ces produits proviennent d'une réaction secondaire d'amination réductrice pouvant survenir avec les traces de formaldéhyde présentes dans le méthanol commercial. Le remplacement du Pd/C par du Pd(OH)₂/C dans le THF et l'AcOEt en présence de DIEA n'a pas permis d'éviter la dégradation du produit de départ donc nous avons donc décidé de changer de stratégie en insérant une chaîne protégée par un groupement Boc et en laissant la triple liaison sur la sonde fluorescente.

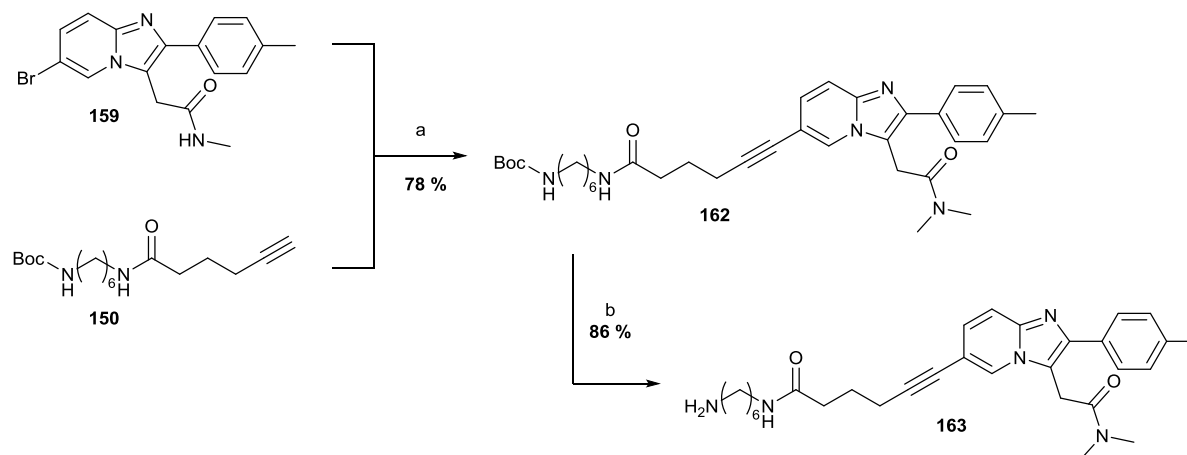
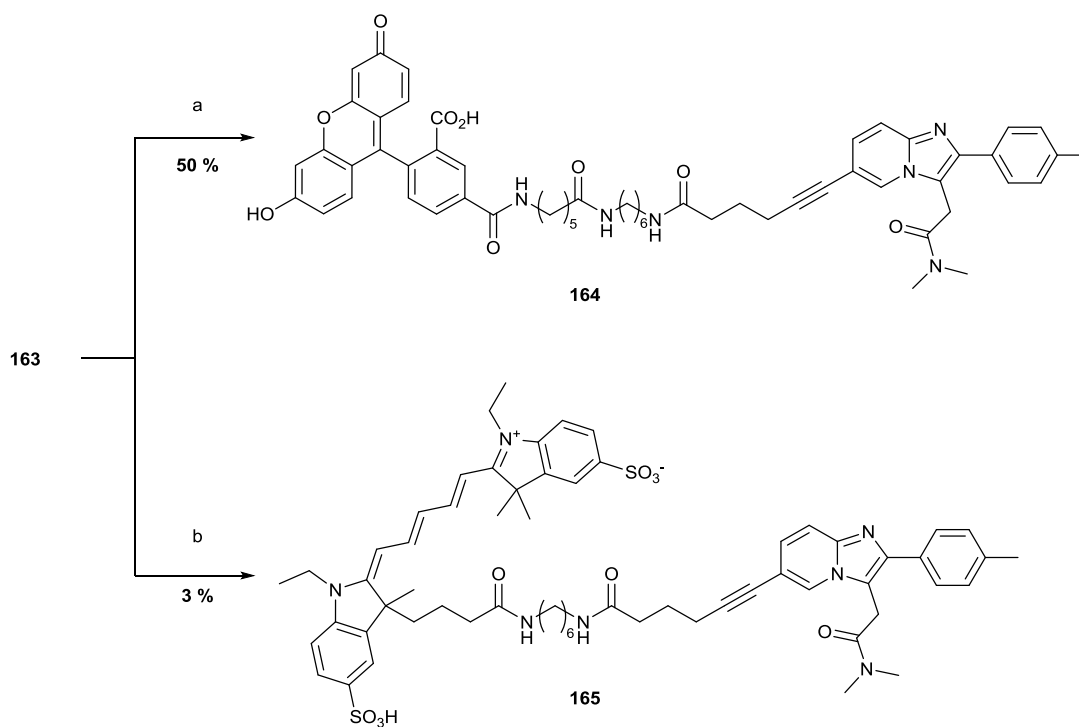


Figure 116 : Sonogashira puis déprotection du linker

Le couplage de Sonogashira, réalisé dans les mêmes conditions que décrites précédemment, nous permet d'obtenir le composé **162** avec 78% de rendement. Le groupement protecteur est ensuite retiré par action du TFA dans le DCM. On récupère l'amine libre **163** prête à être directement couplée avec les différents fluorophores comme illustré en figure 117. Il est important de noter que le DY-647 **147** est un fluorophore très onéreux, et la réaction de couplage a été réalisée sur une échelle de 0.5 mg, ce qui rend difficile la mise en place de la réaction, son suivi, et surtout les étapes de purification et de caractérisation analytique du produit final.

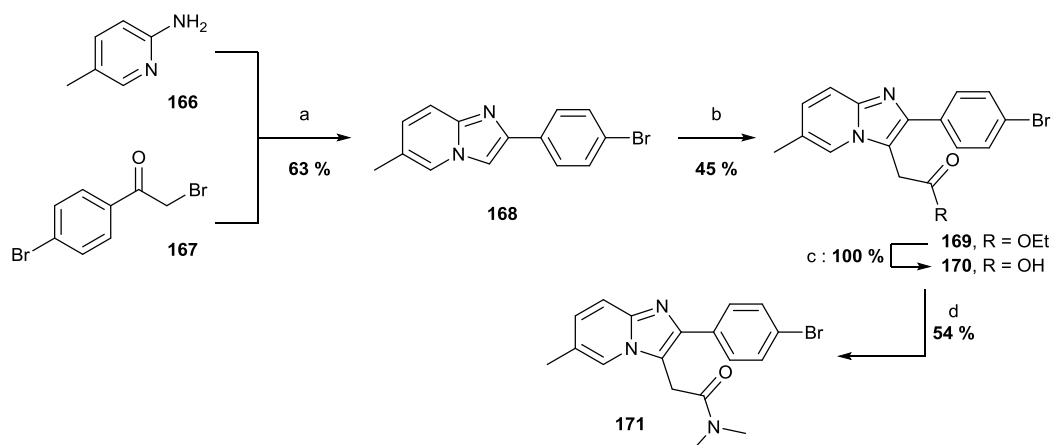


(a) Fluorescéine-5-SFX **148**, DIEA, DMF, ta, 1h; (b) DYE-647-NHS **147**, DIEA, DMF, ta, 1h.

Figure 117 : Couplage avec les fluorophores

Avec la Fluorescéine **148**, le couplage a permis d'obtenir, après purification, la sonde fluorescente **164** avec un rendement de 51%. Avec le DYE-647 **147**, un problème de détection durant la purification par HPLC semi-préparative a provoqué une grande perte de produit puisque seulement 3% de **165** ont été récupérés mais cela s'est avéré suffisant pour réaliser les tests.

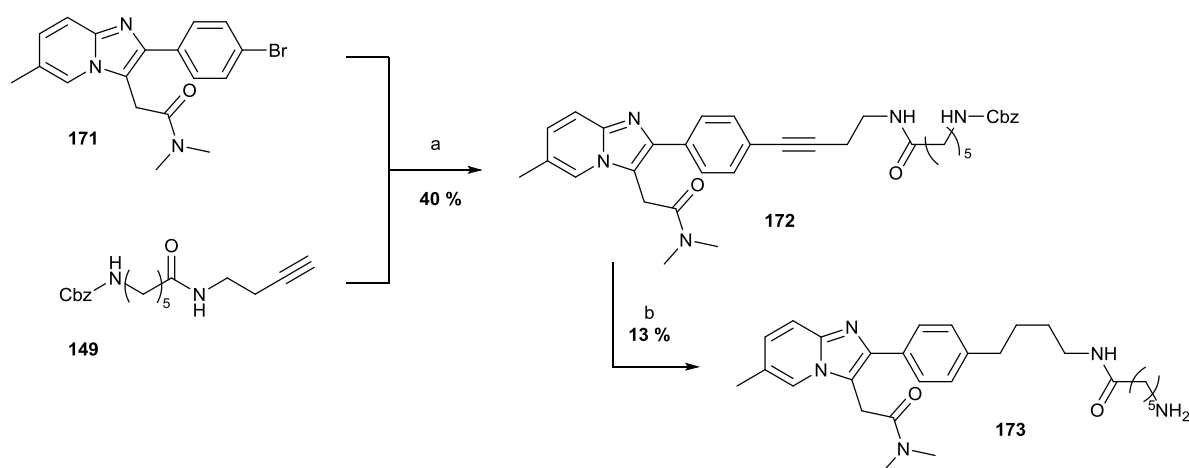
3.4. Synthèse – linker en position 4'



(a) K_2CO_3 , EtOH, 100°C, 48h; (b) Diazoacetate d'éthyle, Cu, Toluène, 130°C, 4h; (c) KOH, EtOH, Eau, ta, 3h; (d) $HNMe_2$ 2M dans THF, HATU, DIEA, DCM/DMF (2/1), ta, 1h.

Figure 118 : Accès au dérivé 171 pour la Sonogashira en position 4'

Pour synthétiser le dérivé bromé en position 4' du zolpidem, précurseur pour le couplage de Sonogashira, nous nous sommes basés sur une autre méthode décrite par Trapani *et al.*,^{113,279} débutant par une condensation à chaud entre la 2-amino-5-méthylpyridine **166** et la 2,4'-dibromoacétophénone **167** pour former le scaffold 2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine **168**. La réaction avec le diazoacétate d'éthyle en présence de cuivre métal dans le toluène au reflux permet d'insérer la chaîne acétate en position 3 de l'imidazo[1,2-a]pyridine et conduire au dérivé **169** avec un rendement de 45%. L'ester **169** est ensuite hydrolysé puis l'acide carboxylique **170** résultant est couplé avec la diméthylamine pour conduire au composé **171**, précurseur bromé du couplage de Sonogashira (Figure 118).

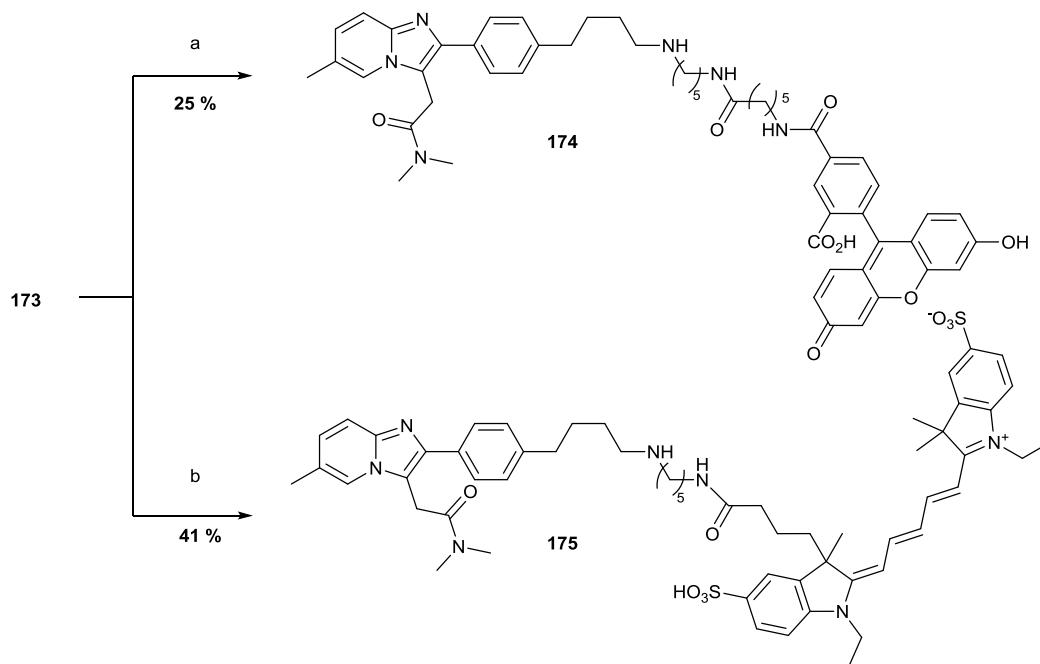


(a) CuI, $PdCl_2(PPh_3)_2$, TEA, THF, 80°C, 4h; (b) H_2 , Pd/C, MeOH, ta, 24h.

Figure 119 : Couplage de Sonogashira et hydrogénation

Le couplage de Sonogashira entre le composé **171** et la chaîne **149** s'effectue dans les mêmes conditions que précédemment et permet d'obtenir **172** avec un rendement de 40%. L'hydrogénation en présence de palladium sur charbon conduit majoritairement au composé **173** mais également au

composé présentant une double liaison, issu de la réduction partielle de la triple liaison. Ces deux produits ont coélué lors de la purification et une seule fraction pure contenant le dérivé **173** a pu être obtenue avec un rendement de 13%. Ce dérivé **173** peut être couplé avec les fluorophores **147** et **148** (Figure 119).

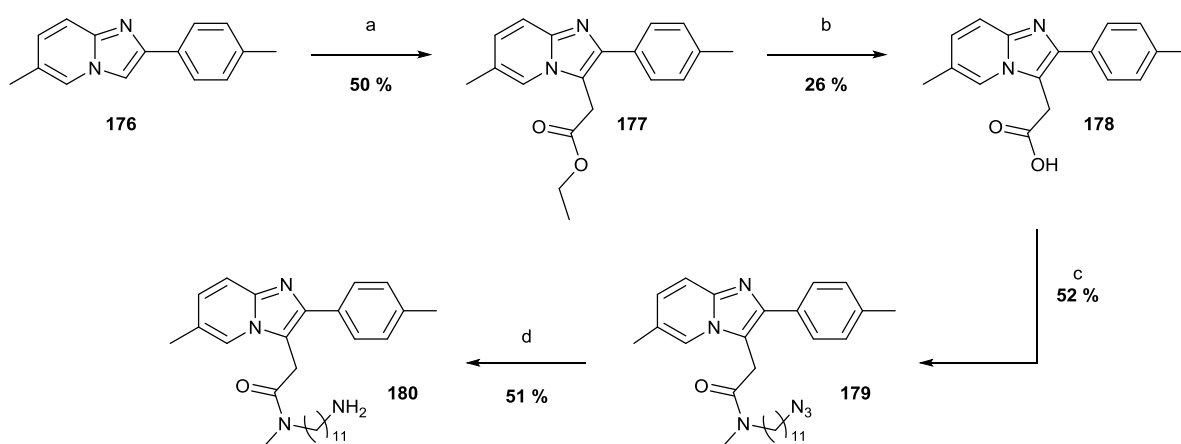


(a) Fluoresceine-5-SFX **148**, DIEA, DMF, ta, 1h; (b) DYE-647-NHS **147**, DIEA, DMF, ta, 1h.

Figure 120 : Synthèse des sondes fluorescentes **174** et **175**

Les fluorophores fournis par CisBio sont couplés avec le précurseur **173** pour obtenir, après purification sur HPLC semi-préparative, 25% de rendement pour sonde fluorescente **174** présentant la fluorescéine et 41% pour la sonde **175** avec le DYE-647. Ces produits ont été envoyés à l'entreprise pour être testés.

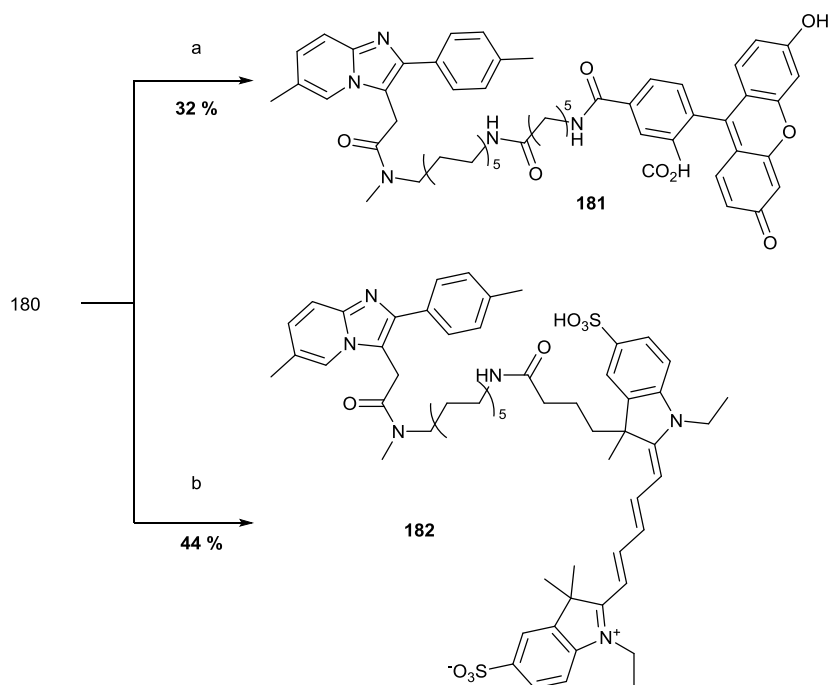
3.5. Synthèse - linker en position amide



(a) Ethyl diazoacetate, Cu, Toluène, 130°C, 4h; (b) KOH, EtOH, Eau, ta, 3h; (c) **154**, HATU, DIEA, DCM/DMF (3/1), ta, 1h; (d) PPh₃, THF, eau, ta, 24h.

Figure 121 : Synthèse du composé **180** avec la chaîne sur l'amide

Nous n'avons pas eu besoin de synthétiser l'intermédiaire **176** qui était déjà présent dans notre stock mais il peut être obtenu de la même manière que **168** par condensation de la 2-amino-5-méthylpyridine et la 2-bromo-4'-méthylacétophénone. L'alkylation de **176** avec le diazoacétate d'éthyle est ensuite réalisée avec un rendement de 50% selon la même méthode que décrite précédemment pour obtenir le composé **169**. L'hydrolyse de l'ester **177** conduit à l'acide carboxylique **178**, qui peut ensuite être couplé avec le linker **154** à l'aide d'HATU pour conduire au composé **179** avec un rendement modeste de 52%. L'azide **179** est déprotégé par l'action de la triphénylphosphine dans l'eau et le THF pour conduire à l'amine **180** prête à être couplée avec les fluorophores.



(a) Fluoresceine-5-SFX, DIEA, DMF, ta, 1h; (b) DYE-647-NHS, DIEA, DMF, ta, 1h

Figure 122 : Synthèse des sondes **181** et **182**.

Comme précédemment, les dernières étapes de synthèse ont été réalisées en présence des fluorophores activés **147** ou **148** par la fonction N-hydroxysuccinimide, en présence de DIEA dans le DMF puis directement purifié sur HPLC semi-préparative. La quantité de ligand fluorescent synthétisée est très petite (inférieur à 1 mg) pour de très grands poids moléculaires et il est nécessaire d'adapter les méthodes d'identification et de quantification des composés. Le rendement est déterminé par dosage de l'absorbance UV-visible d'une solution de produit final à l'aide d'un spectrophotomètre de type « nanodrop ». Le grand coefficient d'extinction molaire des fluorophores et l'utilisation de cet appareillage permettent de n'utiliser qu'une infime quantité de produit à tester pour déterminer le rendement de la réaction de couplage du fluorophore. L'identification est quant à elle effectuée par HR-MS et permet de vérifier la pureté et la qualité du produit synthétisé.

Les rendements de couplages sont moyens mais les produits présentent une pureté nécessaire à l'utilisation dans les tests de fluorescence.

4. Résultats et conclusion

L'entreprise CisBio Assays a effectué des mesures d'HTRF sur le GABA_A pour chacun des composés synthétisés. Ils n'ont malheureusement pas réussi à obtenir un signal suffisant pour tous les composés. Ils ont tout de même montré que les composés **174** et **175** se fixent d'une manière faible et non spécifique sur le GABA_A. Le manque d'effet observé pourrait tout de même être attribué à des mauvais choix de linker (nature ou taille) ou de ligand. Malheureusement, aucun test de binding n'a été effectué et en l'absence de ces résultats, nous n'avons pas d'informations sur le K_D et l'impact des modifications structurales que nous avons effectué. Il aurait été intéressant d'essayer de modifier les paramètres des linkers ou du ligand afin de peut-être améliorer les résultats, mais le projet a été abandonné par les partenaires industriels et nous n'avons pas eu l'occasion de réaliser d'autres composés pour ce test.

Conclusion générale

Cette thèse visait l'étude et le développement de nouveaux ligands du TSPO suivant une approche fonctionnelle. D'un point de vue chimique, nous avons réalisé la synthèse de nombreux dérivés de familles chimiques différentes, présentant des châssis moléculaires hétérocycliques, peptidomimétiques ou peptidiques. Par ailleurs, la synthèse de dérivés de référence issus de la littérature (Ro5-4864, SSR-180,575 et XBD-173) a permis de mieux appréhender les résultats obtenus avec nos ligands dans les différents modèles biologiques testés. Ainsi, les dérivés d'imidazo[1,2-c]quinazolinone ont montré de bons effets inducteurs de la production de prégnénone, validant le rôle de ces molécules sur la neurostéroïdogénèse via une action sur TSPO. La synthèse de composés peptidiques dérivés de la phénylalanine nous a permis d'identifier les éléments structuraux importants pour la solubilité des composés tout en nous permettant de gagner en activité sur les tests de production de prégnénone. Cette analyse structurale nous a conduit à concevoir des dérivés rigidifiés de phénylalanine, conservant les éléments de pharmacophore des imidazo[1,2-c]quinazolinones. Les dérivés dihydroquinolinones résultant de cette approche ont présenté une affinité sub-micromolaire sur TSPO ainsi qu'une amélioration significative de leur solubilité. Pour la synthèse de ces dihydroquinolinones chirales, nous avons mis en place une réaction originale de Buchwald-Hartwig intramoléculaire et régiosélective à partir de la 2-bromophénylalanine.

Suite à une étude bibliographique réalisée au début de ce projet, nous avons intentionnellement abordé l'évaluation des ligands du TSPO via leurs effets fonctionnels, plutôt que par leur affinité au récepteur. Les composés présentant les meilleurs effets sur la stimulation de la stéroïdogénèse ont montré des effets neuroprotecteurs sur un modèle cellulaire de la maladie d'Alzheimer en stimulant la respiration mitochondriale (production énergétique) et en limitant l'impact du stress oxydant. Ces tests ont ainsi pu confirmer le rôle neuroprotecteur du TSPO au niveau central et l'intérêt de notre stratégie fonctionnelle pour le développement de nouveaux agents neuroprotecteurs. Cette approche nous a finalement permis d'identifier les dérivés d'imidazo[1,2-c]quinazolinone qui présentent des effets fonctionnels similaires voire meilleurs à ceux obtenus avec les produits de référence ayant suivi des essais cliniques (XBD-173 et SSR-180,575), et ce malgré des affinités plus faibles envers TSPO.

D'autre part, l'utilisation des imidazo[1,2-c]quinazolinones comme outils biologiques a permis l'identification d'une partie des mécanismes impliqués dans la protection des globules rouges face à l'infection au *P. falciparum* et permettre ainsi une meilleure compréhension fonctionnelle du TSPO2. La synthèse de ligands spécifiques du TSPO2 permettra d'améliorer les connaissances de ces deux isoformes (TSPO1 vs TSPO2), leurs différences et leurs spécificités. Pour l'instant, ces deux protéines semblent être toutes les deux impliquées dans des mécanismes protecteurs des fonctions essentielles à la survie cellulaire, tissulaire et physiologique.

Durant cette thèse, j'ai pu me confronter aux problèmes inhérents à cette évaluation fonctionnelle. La complexité des systèmes rend nécessaire de nombreuses étapes de mise au point qui peuvent ralentir le développement de nouveaux composés par la différence de vitesse entre la synthèse et l'évaluation de composés synthétisés. D'un côté, ces essais apportent une multitude d'informations sur les ligands synthétisés et permettent de comprendre de nombreux mécanismes cellulaires. D'un autre, il est plus difficile d'établir des relations structures activité à cause de la lecture d'activités indirectes ou des

limitations liées au travail avec des cellules comme l'internalisation des composés ou encore les différences observables selon le nombre de passages d'une lignée cellulaire. Malgré certains ralentissements, cette méthode reste, dans le cas du TSPO, l'un des meilleurs moyens de développer de nouveaux ligands présentant les propriétés recherchées.

Pour conclure, ces trois dernières années m'ont permis d'aborder plusieurs facettes du travail du pharmacochimiste en m'intéressant de manière équivalente à la synthèse, à l'évaluation physico-chimique et à l'évaluation biologique des dérivés synthétisés. Cela a également pu confirmer mon intérêt pour le travail de recherche en chimie médicinale et contribué à forger ma connaissance en chimie hétérocyclique et peptidique. Grâce aux nombreuses collaborations établies durant ce projet, j'ai eu l'opportunité de compléter ma formation biologique par un apprentissage expérimental de certaines techniques de biologie cellulaire.

Annexe 1 : Synthèse sur support solide

La technique de synthèse de peptides sur phase solide a été développée par Merrifield en 1963²⁸⁰ et elle est largement utilisée pour la synthèse de petite ou grande échelle de peptides entre 20 et 30 acides aminés. Cette méthode est beaucoup plus rapide que la synthèse en phase liquide et permet d'éviter les étapes intermédiaires de purification. Le peptide synthétisé est lié à un support solide insoluble dans les solvants organiques pour faciliter les étapes de purification par simple lavage puisque l'excès de réactifs et les sous-produits de réaction sont facilement éliminés lors de lavages successifs par filtration.

1. Généralités sur la synthèse sur support solide

Le support solide, ou résine, est constitué de deux parties : la matrice de support et un groupement fonctionnel.

1.1. Matrice

La matrice doit répondre aux critères suivants :

- Etre physiquement inerte aux réactifs et solvants utilisés pour les étapes de synthèse et de lavage
- Etre expansible dans les solvants de réaction pour permettre la pénétration des réactifs dans les pores
- Etre greffée par un groupement fonctionnel permettant l'addition du premier acide-aminé.

Le polymère constituant la matrice peut gonfler dans les solvants organiques tels que le dichlorométhane ou la diméthylformamide pour permettre l'accessibilité aux groupements fonctionnels logés à l'intérieur des pores du polymère et il se rétracte dans les solvants protiques comme les alcools ou l'eau pour évacuer les impuretés issues de la réaction. Il existe 3 types de polymère principalement utilisés :

- La résine polystyrène : polymère de styrène contenant 2% de divinylbenzène. Résine hydrophobe avec une faible amplitude de gonflement.
- La résine polyacrilamide : polymère réticulé de polydiméthylacrilamide incorporant des chaînes de sarcosine. Résine hydrophile avec une grande amplitude de gonflement
- La résine PEG : résine polystyrène comportant un bras espaceur polyéthylène glycol avant le groupement fonctionnel. Permet une meilleure stabilité pour la synthèse de peptides longs.

Les billes de polymère présentent en général un diamètre de 200 à 400 mesh et peuvent porter entre 0.5 et 0.9 mmol de groupements fonctionnels par gramme de résine. Les peptides longs nécessitent des résines greffées à 0.1 ou 0.2 mmol/g pour éviter l'encombrement stérique.

1.2. Groupement fonctionnel

Il existe 3 groupements fonctionnels principaux qui peuvent être fixés à la résine :

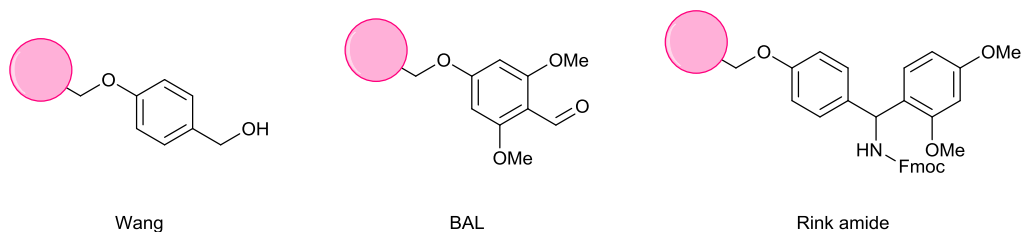


Figure 123 : Différents groupements fonctionnels

La résine de Wang permet d'obtenir une fonction acide carboxylique en partie C-terminale après clivage. La résine BAL permet d'obtenir des amides secondaires ou des groupements fonctionnalisés en partie C-terminale.²⁸¹ La résine rink amide permet d'obtenir une fonction amide en partie C-terminale.

1.3. Stratégie de synthèse

Deux stratégies de protection peuvent être utilisées sur phase solide : Boc ou Fmoc. En stratégie Boc, l'acide aminé protégé par un Boc en partie N-terminale peut être déprotégé avec du TFA avant couplage et le clivage de la résine est réalisé au HF. La stratégie Fmoc est préférée à cette méthode à cause de la dangerosité de l'acide fluorhydrique. Le Fmoc est facilement éliminé en milieu basique (pipéridine, DBU) avant le couplage. Les groupements réactifs des chaînes latérales des acides-aminés greffés sont protégés par des groupements protecteurs labiles en milieu acide lors du clivage (Boc, Trt, Pbf, OtBu) ou éliminable en présence de palladium (OAll, Alloc).

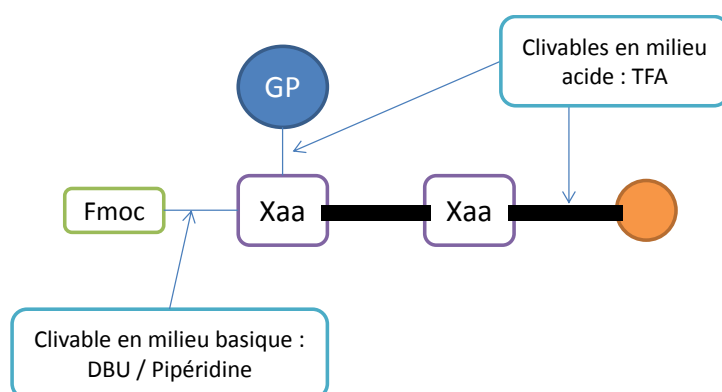


Figure 124 : Schéma récapitulatif de la stratégie Fmoc

2. Méthode utilisée au laboratoire

Dans ces travaux de thèse, nous avons synthétisé des peptides d'une longueur de 2 à 6 acides aminés en utilisant une stratégie Fmoc sur des groupements fonctionnels Rink-Amide greffés sur des résines de type polystyrène.

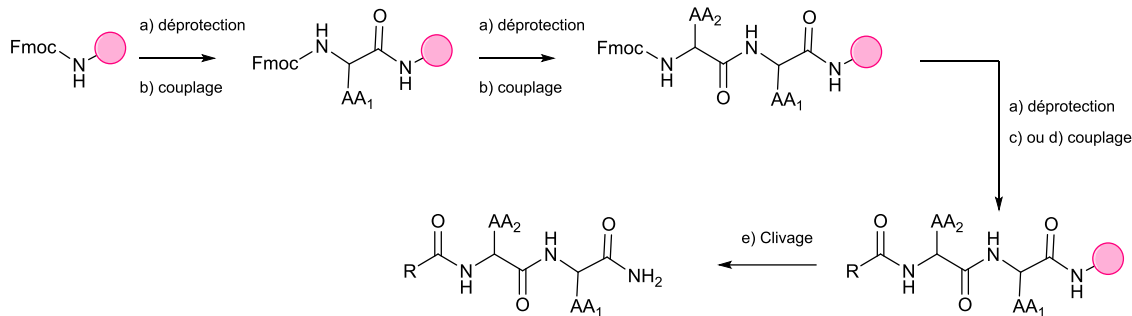


Figure 125 : Synthèse d'un peptide sur résine Rink-Amide en stratégie Fmoc

2.1. Couplage peptidique

Les acides aminés sont introduits par couplage peptidique après la déprotection de l'amine liée à la résine. Le couplage entre une amine primaire et un acide carboxylique est généralement réalisé en présence de BOP. L'HATU est conseillé pour les couplages avec une amine secondaire. Il existe de nombreux autres agents de couplage disponibles commercialement (PyBOP, HBTU, COMU, EDCI, etc...).

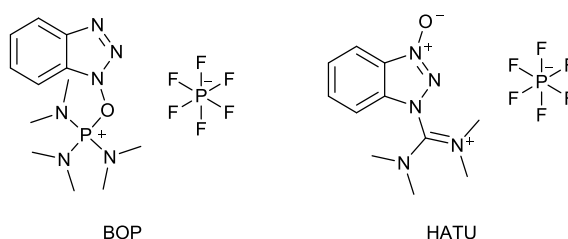


Figure 126 : Structure des agents de couplage BOP et HATU

Il peut parfois rester quelques fonctions amines libres n'ayant pas réagi lors de couplage peptidique. Afin de maîtriser l'élongation des produits secondaires, on réalise un « capping » : l'acylation de ces fonctions amine libre avec une solution d'anhydride acétique à 20% dans le DMF pendant 10 minutes après chaque couplage.

2.2. Lavages

La résine est manipulée dans des seringues de plastique constituées d'un filtre qui facilite l'évacuation des liquides par filtration sous vide. Les lavages servent à éliminer les excès de réactifs et les sous-produits. Au laboratoire, la résine est lavée après chaque étape pendant 2 x 1 min avec du DMF, 2 x 1 min de DCM, 2 x 1 min de MeOH puis 2 x 1 min de DCM. Les différents solvants font plus ou moins gonfler ou rétracter la résine et permettent un meilleur lavage.

2.3. Suivi des réactions

Aucune caractérisation ni purification ne peut être effectuée avant clivage mais il existe des méthodes qualitatives permettant de vérifier l'avancement à chaque étape. Nous n'aborderons ici que le test de Kaiser que nous avons utilisé.

Le test de Kaiser et un test colorimétrique qui permet de vérifier qualitativement l'absence ou la présence d'amines libres. Quelques billes de résine sont prélevées et ajoutées à un mélange de trois solutions (2 gouttes de chaque, solution A : 5% ninhydrine dans l'éthanol, B : 80% phénol dans l'éthanol, C : 2% KCN dans la pyridine) Ce mélange est chauffé à 100°C avec les billes pendant 2 à 3 minutes. La présence d'amines libres est visualisée par une coloration bleue-violette des billes de résine tandis que l'absence de coloration indique l'absence de fonctions amines libres. Ce test permet de vérifier le bon déroulement des étapes de couplage et déprotection.

2.4. Déprotection

La déprotection de l'acide aminé en position N-terminale s'effectue à l'aide d'une solution contenant 2% de DBU et 2% de pipéridine dans le DMF pendant 2 x 15 minutes.

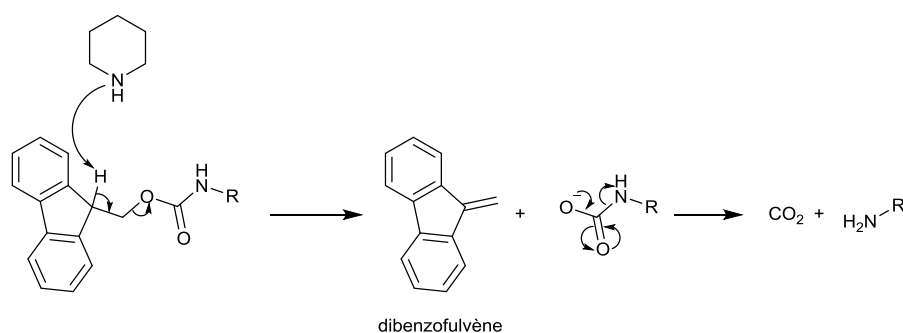


Figure 127 : Mécanisme de déprotection du Fmoc

La résine est ensuite lavée de la même manière qu'après un couplage. Un test de Kaiser est également réalisé pour vérifier le bon déroulement de cette étape de déprotection.

2.5. Clivage

Le TFA permet de séparer de la résine le produit synthétisé en éliminant également les groupements protecteurs labiles en milieu acide. Ces derniers peuvent former des carbocations stables qui peuvent réagir avec des groupements riches en électrons présents sur la séquence peptidique. Des scavengers dérivés de thiols ou de silanes sont ainsi utilisés pour palier à ces réactions secondaires pouvant survenir lors de la déprotection. Après filtration et évaporation du TFA, le résidu est généralement précipité dans l'éther et lavé par filtration pour conduire au peptide pur. Certaines séquences peuvent néanmoins nécessiter une purification ultérieure.

Annexe 2 : Test ELISA

1. Principe du test ELISA - Prégnénolone

La méthode ELISA (pour Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est un test immunologique pour vérifier la présence d'un anticorps ou un antigène dans un échantillon donné. Nous ne décrivons pas ici les différentes techniques de test ELISA mais seulement celle utilisée lors des différentes quantifications de la production de prégnénolone chez les cellules C6, SH-SY5Y ou HT22. Il s'agit du même test pour les trois lignées cellulaires. La plaque ELISA utilisée est un test de compétition entre un antigène non marqué (ici la prégnénolone) et un antigène marqué (ici la prégnénolone conjuguée à la peroxydase du raifort ou prégnénolone-HRP) pour un nombre limité de sites de liaison.

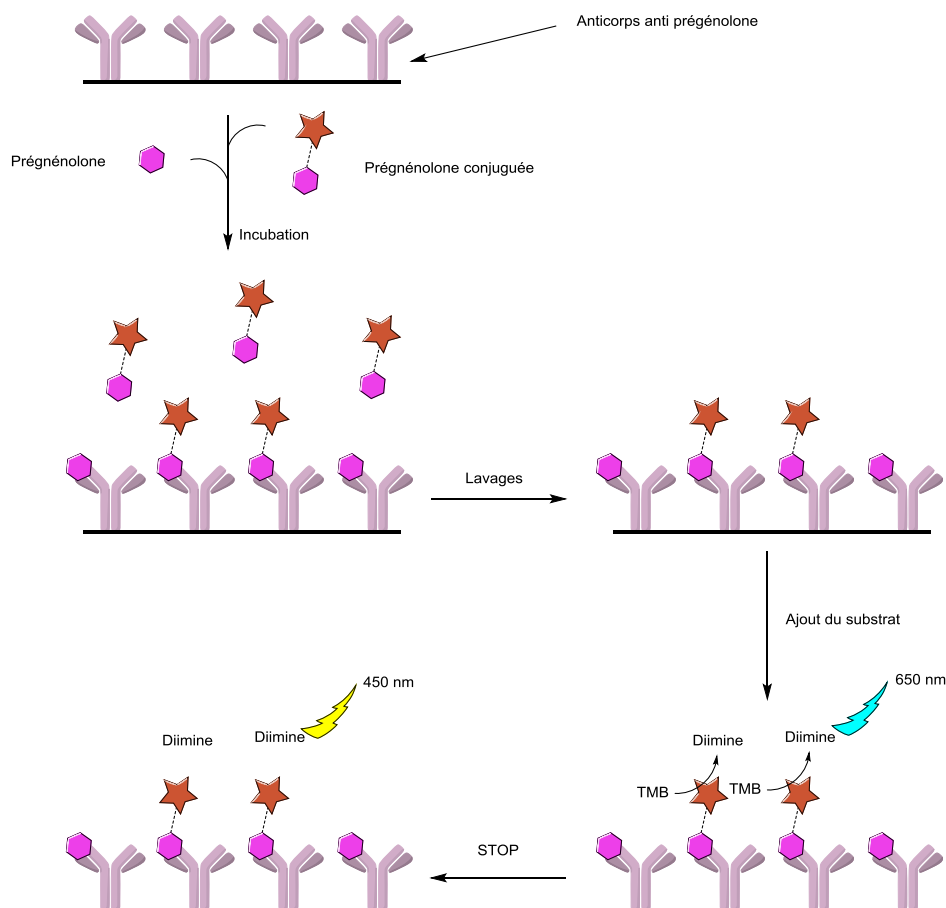


Figure 128 : Dosage ELISA de la prégnénolone

Le composé à doser (ici le surnageant de culture après application des composés à tester - quantité inconnue de prégnénolone) et le composé conjugué (prégnénolone-HRP - quantité connue) sont incubés dans chaque puits présentant une quantité définie d'anticorps anti prégnénolone de lapin. Les puits sont lavés et les matériaux non liés par les anticorps sont évacués des puits. Le substrat de l'enzyme conjuguée à l'antigène marqué est ensuite ajouté (ici la tétraméthylbenzidine et du peroxyde d'hydrogène) puis transformé par l'enzyme en une diimine, colorée en bleu et dosable par absorbance UV-visible. La réaction enzymatique est ensuite stoppée à l'aide d'une solution 1M d'H₂SO₄, la diimine, colorée en jaune en milieu acide, peut ensuite être dosée par absorbance UV-visible à 450 nm.

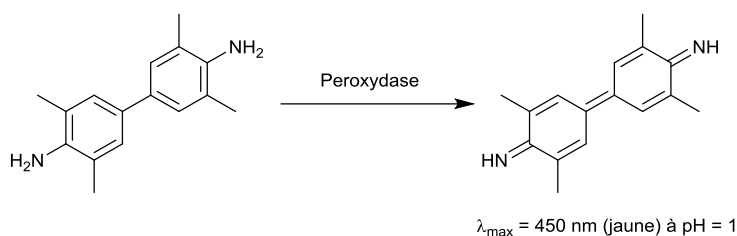


Figure 129 : Réaction enzymatique mise en jeu

La quantité de diimine jaune formée est alors proportionnelle à la quantité de prégnénolone conjuguée restée dans les puits donc, a fortiori, inversement proportionnelle à la quantité de prégnénolone dans l'échantillon à doser. Certains puits présentent une concentration connue de prégnénolone pour pouvoir établir une courbe étalon. On peut ainsi déterminer la quantité de prégnénolone présente dans chaque puits.

2. Protocole expérimental

Le protocole est différent selon les conditions testées (concentration cellulaire, nature du ligand TSPO, concentration en ligand) et il est nécessaire de réaliser des triplicats pour chaque condition testée.

Le kit ELISA est fourni avec des solutions à diluer dans les tampons fournis (étape 1)

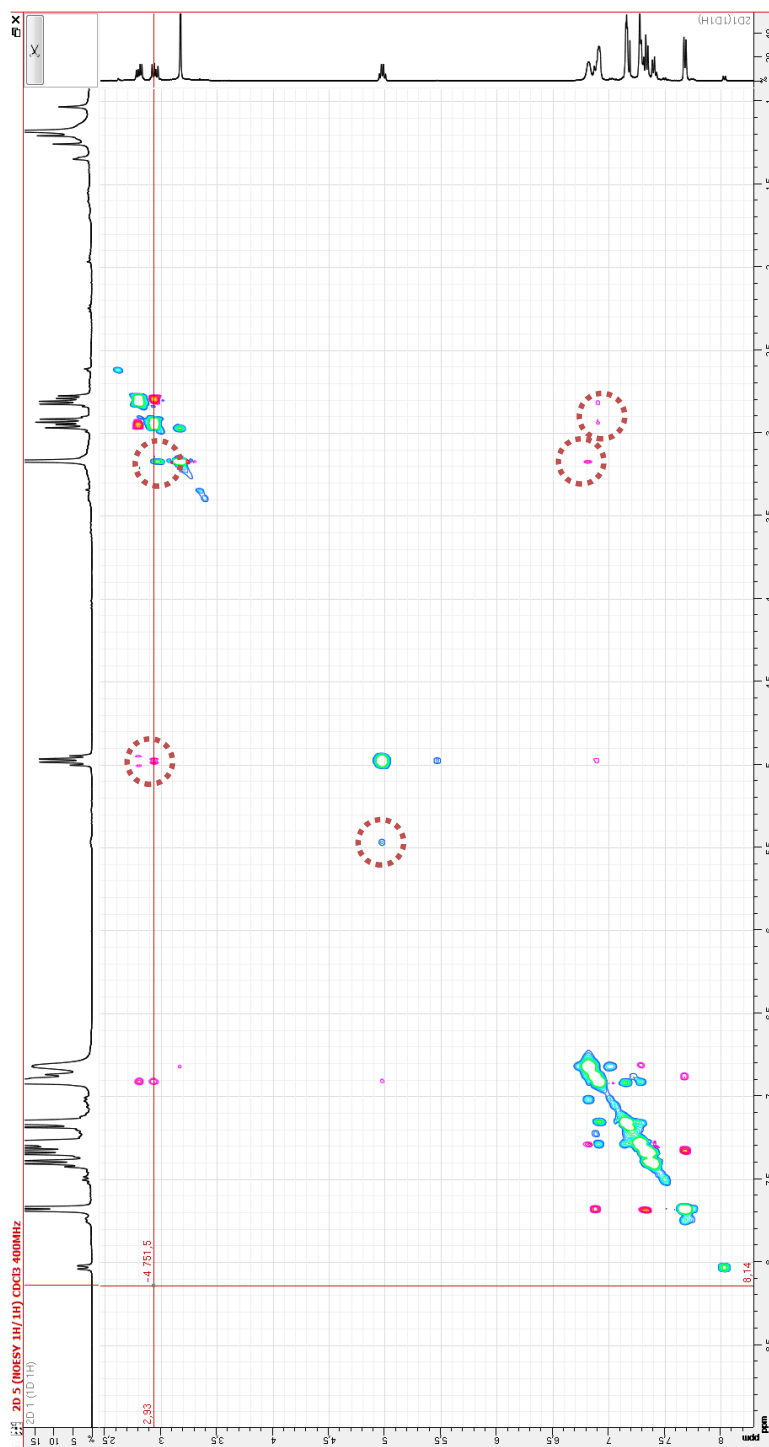
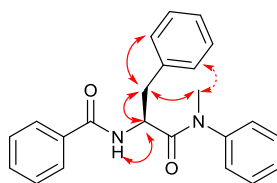
Mode opératoire :

1. Préparer les solutions de travail de Conjugué HRP-Prégnénolone et de Tampon de Lavage
2. Pipeter 50 μL de chaque calibrateur, contrôle et conditions à tester dans les puits correspondants
3. Pipeter 100 μL de la solution de Prégnénolone conjuguée dans chaque puits
4. Incuber 60 min à TA (18-25°C) sur un agitateur orbital (env. 600 tr/min)
5. Laver les puits 3 fois avec 300 μL de Tampon de Lavage dilué par puits, bien sécher
6. Pipeter 150 μL de Substrat TMB dans chaque puits à intervalles programmés
7. Incuber 10-15 min à TA (18-25°C) sur un agitateur orbital (env. 600 tr/min)
8. Pipeter 50 μL de Solution d'Arrêt dans chaque puits, aux mêmes intervalles programmés que dans l'étape 6
9. Lire la plaque sur un lecteur de microplaques à 450 nm dans les 20 minutes suivant l'addition de la solution d'arrêt

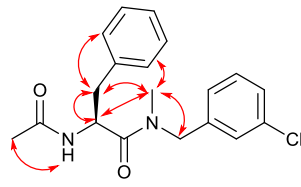
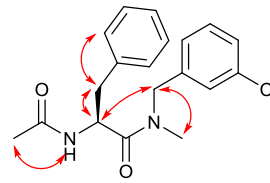
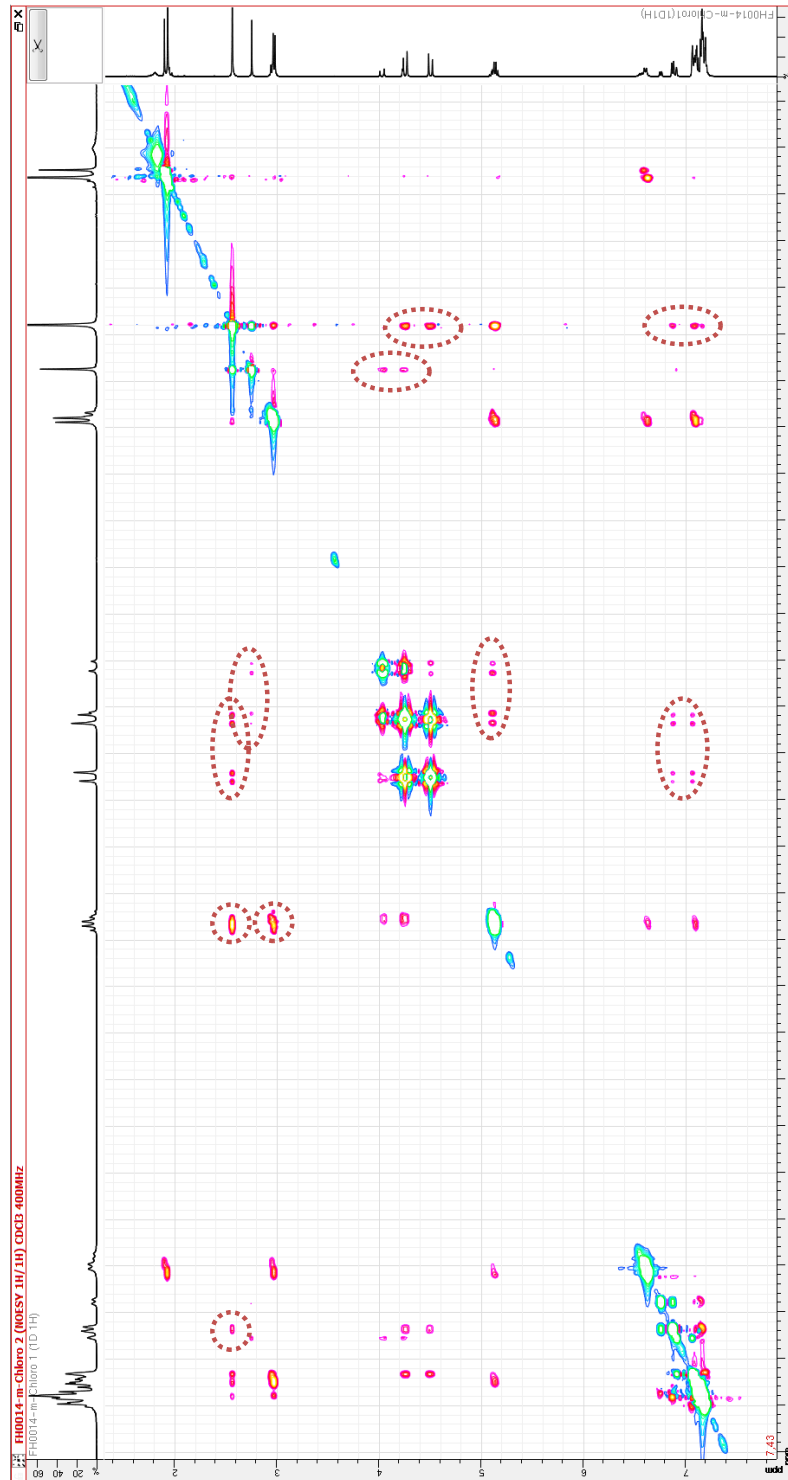
On obtient ainsi une courbe étalon pour déterminer la quantité de prégnénolone présente dans chaque puits.

Annexe 3 : RMN 2D

Dérivé 55a :



Dérivé 56 :

Forme *trans* majoritaire (70%)Forme *cis* minoritaire (30%)

Partie expérimentale

General informations

All reactions were carried out under argon atmosphere in flame-dried glassware as indicated. Chemicals and solvents were used without further purification.

Analytical TLC was performed using silica gel plates, and plates were visualized by exposure to ultraviolet light.

HPLC were performed using the following parameters: flow rate: 0.5 mL/min; column temperature: 30 °C; solvent system: A (MeOH) and B (0.05% TFA in H₂O); conditions: t = 0–1 min, 50–60% of B; t = 1–10 min, 60 to 100% of B; and t = 10–15 min, 100% of B. Absorbance spectra were recorded with a UV–vis spectrophotometer equipped with a thermostatted multicell holder maintained at 20.0 °C. Spectra were corrected for the emission of the solvent, the lamp fluctuations, and the wavelength dependence of the optics and detectors in the emission pathway.

Flash chromatography on silica gel (particle size 0.040– 0.063 mm) was performed using AcOEt and Heptane as eluent. Reversed phase flash chromatography was performed on C18 column using water and methanol as eluent. Yields refer to isolated compounds, estimated to be >97% pure as determined by ¹H NMR or HPLC.

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 400 or 500 MHz and 100 or 125 MHz, respectively. All chemical shift values, δ , and coupling constants, J, are quoted in ppm and Hz, respectively, with the following abbreviations used for multiplicity: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; quint, quintuplet; sex, sextuplet; n, nonuplet; dd, doublet of doublets; ddt, doublet of doublets of triplets; dt, doublet of triplets; td, triplet of doublets; qd, quadruplet of doublets; m, multiplet; and br, broad.

LCMS was performed using a C18 column (30 mm \times 1 mm; 1.9 μ m) using the following parameters: (1) solvent system: A (CH₃CN) and B (0.05% TFA in H₂O); (2) linear gradient: t = 0 min, 98% B; t = 5 min, 5% B; t = 6 min, 5% B; t = 7 min, 98% B; t = 9 min, 98% B; (3) flow rate: 0.3 mL/min; (4) column temperature: 50 °C; (5) ratio of products: determined by integration of spectra recorded at 210 or 254 nm; (6) ionization mode: MM-ES + APCI. High resolution spectra (HRMS) were recorded on a QTOF mass analyzer with electrospray ionization (ESI).

General procedures

Method A: Amide coupling with HATU

DIEA (3 eq) was added to a solution of carboxylic acid (1 eq) and HATU (1 eq) in a mixture of DCM/DMF (2/1) and then stirred at rt. After 10 min, the amine derivative (1.2 eq) was added to the reaction mixture. After 30 min, volatiles were evaporated and the residue was solubilized in 10 mL of EtOAc. Organic phase was washed with 2 \times 10 mL HCl 1N, 2 \times 10 mL NaHCO₃ sat, 1 \times 20 mL of brine, dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduce pressure. The residue was purified if necessary.

Method B: Alkylation with Sodium hydride

NaH (1.5 eq) was added to a solution of the corresponding amide, carbamate or urea (1 eq) in DMF at 0°C. After 15 minutes, alkylbromide, chloride or iodide (2eq) was added to the mixture. After

completion of the reaction, water was added to the mixture and the precipitate was filtered to give pure product or extracted with EtOAc or DCM washed with HCl 1N, NaHCO₃ sat, brine, dried on Na₂SO₄, filtered, concentrated under reduce pressure and purified on flash chromatography (normal or reversed phase).

Method C: Suzuki cross-coupling in toluene/Ethanol/Water

In a small reaction vessel (2-5mL), aryl halogenide (1 eq), boronic acid (1.2 eq) and Na₂CO₃ (3 eq) were solubilized in toluene/ethanol/water (5/1/1) and the vessel was degassed 3 times with argon. After addition of palladium tetrakis (5 mol%), reaction vessel was sealed and heated at 100°C for 2 hours. The mixture was filtered on a celite pad and concentrated under reduce pressure. The resulting oil was directly purified on flash chromatography or either reversed-phase flash chromatography.

Method D: Iminochloride and Suzuki cross-coupling with SPhos in toluene

POCl₃ (1 eq) was added to a solution of corresponding 1,4-benzodiazepin-2-one (1eq), *N,N*-dimethylaniline (2 eq) in toluene. The reaction vessel was sealed and heated at 90°C for 4h then evaporated after cooling. In an other vessel, boronic acid (1 eq), K₂CO₃ (2 eq), Pd(OAc)₂ (5 mol%) and SPhos (10 mol%) were degassed 3 times with argon and the iminochloride was added, solubilized in degassed toluene. The vessel was sealed and degassed two times with argon then heated under microwave irradiation for 15 min at 100°C. Reaction mixture was concentrated under reduced pressure then directly purified on either flash chromatography or reversed phase flash chromatography.

Method E: Amide coupling with BOP

In a small reaction vessel, carboxylic acid (1 eq) and BOP (1.05 eq) were solubilized in DCM then DIEA (3 eq) was added. The amine was added after 5 min stirring at rt and the reaction mixture was stirred overnight at rt. Solvent was removed under vacuum and the residue was solubilized in EtOAc and washed twice with HCl 1N, NaHCO₃ sat and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure and directly purified by flash chromatography.

Method F: Fmoc deprotection with DBU and coupling with benzoyl chloride.

DBU (2 eq) was added to a solution of desired Fmoc-protected compound (1 eq) in DCM and the reaction mixture was stirred for 2h at rt. After completion, solvent was removed under vacuum then the residue was directly purified over silica gel column chromatography (1 to 5% MeOH in DCM) to give the desired free amine which was directly added to a solution of DIEA (3 eq) in DCM and stirred for 5 min. Benzoyl chloride (1.05 eq) was added to the reaction mixture. The reaction mixture was stirred overnight at rt. After concentration under reduced pressure, the residue was dissolved in EtOAc and washed twice with HCl 1N, NaHCO₃ sat and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified over flash chromatography (0 to 70% EtOAc in heptane) to give the desired compound.

Method G: Solid phase syntheses using Fmoc strategy and Rink resin

Resin Rink amide (1 eq, L = 0.70) was washed with DCM (2 x 1 min) and DMF (2 x 1 min).

Fmoc deprotection: resin was stirred with 2% DBU and 2% piperidine in DMF for 1 x 1 min and 1 x 15min at rt.

Washing: resin was washed successively with DMF (2 x 1 min), DCM (2 x 1 min), MeOH (2 x 1 min) and DCM (2 x 1 min).

Kaiser test: positive (if negative, deprotection was reiterated in the same conditions)

Coupling: First amino acid (3 eq) was preactivated with BOP (3 eq) and DIEA (4.5 eq) in DCM for 5 min at rt. The reaction mixture was added to the resin and stirred for 45 min at rt.

Washing: resin was washed successively with DMF (2 x 1 min), DCM (2 x 1 min), MeOH (2 x 1 min) and DCM (2 x 1 min).

Kaiser test: negative (if positive, coupling was reiterated)

Capping: Resin was stirred with 20% Ac₂O in DMF (1 x 10 min)

Washing: resin was washed successively with DMF (2 x 1 min), DCM (2 x 1 min), MeOH (2 x 1 min) and DCM (2 x 1 min).

Fmoc deprotection: resin was stirred with 2% DBU and 2% piperidine in DMF for 1 x 1 min and 1 x 15min at rt.

Washing: resin was washed successively with DMF (2 x 1 min), DCM (2 x 1 min), MeOH (2 x 1 min) and DCM (2 x 1 min).

Kaiser test: positive (if negative, deprotection was reiterated in the same conditions)

Coupling: Second amino acid (3 eq) was preactivated with BOP (3 eq) and DIEA (4.5 eq) in DCM for 5 min at rt. The reaction mixture was added to the resin and stirred for 45 min at rt.

Washing: resin was washed successively with DMF (2 x 1 min), DCM (2 x 1 min), MeOH (2 x 1 min) and DCM (2 x 1 min).

Kaiser test: negative (if positive, coupling was reiterated)

Capping: Resin was stirred with 20% Ac₂O in DMF (1 x 10 min)

Fmoc deprotection: resin was stirred with 2% DBU and 2% piperidine in DMF for 1 x 1 min and 1 x 15min at rt.

Washing: resin was washed successively with DMF (2 x 1 min), DCM (2 x 1 min), MeOH (2 x 1 min) and DCM (2 x 1 min).

Kaiser test: positive (if negative, deprotection was reiterated in the same conditions)

Coupling or acylation: depending of the desired structure, resin can be acylated with carboxylic acid, benzoyl chloride or acetic anhydride.

Acylation: carboxylic acid (3 eq) was preactivated with BOP (3 eq) and DIEA (4.5 eq) in DCM for 5 min at rt. The reaction mixture was added to the resin and stirred for 45 min at rt then washed following washing protocol.

Benzoylation: resin was stirred with BzCl (3 eq) and DIEA (4.5 eq) in DCM for 45 min at rt then washed following washing protocol.

Acetylation: Resin was stirred with 20% Ac₂O in DMF for 45 min at rt then washed following washing protocol.

Cleavage: Resin was stirred in TFA with 5% thioanisole and 3% TIS for 2 x 15 min at rt. The resulting solution was concentrated under reduced pressure and the residue was precipitated in Et₂O. The precipitate was pure or needed to be purified on reversed phase flash chromatography.

Method H: Buchwald cyclization/liquid phase

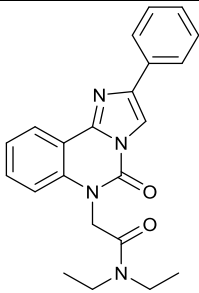
2-bromophenylalanine derivative (1 eq), Pd, ligand and base were degassed 3 times with argon. Previously degassed solvent was added to the vessel and the mixture was heated for X hours. Reaction mixture is directly purified on flash chromatography to afford desired cyclized products.

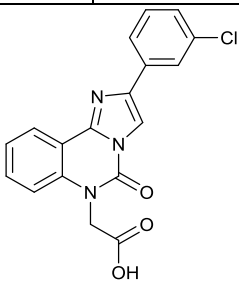
Method I: Acylation and coupling with diethylamine

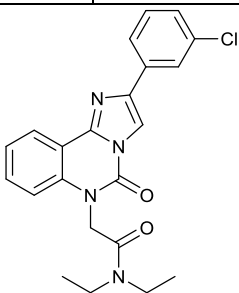
Desired carboxylic acid (1 eq) and HATU (1 eq) were stirred with DIEA (5 eq) in DMF for 15 min at rt. The deprotected dihydroquinolin-2-one **90** (1 eq) was added to the previous mixture and stirred for 1h at rt. Diethylamine (1.6 eq) was added to the reaction mixture and stirred for 10 min at rt then HATU (1 eq) was added and the reaction mixture was stirred for 1h at rt. Reaction mixture was diluted with 15 mL of water and extracted with 2x20 mL EtOAc. Organic phases were combined and washed with HCl 1N, NaHCO₃ sat, brine, dried on Na₂SO₄, filtered, concentrated under reduce pressure and purified over flash chromatography (20 to 100% EtOAc in heptane) to give the desired compound.

Method J: Buchwald cyclization/solid phase

Peptide linked to resin (20 mg, 1 eq), Pd, ligand and base were degassed 3 times with argon. Previously degassed solvent was added to the vessel and the mixture was heated for X hours. The reaction medium is transferred in a 1 mL solid phase syringe and filtered. Resin was washed successively with DMF (2 x 1 min), DCM (2 x 1 min), MeOH (2 x 1 min) and DCM (2 x 1 min) then cleaved using TFA with 3% TIS (2 x 15 min). Solvent was evaporated and the residue precipitated in Et₂O and directly passed on HPLC.

25a	N,N-diethyl-2-(5-oxo-2-phenylimidazo[1,2-c]quinazolin-6(5H)-yl)acetamide
	C ₂₂ H ₂₂ N ₄ O ₂ 374.44 g/mol FH0143
<p>25a was prepared following method A to give a white powder after purification on flash chromatography (281.1 mg, 80%).</p> <p>mp = 183-185°C</p> <p>t_R = 4.13 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.16 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 1.36 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 3.41-3.49 (m, 4H), 5.05 (s, 2H), 7.01 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.34 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.43-7.52 (m, 3H), 7.96 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 8.01 (s, 1H), 8.44 (dd, <i>J</i> = 1.5, 7.8 Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 13.2, 14.6, 41.1, 41.7, 45.1, 109.5, 113.9, 114.5, 124.0, 124.7, 126.1, 128.2, 128.9, 130.8, 133.2, 136.3, 143.4, 144.7, 146.2, 164.8.</p>	

33f	2-(2-(3-chlorophenyl)-5-oxoimidazo[1,2-c]quinazolin-6(5H)-yl)acetic acid
	C ₁₈ H ₁₂ ClN ₃ O ₃ 353.76 g/mol FH0686
<p>Ethyl 2-(2-(3-chlorophenyl)-5-oxoimidazo[1,2-c]quinazolin-6(5H)-yl)acetate (80 mg, 0.21 mmol, 1 eq) was heated under reflux in a mixture of acetic acid (1 mL) and HCl 6N (3 mL) for 3 h. After cooling, water was added and the precipitate was filtered and washed with water to give a pale beige powder (43 mg, 58%).</p> <p>t_R = 4.62 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 5.09 (s, 2H), 7.54 (m, 5H), 8.05 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.36 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 8.63 (s, 1H), 13.4 (br s, 1H).</p>	

25f	2-(2-(3-chlorophenyl)-5-oxoimidazo[1,2-c]quinazolin-6(5H)-yl)-N,N-diethylacetamide
	C ₂₂ H ₂₁ ClN ₄ O ₂ 408.89 g/mol FH0687

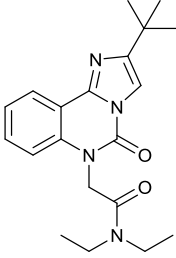
Following **method A**, **25f** was obtained as a beige solid without purification (45 mg, quant).

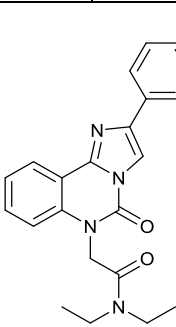
mp = 224-225°C

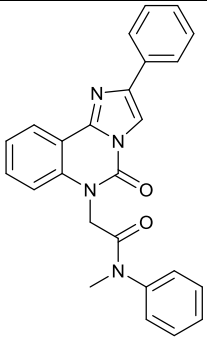
t_R = 4.56 min

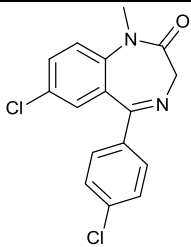
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.39 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 3.43-3.53 (m, 4H), 5.10 (s, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.29-7.39 (m, 3H), 7.53 (ddd, *J* = 1.55, 7.3, 8.8 Hz, 1H), 7.81 (dt, *J* = 1.4, 7.7 Hz, 1H), 7.99 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.45 (dd, *J* = 1.5, 7.8 Hz, 1H).

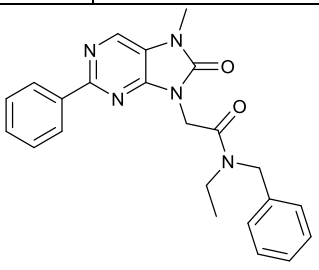
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 13.2, 14.7, 41.1, 41.7, 45.2, 110.1, 113.9, 114.6, 124.1, 124.2, 124.8, 126.2, 128.2, 130.2, 131.1, 135.0, 135.1, 136.5, 143.5, 143.7, 146.2, 164.7.

25j	2-(2-(tert-butyl)-5-oxoimidazo[1,2-c]quinazolin-6(5H)-yl)-N,N-diethylacetamide
	<p>C₂₀H₂₆N₄O₂ 354.45 g/mol FH0685</p>
<p>Following method B, product was obtained as a pure white powder after filtration (376 mg, 85%). mp = 179°C t_R = 3.60 min ¹H NMR (400 MHz, MeOD): 1.15 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 1.38-1.40 (m, 12H), 3.43 (q, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 3.59 (q, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 5.24 (s, 2H), 7.25 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 7.38 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.55-7.59 (m, 2H), 8.40 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, MeOD): 13.4, 14.5, 30.3, 33.3, 42.3, 43.0, 46.2, 109.2, 114.6, 116.4, 124.0, 125.1, 132.1, 137.9, 144.6, 147.6, 156.6, 167.6.</p>	

25c	N,N-diethyl-2-(2-(4-methoxyphenyl)-5-oxoimidazo[1,2-c]quinazolin-6(5H)-yl)acetamide
	<p>C₂₃H₂₄N₄O₃ 404.47 g/mol FH0689</p>
<p>Following method B, 25c was obtained as a pale beige powder after filtration (32 mg, 42%). mp = 204°C t_R = 11.14 min ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.15 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 1.36 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 3.44 (m, 4H), 3.85 (s, 3H), 5.05 (s, 2H), 6.97 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.02 (m, 1H), 7.33 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.48 (t, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.89 (m, 3H), 8.43 (m, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 13.2, 14.6, 29.9, 41.1, 41.7, 45.1, 55.5, 108.4, 114.3, 114.5, 123.9, 124.6, 125.9, 127.4, 130.7, 136.3, 143.3, 144.6, 146.2, 159.8, 164.9.</p>	

25n	N-methyl-2-(5-oxo-2-phenylimidazo[1,2-c]quinazolin-6(5H)-yl)-N-phenylacetamide
	C ₂₅ H ₂₀ N ₄ O ₂ 408.46 g/mol FH0428
<p>25n was obtained as a white powder following method A (37.6 mg, 98%).</p> <p>$t_R = 12.41$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.33 (s, 3H), 4.80 (s, 2H), 7.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.30-7.44 (m, 7H), 7.49-7.54 (m, 3H), 7.93 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.97 (s, 1H), 8.44 (dd, $J = 1.5, 7.8$ Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 38.0, 45.9, 109.4, 114.0, 114.3, 124.1, 124.7, 126.0, 127.2, 128.2, 128.9, 129.0, 130.5, 130.8, 133.1, 136.0, 142.3, 143.3, 144.7, 146.0, 165.9.</p>	

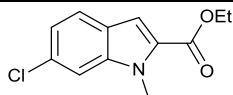
3	7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-1-methyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one
	C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O 319.19 g/mol FH0150
<p>Method B was applied to 37 (400 mg, 1.31 mmol, 1 eq) to give 3 as an orange crystalline solid (346.3 mg, 83%) after purification using flash chromatography (0 to 70% of EtOAc in heptane).</p> <p>$t_R = 4.34$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.37 (s, 3H), 3.75 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 4.81 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.51 (dd, $J = 2.5, 8.8$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 35.1, 57.1, 122.8, 128.8, 129.6, 129.8, 129.8, 130.9, 131.8, 136.7, 137.1, 142.8, 167.9, 169.9.</p>	

24	N-benzyl-N-ethyl-2-(7-methyl-8-oxo-2-phenyl-7,8-dihydro-9H-purin-9-yl)acetamide
	C ₂₃ H ₂₃ N ₅ O ₂ 401.47g/mol FH0250
<p>24 was obtained as a white powder following method A without further purification (253 mg, 83%).</p> <p>$t_R = 4.14$ min</p>	

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 3.36-3.45 (m, 5H), 4.59, 4.60 (2s, 2H), 4.76, 4.82 (2s, 2H), 7.32-7.45 (m, 8H), 8.14, 8.18 (2s, 1H), 8.32-8.35 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 12.6, 13.9, 14.2, 21.0, 27.4, 27.4, 19.7, 40.8, 41.3, 41.4, 41.8, 48.8, 49.9, 60.4, 122.1, 122.1, 126.3, 127.5, 127.7, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 128.6, 129.1, 129.8, 131.8, 131.9, 136.1, 137.1, 137.9, 149.9, 1450.0, 157.8, 157.9, 165.4, 165.4, 171.1.

47 ethyl 6-chloro-1-methyl-1H-indole-2-carboxylate



C₁₂H₁₂ClNO₂
236.68 g/mol
FH0130

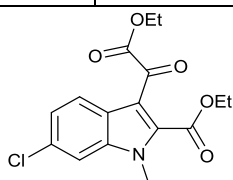
Mel (150 μL, 2.41 mmol, 2 eq) was added to a solution of ethyl 6-chloro-1H-indole-2-carboxylate (270 mg, 1.2 mmol, 1 eq) and K₂CO₃ (417.1 mg, 3.0 mmol, 2.5 eq) in DMF (5 mL). After 2h stirring at rt, ice and water were added to the mixture and stirred for 1h. The precipitate was filtered and washed with water to give **47** as a brown solid (271 mg, 94%).

t_R = 5.09 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 4.04 (s, 3H), 4.37 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.11 (dd, *J* = 1.8, 8.5 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 14.6, 31.9, 60.9, 110.3, 110.4, 121.7, 123.7, 124.6, 129.0, 131.2, 140.1, 162.1.

48 ethyl 6-chloro-3-(2-ethoxy-2-oxoacetyl)-1-methyl-1H-indole-2-carboxylate



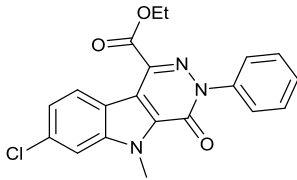
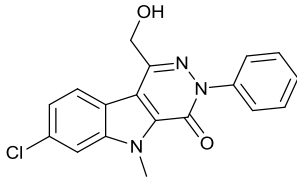
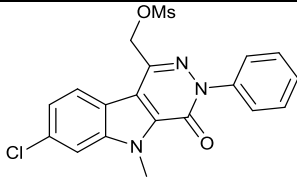
C₁₆H₁₆ClNO₅
337.76 g/mol
FH0133

A solution of TiCl₄ (1M in DCM, 0.93 mL, 0.93 mmol, 1.11 eq) and ethyl oxalyl monochloride (103.6 μL, 0.92 mmol, 1.1 eq) in DCM (8 mL) was stirred at rt for 30 min then **47** (200 mg, 0.84 mmol, 1 eq) was added and the reaction mixture was stirred for 4h at rt. Reaction mixture was then cooled in an ice bath and DCM and water were added (8 mL each). Organic and aqueous phases were separated then organic phase was washed with brine and concentrated under reduced pressure. The residue was purified over flash chromatography (0 to 70% of EtOAc in heptane) to give **48** as a brown powder (226.4 mg, 80%).

t_R = 4.61 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.38 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 3.97 (s, 3H), 4.31-4.39 (m, 4H), 7.29 (dd, *J* = 1.8, 8.7 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H).

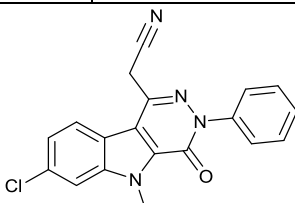
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 14.1, 14.2, 32.4, 62.5, 62.6, 110.7, 115.1, 123.8, 124.5, 124.9, 132.1, 134.5, 138.2, 1360.9, 163.1, 181.8.

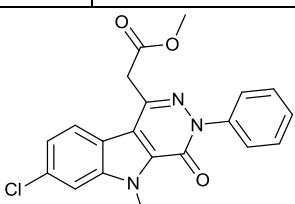
49	Ethyl 7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-b]indole-1-carboxylate
	$C_{20}H_{16}ClN_3O_3$ 381.82 g/mol FH0135
<p>Phenylhydrazine (193.9 μL, 1.95 mmol, 3 eq) was added to a solution of 48 (220 mg, 0.65 mmol, 1 eq) in acetic acid (6 mL) and stirred in a sealed vessel for 30 min at rt and heated 1.5 h at 135°C. The reaction mixture was completed with 10 mL of DCM then poured in a $NaHCO_3$ sat solution. Organic phase was separated then washed with water then brine. After removal of volatiles, the residue was purified using flash chromatography (0 to 70% of EtOAc in heptane) to give 49 as a brown powder (204.1 mg, 82%).</p> <p>t_R = 5.36 min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.47 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 4.34 (s, 3H), 4.54 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 7.36 (dd, J = 1.8, 8.8 Hz, 1H), 7.42-7.54 (m, 4H), 7.67 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 8.64 (d, J = 8.9 Hz, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 14.5, 32.1, 62.5, 110.5, 116.0, 118.5, 123.5, 126.4, 127.0, 128.6, 129.1, 131.8, 134.3, 135.1, 141.4, 142.0, 155.5, 164.2</p>	
50	7-chloro-1-(hydroxymethyl)-5-methyl-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indol-4-one
	$C_{18}H_{14}ClN_3O_2$ 339.78 g/mol FH0140
<p>Anhydrous methanol (111 μL, 2.75 mmol, 5.25 eq) and $NaBH_4$ (123.8 mg, 3.27 mmol, 6.25 eq) were added to a solution of 49 (200 mg, 0.52 mmol, 1 eq) in anhydrous THF (8 mL) and heated overnight at 70°C. The reaction mixture was poured on 50 mL HCl 1N solution and the white precipitate was extracted by 2x50 mL DCM. Organic phases were combined, dried over Na_2SO_4, filtered then concentrated under reduced pressure. The residue was purified on flash chromatography (0 to 70% of EtOAc in heptane) to afford 50 as a white solid (137.4 mg, 77%).</p> <p>t_R = 4.38 min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 4.30 (s, 3H), 5.12 (s, 2H), 7.39 (dd, J = 1.8, 8.5 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.48-7.52 (m, 3H), 7.61 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.98 (d, J = 8.5 Hz, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 32.0, 62.9, 111.0, 115.6, 118.6, 123.6, 124.2, 126.4, 128.4, 129.0, 131.6, 133.9, 141.6, 141.7, 143.6, 155.6.</p>	
51	(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-b]indol-1-yl)methyl methanesulfonate
	$C_{19}H_{16}ClN_3O_4S$ 417.86 g/mol FH0144

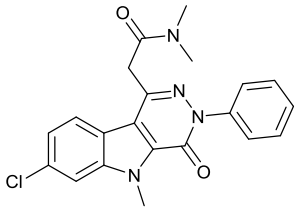
Triethylamine (91.6 μ L, 0.66 mmol, 1.6 eq) then MsCl (44.6 μ L, 0.58 mmol, 1.4 eq) were added at 0°C to a solution of **50** (140 mg, 0.41 mmol, 1 eq) in DCM (10 mL) and allowed to slowly return to rt. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the white residue was dried under vacuum for 2h and directly dissolved in next step after ^1H NMR (with traces of triethylamine).

t_R = 4.38 min

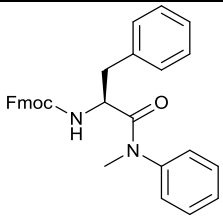
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 2.77 (s, 3H), 4.34 (s, 3H), 5.60 (s, 2H), 7.40-7.44 (m, 2H), 7.48-7.52 (m, 2H), 7.57-7.61 (m, 3H), 8.09 (d, 8.7 Hz, 1H).

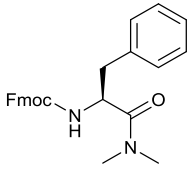
52	2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-b]indol-1-yl)acetonitrile
	$\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}$ 348.79 g/mol FH0145
<p>NaCN (40.4 mg, 0.82 mmol, 2 eq) was added to a solution of 51 (172.2 mg, 0.41 mmol, 1 eq) in DMSO (2 mL) then heated overnight at 70°C. Water (5 mL) was added to the mixture and the white precipitate was filtered and washed with water to give 52 as a white powder after drying (105.7 mg, 74%).</p> <p>t_R = 4.46 min</p> <p>^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 4.30 (s, 3H), 4.73 (s, 2H), 7.43-7.63 (m, 6H), 8.03 (s, 1H), 8.18 (d, J = 8.7 Hz, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 27.8, 31.8, 111.7, 114.8, 116.5, 117.7, 122.7, 123.8, 126.3, 127.9, 128.6, 130.8, 132.3, 136.0, 140.9, 141.4, 154.2.</p>	

53	Methyl 2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-b]indol-1-yl)acetate
	$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_3$ 381.82 g/mol FH0146
<p>Gaseous HCl was bubbled in a solution of 52 (105.7 mg, 0.30 mmol, 1 eq) in methanol (25 mL). The reaction mixture was heated under reflux for 2h. Reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was washed with water and brine then dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated. The residue was purified on flash chromatography (0 to 70% of EtOAc in heptane) to afford 53 as a white powder (71.6 mg, 62%).</p> <p>t_R = 4.55 min</p> <p>^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 3.72 (s, 3H), 4.17 (s, 2H), 4.34 (s, 3H), 7.36 (dd, J = 1.8, 7.5 Hz, 1H), 7.40 (m, 1H), 7.50 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.55 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.85 (d, J = 8.5 Hz, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 31.9, 40.3, 52.7, 111.1, 117.1, 118.9, 122.9, 123.5, 126.4, 128.2, 128.9, 131.6, 133.7, 139.0, 141.6, 141.7, 155.4, 170.1.</p>	

20	2-(7-chloro-5-methyl-4-oxo-3-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyridazino[4,5-b]indol-1-yl)-N,N-dimethylacetamide
	$C_{21}H_{19}ClN_4O_2$ 394.86 g/mol FH0147
<p>Dimethylamine (2M in THF, 1.5 mL, 3 mmol, 16 eq) was added at 0°C to a solution of $AlMe_3$ (2M in heptane, 1.5 mL, 3 mmol, 16 eq) in toluene (22.5 mL) and stirred 30 min at rt then 53 (71.6 mg, 0.19 mmol, 1 eq) was added and the vessel was sealed then refluxed at 125°C for 4h. After cooling, water and DCM were added and filtered to remove precipitate. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the residue dissolved in DCM. Organic phase was washed with HCl 1N, water, brine, dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified on flash chromatography (EtOAc 20 to 100% in heptane) to afford SSR-180,575 as a white powder (58.5 mg, 79%).</p> <p>$t_R = 4.04$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 2.99 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 4.19 (s, 2H), 4.32 (s, 3H), 7.34 (dd, $J = 1.9, 8.7$ Hz, 1H), 7.39 (m, 1H), 7.49 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.94 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 31.9, 35.9, 37.9, 39.9, 110.9, 117.7, 119.2, 123.3, 123.6, 126.4, 128.1, 128.9, 131.5, 133.5, 140.6, 141.6, 141.9, 155.5, 168.6.</p>	

Phe

57a	(9H-fluoren-9-yl)methyl (S)-(1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate
	$C_{31}H_{28}N_2O_3$ 476.57 g/mol FH0003
<p>57a was obtained as a white solid following method E (207 mg, 67%).</p> <p>$t_R = 4.25$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 2.76 (B of ABX, $J_{AB} = 13.2$ Hz, $J_{BX} = 6.9$ Hz, 1H), 2.92 (A of ABX, $J_{AB} = 13.2$ Hz, $J_{AX} = 7.5$ Hz, 1H), 3.22 (s, 3H), 4.15-4.36 (m, 3H), 4.59 (X of ABX, $J_{AX} = 7.5$ Hz, $J_{BX} = 6.9$ Hz, 1H), 5.49 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.83 (br s, 2H), 6.93 (m, 2H), 7.22 (m, 3H), 7.29-7.35 (m, 5H), 7.39 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.55 (m, 2H), 7.75 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 37.8, 39.9, 47.33, 52.9, 67.1, 120.1, 125.3, 125.4, 127.1, 127.2, 127.5, 127.9, 128.3, 128.6, 129.6, 129.9, 136.5, 141.5, 142.6, 144.1, 144.1, 155.6, 171.7.</p>	

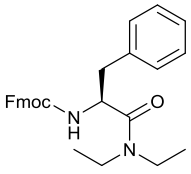
57b	(9H-fluoren-9-yl)methyl (S)-(1-(dimethylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate
	$C_{26}H_{26}N_2O_3$ 414.50 g/mol FH0045

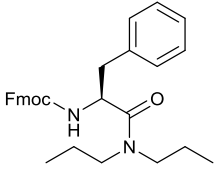
57b was obtained as a white solid following **method E** (201 mg, 75%).

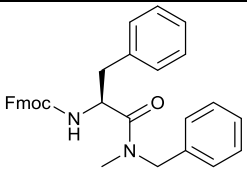
$t_R = 4.65$ min

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 2.64 (s, 3H), 2.88 (s, 3H), 2.96-3.06 (m, A and B of ABX, 2H), 4.19 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.29-4.39 (m, 2H), 4.90 (m, X of ABX, 1H), 5.82 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.18-7.33 (m, 7H), 7.40 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.57-7.60 (m, 2H), 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 35.9, 37.1, 40.2, 47.4, 52.2, 67.3, 120.2, 125.4, 125.4, 127.3, 127.9, 128.7, 129.6, 136.3, 141.5, 144.1, 155.9, 171.7.

57c	(9H-fluoren-9-yl)methyl (S)-(1-(diethylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate
	$\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$ 442.56 g/mol FH0026
<p>57c was obtained as a white solid following method E (251.7 mg, 88%).</p> <p>^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 0.99 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.06 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 2.91-3.11 (m, 5H), 3.55 (B of ABX, $J_{AB} = 13.6$ Hz, $J_{BX} = 6.9$ Hz, 1H), 4.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.27-4.41 (m, 2H), 4.80 (X of ABX, $J_{AX} = 8.2$ Hz, $J_{BX} = 6.9$ Hz, 1H), 4.68 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.19-7.33 (m, 7H), 7.40 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.57-7.60 (m, 2H), 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 12.8, 14.2, 40.4, 40.5, 41.6, 47.2, 51.9, 66.9, 119.9, 125.1, 125.2, 126.9, 127.0, 128.4, 129.6, 136.3, 141.3, 143.9, 159.3, 170.5.</p>	

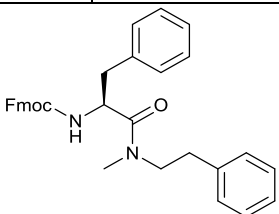
57d	(9H-fluoren-9-yl)methyl (S)-(1-(dipropylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate
	$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3$ 470.61 g/mol FH0006
<p>57d was obtained as a white solid following method E (229 mg, 75%).</p> <p>$t_R = 4.48$ min</p> <p>^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 0.81 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.86 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.30-1.51 (m, 4H), 2.80-3.07 (m, 5H), 3.43 (m, 1H), 4.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.27-4.41 (m, 2H), 4.83 (m, X of ABX, 1H), 5.65 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.20-7.33 (m, 7H), 7.40 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.56-7.58 (m, 2H), 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 11.3, 20.9, 22.4, 40.6, 47.4, 48.3, 49.5, 52.2, 67.1, 120.1, 125.3, 125.4, 127.1, 127.3, 127.9, 128.6, 129.7, 136.5, 141.5, 144.1, 155.7, 171.1.</p>	

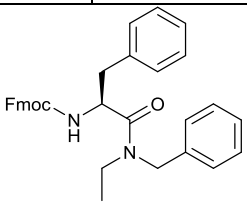
57e	(9H-fluoren-9-yl)methyl (S)-(1-(benzyl(methyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate
	$\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$ 490.60 g/mol FH0002
<p>57e was obtained as a white solid following method E (321.9 mg, 85%).</p>	

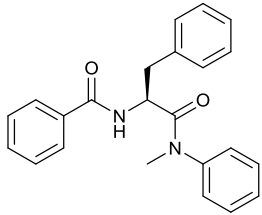
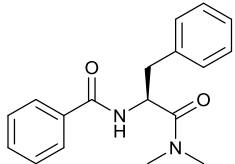
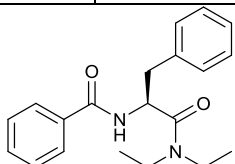
$t_R = 4.36$ min

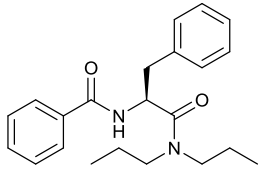
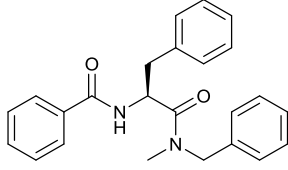
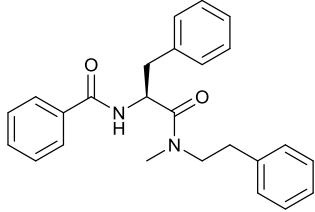
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.66, 2.88 (2s, 3H), 3.04-3.08 (2d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.11-4.45 (m, 4H), 4.64 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 4.97 (m, 1H), 5.67-5.78 (2d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.99-7.36 (m, 12H), 7.43 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.59-7.64 (m, 2H), 7.79 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H).

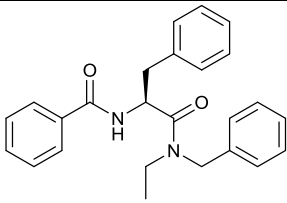
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 33.9, 34.5, 39.9, 40.2, 47.2, 51.3, 52.1, 52.1, 53.0, 67.1, 120.0, 125.2, 125.2, 126.7, 127.0, 127.1, 127.5, 127.7, 127.8, 128.2, 128.5, 128.6, 128.6, 128.9, 129.5, 129.6, 136.1, 136.3, 136.4, 141.3, 143.9, 143.9, 155.6, 155.7, 171.5, 171.8.

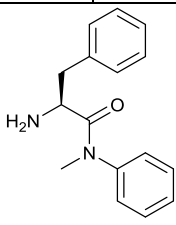
57f	(9H-fluoren-9-yl)methyl (S)-(1-(methyl(phenethyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate
	$\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$ 504.63 g/mol FH0004
<p>57f was obtained as a white solid following method E (64.6mg, 20%).</p> <p>$t_R = 4.46$ min</p> <p>$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.57-3.01 (m, 7H), 3.16-3.66 (m, 2H), 4.17-4.43 (m, 3H), 4.75-4.91 (m, 1H), 5.57, 5.70 (2d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.08-7.36 (m, 12H), 7.43 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.58-7.63 (m, 2H), 7.79 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H).</p> <p>$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 14.4, 33.7, 34.2, 35.0, 40.2, 40.4, 47.4, 47.4, 50.4, 51.4, 52.1, 52.2, 60.6, 67.2, 67.2, 120.2, 120.4, 124.6, 125.3, 125.4, 125.4, 125.5, 126.7, 126.9, 127.2, 127.3, 127.9, 128.7, 128.7, 125.9, 128.9, 129.0, 129.6, 126.7, 129.7, 136.4, 136.6, 138.9, 141.5, 144.1, 144.1, 155.7, 155.9, 171.3, 171.4.</p>	

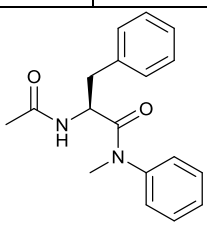
57g	(9H-fluoren-9-yl)methyl (S)-(1-(benzyl(ethyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate
	$\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$ 504.63 g/mol FH0005
<p>57g was obtained as a white solid following method E (164.9mg, 51%).</p> <p>$t_R = 4.49$ min</p> <p>$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 0.99, 1.05 (2t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 3.00-3.09 (m, 3H), 4.07-4.41 (m, 5H), 4.79-4.94 (m, 2H), 5.67 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.99-7.33 (m, 12H), 7.40 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.56-7.60 (m, 2H), 7.77 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H).</p> <p>$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 12.5, 13.9, 40.4, 40.5, 41.3, 41.7, 47.4, 48.4, 50.4, 52.2, 52.4, 67.2, 67.2, 120.2, 125.3, 125.4, 126.9, 127.2, 127.2, 127.3, 127.6, 127.9, 128.4, 128.8, 129.1, 129.7, 129.8, 146.937, 136.5, 137.2, 141.5, 141.5, 144.1, 144.1, 148.6, 155.7, 155.8, 157.3, 171.6.</p>	

55a	(S)-N-(1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)benzamide	 <p data-bbox="842 237 1007 349"> $C_{23}H_{22}N_2O_2$ 358.44 g/mol FH0017 </p>
<p data-bbox="225 488 1094 517">55a was obtained as a pale white oil following method F (21.7 mg, 93%).</p> <p data-bbox="225 528 379 557">$t_R = 3.28$ min</p> <p data-bbox="225 568 1437 674">1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 2.88 (B of ABX, $J_{AB} = 13.2$ Hz, $J_{BX} = 6.4$ Hz, 1H), 3.00 (A of ABX, $J_{AB} = 13.2$ Hz, $J_{AX} = 7.7$ Hz, 1H), 3.24 (s, 3H), 5.04 (X of ABX, $J_{AX} = 7.7$ Hz, $J_{BX} = 6.4$ Hz, 1H), 6.90 (m, 2H), 6.99 (m, 2H), 7.23 (m, 3H), 7.34-7.48 (m, 6H), 7.74 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H).</p> <p data-bbox="225 685 1437 745">^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 37.9, 39.5, 51.7, 127.1, 127.3, 127.5, 128.4, 128.6, 128.7, 129.6, 130.0, 131.8, 134.3, 136.5, 142.6, 166.7, 171.8.</p>		
55b	(S)-N-(1-(dimethylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)benzamide	 <p data-bbox="842 869 1007 981"> $C_{18}H_{20}N_2O_2$ 296.37 g/mol FH0051 </p>
<p data-bbox="225 1070 1102 1099">55b was obtained as a white powder following method F (24.7 mg, 80%).</p> <p data-bbox="225 1111 379 1140">$t_R = 3.63$ min</p> <p data-bbox="225 1151 1437 1211">1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 2.67 (s, 3H), 2.89 (s, 3H), 3.05-3.18 (m, 2H, A and B of ABX), 5.35 (X of ABX, 1H), 7.14 (br s, 1H), 7.21-7.29 (m, 5H), 7.40-7.51 (m, 3H), 7.77-7.79 (m, 2H).</p> <p data-bbox="225 1223 1437 1283">^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 35.8, 37.1, 40.1, 50.8, 127.3, 128.7, 128.7, 129.7, 131.8, 134.3, 136.5, 140.1, 166.7, 171.4.</p>		
55c	(S)-N-(1-(diethylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)benzamide	 <p data-bbox="842 1413 1007 1525"> $C_{20}H_{24}N_2O_2$ 324.42 g/mol FH0039 </p>
<p data-bbox="225 1619 1078 1648">55c was obtained as a white powder following method F (28 mg, 90%).</p> <p data-bbox="225 1659 379 1688">$t_R = 3.94$ min</p> <p data-bbox="225 1700 1437 1805">1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.02 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.07 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 2.98-3.19 (m, 5H), 3.57 (B of ABX, $J_{AB} = 13.6$ Hz, $J_{BX} = 7.0$ Hz, 1H), 5.29 (X of ABX, $J_{BX} = 7.0$ Hz, 1H), 7.19-7.29 (m, 6H), 7.40-7.51 (m, 3H), 7.80 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H).</p> <p data-bbox="225 1816 1437 1877">^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 12.8, 14.1, 40.1, 40.6, 41.7, 50.6, 127.0, 127.1, 128.4, 128.4, 128.5, 129.6, 131.6, 136.3, 166.4, 170.6.</p>		

55d	(S)-N-(1-(dipropylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)benzamide	 <p data-bbox="842 237 1007 349"> $C_{22}H_{28}N_2O_2$ 342.48 g/mol FH0022 </p>
<p data-bbox="225 439 1094 470">55d was obtained as a pale white oil following method F (14.3 mg, 48%).</p> <p data-bbox="225 479 379 510">$t_R = 4.33$ min</p> <p data-bbox="225 519 1439 622">1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 0.80-0.88 (m, 6H), 1.38-1.55 (m, 4H), 2.84-3.17 (m, 5H), 3.45-3.51 (m, 1H), 5.29 (m, 1H), 7.07 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.21-7.29 (m, 5H), 7.42 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.47-7.51 (m, 1H), 7.77 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H).</p> <p data-bbox="225 631 1439 698">^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 11.1, 11.5, 25.1, 25.2, 40.0, 48.2, 49.3, 50.7, 126.9, 127.1, 128.4, 128.5, 132.9, 133.4, 133.9, 136.3, 166.4, 171.1.</p>		
55e	(S)-N-(1-(benzyl(methyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)benzamide	 <p data-bbox="842 824 1007 936"> $C_{24}H_{24}N_2O_2$ 372.47 g/mol FH0010 </p>
<p data-bbox="225 1025 1094 1057">55e was obtained as a pale white oil following method F (24.8 mg, 78%).</p> <p data-bbox="225 1066 379 1097">$t_R = 3.42$ min</p> <p data-bbox="225 1106 1439 1209">1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 2.69, 2.87 (2s, 3H), 3.13-3.17 (m, 2H, A and B of ABX), 4.18, 4.41 (2d, A of AB, $J_{AB} = 14.6$ Hz, 1H), 4.34, 4.63 (2d, B of AB, $J_{AB} = 14.6$ Hz, 1H), 5.39-5.43 (m, X of ABX, 1H), 6.99-7.32 (m, 11H), 7.42-7.51 (m, 3H), 7.77, 7.81 (2d, $J = 7.2$ Hz, 2H).</p>		
55f	(S)-N-(1-(methyl(phenethyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)benzamide	 <p data-bbox="842 1330 1007 1442"> $C_{25}H_{26}N_2O_2$ 386.49 g/mol FH0018 </p>
<p data-bbox="225 1576 1094 1608">55f was obtained as a pale white oil following method F (16.2 mg, 91%).</p> <p data-bbox="225 1617 379 1648">$t_R = 3.55$ min</p> <p data-bbox="225 1657 1439 1760">1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 2.53-2.83 (m, 2H), 2.71, 2.88 (2s, 3H), 3.01-3.12 (m, 2H), 3.32-3.59 (m, 2H), 5.21-5.37 (m, 1H), 7.09-7.32 (m, 10H), 7.39-7.50 (m, 3H), 7.76-7.81 (m, 2H), 8.11 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H).</p> <p data-bbox="225 1769 1439 1872">^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 29.7, 33.4, 34.1, 34.7, 35.7, 39.5, 39.8, 50.3, 50.6, 50.7, 51.3, 126.5, 126.7, 127.0, 127.1, 127.1, 128.4, 128.5, 128.5, 128.6, 128.7, 128.8, 129.5, 129.6, 130.1, 131.6, 131.6, 133.5, 133.9, 136.2, 136.4, 137.7, 138.6, 166.6, 171.3.</p>		

55g	(S)-N-(1-(benzyl(ethyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)benzamide
	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₂ 386.49 g/mol FH0021
<p>55g was obtained as a pale white oil following method F (25.7 mg, 94%).</p> <p>t_R = 3.60 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.01-1.07 (m, 3H), 3.10-3.21 (m, 4H), 4.19, 4.29 (2d, A of AB, <i>J</i>_{AB} = 14.8 Hz, 1H), 4.35, 4.82 (2d, B of AB, <i>J</i>_{AB} = 14.8 Hz, 1H), 5.31-5.44 (m, 1H), 7.02-7.29 (m, 11H), 7.41-7.51 (m, 3H), 7.77-7.82 (m, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 12.5, 13.9, 29.9, 40.0, 40.2, 41.3, 41.8, 48.5, 50.5, 50.8, 51.2, 127.0, 127.2, 127.2, 127.3, 127.7, 127.9, 128.4, 128.6, 1228.9, 129.1, 129.8, 129.9, 130.3, 131.8, 131.9, 133.6, 136.4, 137.1, 163.2, 166.8, 171.7, 171.8.</p>	

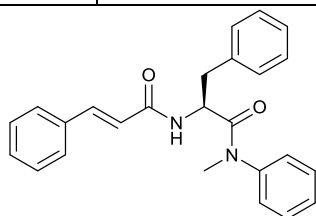
58a	(S)-2-amino-N-methyl-N,3-diphenylpropanamide
	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O 254.33 g/mol FH0067
<p>DBU (62.7 μL, 0.42 mmol, 2 eq) was added to a solution of 57a (100 mg, 0.21 mmol, 1 eq) in DCM (2 mL) and the reaction mixture was stirred for 2h at rt. After completion, solvent was removed under vacuum then the residue was directly purified over silica gel column chromatography (1 to 5% MeOH in DCM) to give the desired free amine which was only characterized by ¹H NMR and HPLC then was directly used in next step (53.4 mg, quant.).</p> <p>t_R = 1.31 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.59 (A of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.1 Hz, <i>J</i>_{AX} = 7.4 Hz, 1H), 2.93 (B of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.1 Hz, <i>J</i>_{BX} = 6.8 Hz, 1H), 3.22 (s, 3H), 3.55 (X of ABX, <i>J</i>_{AX} = 7.4 Hz, <i>J</i>_{BX} = 6.8 Hz, 1H), 6.83-6.92 (m, 3H), 7.21-7.26 (m, 4H), 7.33-7.35 (m, 3H).</p>	

55h	(S)-2-acetamido-N-methyl-N,3-diphenylpropanamide
	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₂ 296.37 g/mol FH0068
<p>Acetic anhydride (18.5 μL, 0.2 mmol, 2 eq) was added at 0°C to a solution of 58a (25 mg, 0.1 mmol, 1 eq) and DIEA (48.7 μL, 0.3 mmol, 3 eq) in DCM (2 mL) and stirred overnight at rt. After removal of volatiles under vacuum, the residue was solubilized in EtOAc and organic phase was washed twice with HCl 1N, NaHCO₃ sat, brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford 55h as a colorless oil (18.8 mg, 65%).</p>	

$t_R = 3.62$ min

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1.94 (s, 3H), 2.75 (B of ABX, $J_{AB} = 13.2$ Hz, $J_{BX} = 6.5$ Hz, 1H), 2.91 (A of ABX, $J_{AB} = 13.2$ Hz, $J_{AX} = 7.9$ Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 4.81 (X of ABX, $J_{AX} = 7.9$ Hz, $J_{BX} = 6.5$ Hz, 1H), 6.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.80 (br s, 2H), 6.92-6.94 (m, 2H), 7.21-7.23 (m, 3H), 7.29-7.33 (m, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 23.4, 37.8, 39.5, 51.3, 127.0, 127.4, 128.3, 128.6, 129.6, 129.9, 136.5, 142.5, 169.4, 171.8.

55i (S)-N-(1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)cinnamamide

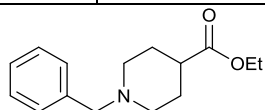
$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$
384.48 g/mol
FH0069

Cinnamoyl chloride (17.9 mg, 0.11 mmol, 1.1 eq) was added at 0°C to a solution of **58a** (26 mg, 0.1 mmol, 1 eq) in DCM (2 mL) and stirred overnight at rt. After removal of volatiles under vacuum, the residue was solubilized in EtOAc and organic phase was washed twice with HCl 1N, NaHCO_3 sat, brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure and purified over flash chromatography (0 to 70% EtOAc in heptane) to give **55i** as a colorless oil (38.2 mg, 97%).

 $t_R = 4.34$ min

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.84 (B of ABX, $J_{AB} = 13.2$ Hz, $J_{BX} = 6.3$ Hz, 1H), 2.97 (A of ABX, $J_{AB} = 13.2$ Hz, $J_{AX} = 7.8$ Hz, 1H), 3.23 (s, 3H), 4.97 (X of ABX, $J_{AX} = 7.8$ Hz, $J_{BX} = 6.3$ Hz, 1H), 6.39-6.45 (m, 2H), 6.84 (br s, 2H), 6.97-6.99 (m, 2H), 7.22-7.24 (m, 3H), 7.33-7.37 (m, 6H), 7.46-7.49 (m, 2H), 7.57 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 37.9, 39.6, 51.5, 120.6, 127.1, 127.5, 128.0, 128.3, 128.6, 129.0, 129.6, 129.9, 130.0, 135.0, 136.5, 141.5, 142.6, 165.2, 171.7.

133 ethyl 1-benzylpiperidine-4-carboxylate

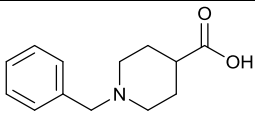
$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_2$
247.34 g/mol
FH0070

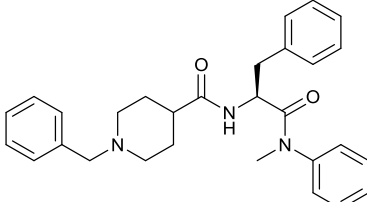
Benzyl chloride (182 μL , 1.58 mmol, 1 eq) was slowly added at 0°C to a solution of ethyl isopropylate (243.5 μL , 1.58 mmol, 1 eq) and TEA (329 μL , 2.37 mmol, 1.5 eq) in toluene (4 mL) then heated overnight at 70°C . After removal of volatiles under vacuum, the residue was solubilized in EtOAc and organic phase was washed twice with HCl 1N, NaHCO_3 sat, brine, dried over Na_2SO_4 , filtered, concentrated under reduced pressure and purified over flash chromatography (0 to 70% EtOAc in heptane) to give **133** as a yellow oil (308.8 mg, 79%).

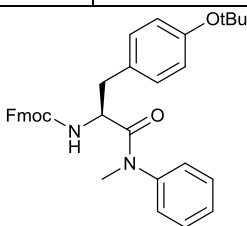
 $t_R = 2.69$ min

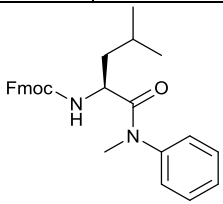
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.71-1.89 (m, 4H), 2.02 (td, $J = 2.5, 11.4$ Hz, 2H), 2.24-2.30 (m, 1H), 2.85 (d, $J = 11.7$ Hz, 2H), 3.49 (s, 2H), 4.12 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.23-7.26 (m, 1H), 7.30-7.31 (m, 4H).

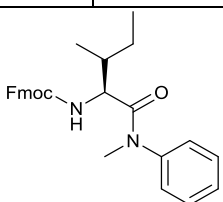
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 14.4, 28.5, 41.5, 53.2, 60.4, 53.5, 127.2, 128.4, 129.3, 138.7, 175.5.

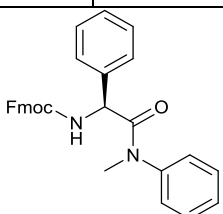
134	1-benzylpiperidine-4-carboxylic acid
	C ₁₃ H ₁₇ NO ₂ 219.28 g/mol FH0071
<p>NaOH (48 mg, 1.2 mmol, 2 eq) was added to a solution of 133 (150 mg, 0.6 mmol, 1 eq) in MeOH (1 mL) and water (2 mL) and stirred for 3h at rt. HCl 2N was added dropwise until pH 6 then mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was solubilized in MeOH and filtered over a silica pad. The filtrate was evaporated to give 134 as a yellow oil (133 mg, quant.).</p> <p>$t_R = 2.12$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 1.50 (qd, <i>J</i> = 3.1, 11.8 Hz, 2H), 1.72 (dd, <i>J</i> = 2.1, 12.7 Hz, 2H), 1.92 (t, <i>J</i> = 11.3 Hz, 2H), 1.97-2.04 (m, 1H), 2.71 (d, <i>J</i> = 11.2 Hz, 2H), 3.40 (s, 2H), 7.22-7.30 (m, 5H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 28.7, 47.8, 52.8, 62.5, 126.7, 128.1, 128.7, 138.6, 178.1.</p>	

55j	(S)-1-benzyl-N-(1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)piperidine-4-carboxamide
	C ₂₉ H ₃₃ N ₃ O ₂ 455.60 g/mol FH0121
<p>134 (13.8 mg, 0.063 mmol, 1.2 eq) was reacted with 58a (13.3 mg, 0.052 mmol, 1 eq) following method E to give 55j as a yellow oil (23.9 mg, quant.).</p> <p>$t_R = 3.45$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.68-1.77 (m, 4H), 1.99-2.08 (m, 3H), 2.69 (B of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.3 Hz, <i>J</i>_{BX} = 7.0 Hz, 1H), 2.87 (A of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.2 Hz, <i>J</i>_{AX} = 7.2 Hz, 1H), 2.93 (m, 2H), 3.21 (s, 3H), 3.52 (s, 2H), 4.85 (X of ABX, <i>J</i>_{AX} = 7.2 Hz, <i>J</i>_{BX} = 7.0 Hz, 1H), 6.2 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 6.87-6.90 (m, 3H), 7.19 (m, 3H), 7.24-7.36 (m, 9H).</p> <p>LC-MS calcd : 455.2, Found [M+H] : 456.2</p>	

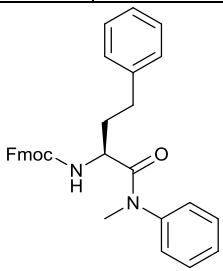
57k	(9H-fluoren-9-yl)methyl (S)-(3-(4-(tert-butoxy)phenyl)-1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate
	C ₃₅ H ₃₆ N ₂ O ₄ 548.68 g/mol FH0024
<p>57k was obtained as a white solid following method E (244.2 mg, 82%).</p> <p>$t_R = 4.48$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.10 (s, 9H), 2.73 (B of ABX, <i>J</i>_{AB} = 12.8 Hz, <i>J</i>_{BX} = 6.7 Hz, 1H), 2.90 (A of ABX, <i>J</i>_{AB} = 12.8 Hz, <i>J</i>_{AX} = 8.0 Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 4.17 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 4.24-4.35 (m, 2H), 4.53 (X of ABX, <i>J</i>_{AX} = 8.0 Hz, <i>J</i>_{BX} = 6.7 Hz, 1H), 5.47 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H), 6.79-6.84 (m, 6H), 7.31 (m, 5H), 7.40 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 7.56 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 7.75 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H).</p>	

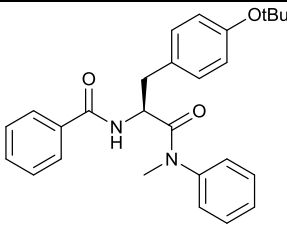
57l	(9H-fluoren-9-yl)methyl (S)-(4-methyl-1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxopentan-2-yl)carbamate
	C ₂₈ H ₃₀ N ₂ O ₃ 442.56 g/mol FH0105
<p>57l was obtained as a white powder following method A (165.4 mg, 88%).</p> <p>t_R = 5.01 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.38 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 3H), 0.72 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz, 3H), 1.21 (m, 1H), 1.39-1.48 (m, 2H), 3.25 (s, 3H), 4.17 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 4.29-4.32 (m, 2H), 4.46 (td, <i>J</i> = 2.9, 10.2 Hz, 1H), 5.54 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 7.21-7.29 (m, 4H), 7.31-7.36 (m, 3H), 7.41 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.57 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 7.70 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 20.7, 23.4, 14.4, 37.7, 42.4, 47.2, 50.0, 66.9, 119.9, 120.0, 125.2, 127.0, 127.6, 127.7, 128.3, 129.9, 141.3, 142.7, 143.9, 144.0, 156.2, 173.1.</p>	

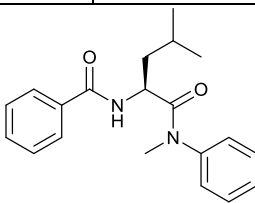
57m	(9H-fluoren-9-yl)methyl ((2S,3R)-3-methyl-1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxopentan-2-yl)carbamate
	C ₂₈ H ₃₀ N ₂ O ₃ 442.56 g/mol FH0107
<p>57m was obtained as a white powder following method A (163.3 mg, 87%).</p> <p>t_R = 5.02 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.73 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H), 0.77 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H), 0.93-1.01 (m, 1H), 1.40-1.47 (m, 1H), 1.58-1.63 (m, 1H), 3.31 (s, 3H), 4.22 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1H), 4.29-4.42 (m, 3H), 5.40 (d, <i>J</i> = 9.8 Hz, 1H), 7.24 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 7.30-7.47 (m, 7H), 7.61 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 7.76 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 11.5, 15.9, 24.2, 38.0, 38.6, 47.5, 55.7, 67.1, 120.2, 120.2, 125.4, 125.4, 127.3, 127.8, 127.9, 127.9, 128.3, 130.0, 141.5, 144.1, 156.2, 172.4.</p>	

57n	(9H-fluoren-9-yl)methyl (S)-(2-(methyl(phenyl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)carbamate
	C ₃₀ H ₂₆ N ₂ O ₃ 461.55 g/mol FH0084
<p>57n was obtained as a white powder following method E (100.3 mg, 81%).</p> <p>t_R = 4.94 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.29 (s, 3H), 4.15-4.35 (m, 3H), 5.32 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 6.19 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 6.99 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 7.19-7.39 (m, 12H), 7.55 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 7.74 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 38.2, 47.3, 56.3, 67.2, 120.1, 125.4, 127.2, 127.8, 128.0, 128.1, 128.4,</p>	

128.6, 128.8, 129.9, 137.6, 141.4, 142.3, 144.0, 144.2, 155.5, 170.2.

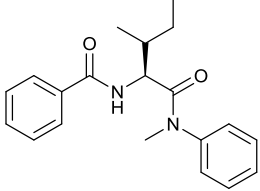
57o	(9H-fluoren-9-yl)methyl (S)-(1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxo-4-phenylbutan-2-yl)carbamate
	$C_{32}H_{30}N_2O_3$ 490.60 g/mol FH0085
57o was obtained as a white powder following method E (92.5 mg, 76%). $t_R = 5.19$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.75-1.85 (m, 2H), 2.36-2.44 (m, 1H), 2.51-2.58 (m, 1H), 3.28 (s, 3H), 4.22 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.32-4.39 (m, 2H), 4.41-4.47 (m, 1H), 5.55 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.18-7.22 (m, 4H), 7.30-7.41 (m, 8H), 7.62 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.76 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 31.5, 34.7, 37.8, 47.2, 51.1, 66.9, 119.9, 120.0, 125.2, 125.2, 125.9, 127.1, 127.3, 127.7, 128.3, 128.3, 128.4, 130.0, 140.8, 141.3, 141.4, 143.8, 144.0, 156.0, 172.2.	

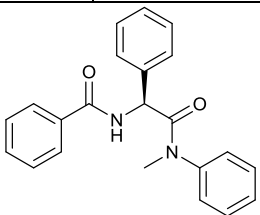
59a	(S)-N-(3-(4-(tert-butoxy)phenyl)-1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)benzamide
	$C_{27}H_{30}N_2O_3$ 430.55 g/mol FH0036
59 was obtained as a white oil according to method F (27.1 mg, 86%). $t_R = 4.36$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.33 (s, 9H), 2.84 (B of ABX, $J_{AB} = 13.1$ Hz, $J_{BX} = 6.5$ Hz, 1H), 2.97 (A of ABX, $J_{AB} = 13.1$ Hz, $J_{AX} = 8.3$ Hz, 1H), 3.23 (s, 3H), 5.00 (X of ABX, $J_{AX} = 8.3$ Hz, $J_{BX} = 6.5$ Hz, 1H), 6.82-6.89 (m, 6H), 7.34-7.42 (m, 5H), 7.47 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 29.1, 37.8, 39.0, 51.7, 78.6, 124.3, 127.3, 127.5, 128.4, 128.6, 128.7, 129.9, 130.2, 130.3, 131.4, 131.8, 133.6, 134.3, 142.6, 154.5, 166.6.	

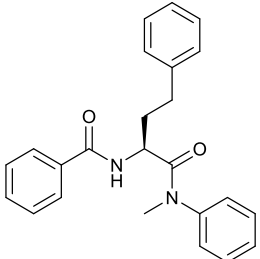
60	(S)-N-(4-methyl-1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamide
	$C_{20}H_{24}N_2O_2$ 324.42 g/mol FH0119
60 was obtained as a colorless oil according to method F (48.3 mg, 94%). $t_R = 4.23$ min	

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 0.46 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.75 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 1.31-1.35 (m, 1H), 1.48-1.59 (m, 2H), 3.31 (s, 3H), 4.94-4.99 (m, 1H), 6.93 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.36-7.42 (m, 5H), 7.46-7.51 (m, 3H), 7.81 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 21.1, 23.5, 24.8, 37.9, 42.7, 48.9, 127.3, 127.8, 128.5, 128.6, 130.2, 131.7, 134.3, 142.8, 167.2, 173.3.

61	N-((2S,3R)-3-methyl-1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxopentan-2-yl)benzamide
	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ 324.42 g/mol FH0120
<p>61 was obtained as a yellow oil according to method F (42.4 mg, 83%).</p> <p>$t_{\text{R}} = 4.17$ min</p> <p>^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 0.75-0.79 (m, 6H), 0.96-1.06 (m, 1H), 1.45-1.52 (m, 1H), 1.67-1.74 (m, 1H), 3.32 (s, 3H), 4.85 (dd, $J = 6.9, 9.3$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.36-7.50 (m, 6H), 7.81 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 11.5, 16.0, 24.5, 38.0, 38.9, 54.2, 127.3, 127.8, 128.3, 128.7, 130.0, 131.7, 134.6, 142.9, 166.9, 172.5.</p>	

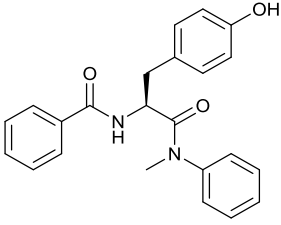
62	(S)-N-(2-(methyl(phenyl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)benzamide
	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ 344.41 g/mol FH0094
<p>62 was obtained as a pale yellow oil after Method F (39.5 mg, 53%).</p> <p>$t_{\text{R}} = 4.11$ min</p> <p>^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 3.30 (s, 3H), 5.73 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.96 (br s, 2H), 7.05 (dd, $J = 1.6, 7.5$ Hz, 2H), 7.18-7.23 (m, 3H), 7.32-7.34 (m, 3H), 7.39 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.47 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 38.3, 55.2, 127.3, 128.1, 128.2, 128.2, 128.3, 128.6, 128.6, 128.6, 128.7, 128.8, 129.9, 131.8, 134.2, 137.7, 142.2, 166.2, 170.4.</p>	

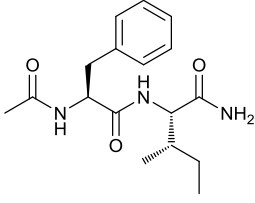
63	(S)-N-(1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxo-4-phenylbutan-2-yl)benzamide
	$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ 372.47 g/mol FH0097

63 was obtained as a pale yellow oil according to **method F** (44.3 mg, 63%).

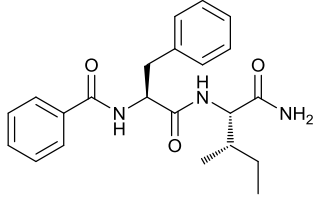
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.83-2.01 (m, 2H), 2.44-2.62 (m, 2H), 3.30 (s, 3H), 4.90-4.96 (m, 1H), 7.02 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.05 (br s, 1H), 7.10-7.21 (m, 3H), 7.25-7.27 (m, 2H), 7.36-7.50 (m, 6H), 7.78 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H).

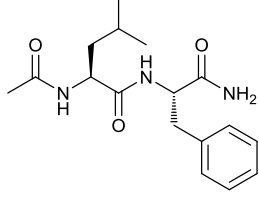
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 31.8, 34.7, 38.1, 50.2, 126.1, 127.3, 127.5, 128.5, 128.6, 128.6, 128.7, 130.2, 130.3, 131.8, 133.7, 134.3, 141.1, 142.6, 167.1, 172.4.

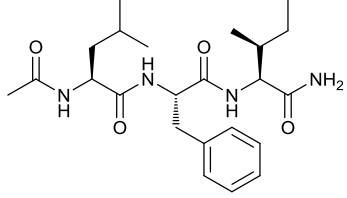
59b	(S)-N-(3-(4-hydroxyphenyl)-1-(methyl(phenyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)benzamide
	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₃ 374.44 g/mol FH0044
<p>59a (20 mg, 0.046 mmol, 1 eq) was treated by a solution of TFA and DCM (1/1, 2mL) for 30 min and volatiles were removed under vacuum. The residue was purified on reversed phase flash chromatography (MeOH 0 to 100% in water) to give 59b as a white powder.</p> <p>t_R = 3.74 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.78 (B of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.5 Hz, <i>J</i>_{BX} = 6.5 Hz, 1H), 2.93 (A of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.5 Hz, <i>J</i>_{AX} = 7.3 Hz, 1H), 3.26 (s, 3H), 5.02 (X of ABX, <i>J</i>_{AX} = 7.3 Hz, <i>J</i>_{BX} = 6.5 Hz, 1H), 6.66 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 6.51 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 6.86 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 9.98 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 7.34-7.42 (m, 5H), 7.47 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.73 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 37.9, 38.6, 40.8, 51.8, 115.6, 127.3, 127.5, 128.3, 128.5, 128.7, 130.1, 130.7, 131.9, 134.1, 142.6, 155.1, 171.9.</p>	

66	(2S,3S)-2-(((S)-2-acetamido-3-phenylpropanamido)-3-methylpentanamide
	C ₁₇ H ₂₅ N ₃ O ₃ 319.40 g/mol FH0127
<p>66 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (22.2 mg, 60%).</p> <p>t_R = 2.77 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 0.81-0.84 (m, 6H), 1.02-1.09 (m, 1H), 1.39-1.45 (m, 1H), 1.67-1.72 (m, 1H), 1.74 (s, 3H), 2.73 (A of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.8 Hz, <i>J</i>_{AX} = 10.0 Hz, 1H), 2.97 (B of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.8 Hz, <i>J</i>_{BX} = 4.4 Hz, 1H), 4.12 (X of ABX, <i>J</i>_{AX} = 10.0 Hz, <i>J</i>_{BX} = 4.4 Hz, 1H), 4.52-4.58 (m, 1H), 7.03 (br s, 1H), 7.18 (q, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H), 7.25 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 4H), 7.30 (br s, 1H), 7.76 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H), 8.12 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 11.2, 15.4, 22.4, 24.2, 36.8, 37.1, 53.8, 56.7, 126.1, 127.9, 129.1, 138.0, 169.1, 171.1, 127.7.</p>	

67	N-(((S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)benzamide

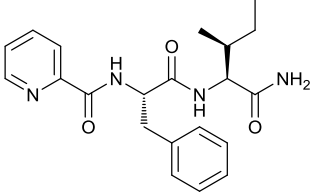
	$C_{22}H_{27}N_3O_3$ 381.48 g/mol FH0125
<p>67 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (31.1 mg, 71%). $t_R = 3.65$ min 1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 0.80-0.84 (m, 6H), 1.04-1.12 (m, 1H), 1.42-1.48 (m, 1H), 1.69-1.76 (m, 1H), 2.99 (A of ABX, $J_{AB} = 13.7$ Hz, $J_{AX} = 10.9$ Hz, 1H), 3.10 (B of ABX, $J_{AB} = 13.7$ Hz, $J_{BX} = 4.0$ Hz, 1H), 4.17 (X of ABX, $J_{AX} = 10.9$ Hz, $J_{BX} = 4.0$ Hz, 1H), 4.72-4.78 (m, 1H), 7.05 (br s, 1H), 7.16 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.25 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.39 (br s, 1H), 7.44 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.50-7.53 (m, 1H), 7.74 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.83 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): 11.2, 15.4, 24.2, 36.7, 36.9, 54.8, 56.6, 126.2, 127.3, 128.0, 128.2, 129.1, 131.3, 134.0, 138.4, 166.4, 171.0, 172.7.</p>	

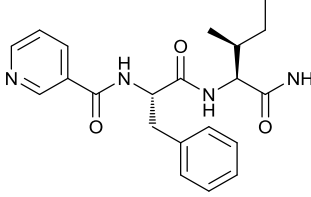
65	(S)-2-acetamido-N-((S)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-4-methylpentanamide
	$C_{17}H_{25}N_3O_3$ 319.40 g/mol FH0129
<p>65 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (25.8 mg, 70%). $t_R = 2.99$ min 1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 0.78 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 1.31 (m, 2H), 1.45-1.53 (m, 1H), 1.81 (s, 3H), 2.83 (A of ABX, $J_{AB} = 13.8$ Hz, $J_{AX} = 9.2$ Hz, 1H), 3.00 (B of ABX, $J_{AB} = 13.8$ Hz, $J_{BX} = 4.8$ Hz, 1H), 4.16 (X of ABX, $J_{AX} = 9.2$ Hz, $J_{BX} = 4.8$ Hz, 1H), 4.36-4.42 (m, 1H), 7.09 (br s, 1H), 7.17-7.26 (m, 5H), 7.29 (br s, 1H), 7.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): 21.6, 22.5, 22.9, 24.0, 37.2, 40.4, 51.3, 53.5, 126.1, 127.9, 129.1, 137.8, 169.4, 171.8, 172.7.</p>	

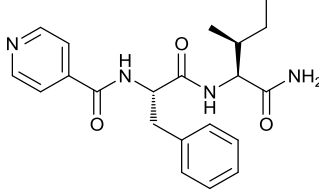
64	(S)-2-acetamido-N-((S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-4-methylpentanamide
	$C_{23}H_{36}N_4O_4$ 432.56 g/mol FH0128
<p>64 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (20 mg, 40%). $t_R = 3.42$ min 1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 0.79-0.84 (m, 12H), 1.02-1.09 (m, 1H), 1.33 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.38-1.45 (m, 1H), 1.47-1.54 (m, 1H), 1.67-1.73 (m, 1H), 1.80 (s, 3H), 2.83 (A of ABX, $J_{AB} = 13.8$ Hz, $J_{AX} = 9.4$ Hz, 1H), 3.02 (B of ABX, $J_{AB} = 13.8$ Hz, $J_{BX} = 4.6$ Hz, 1H), 4.12 (dd, $J = 7.0, 8.9$ Hz, 1H), 4.23 (X of ABX, $J_{AX} = 9.4$ Hz, $J_{BX} = 4.8$ Hz, 1H), 4.49-4.55 (m, 1H), 7.04 (br s, 1H), 7.17-7.24 (m, 5H), 7.26 (br s, 1H),</p>	

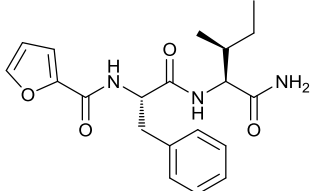
7.62 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H).

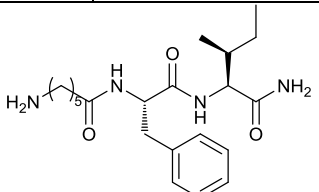
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 11.2, 15.4, 21.7, 22.4, 22.9, 24.1, 24.1, 36.7, 36.7, 40.7, 50.9, 53.7, 56.7, 126.1, 127.9, 129.1, 137.8, 169.1, 170.5, 172.1, 172.6.

68a	N-((S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)picolinamide
	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3$ 382.46 g/mol FH0447
<p>68a was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (6.3 mg, 35%). $t_{\text{R}} = 9.75$ min ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): 0.80-0.85 (m, 6H), 1.05-1.11 (m, 1H), 1.42-1.47 (m, 1H), 1.69-1.74 (m, 1H), 3.07 (A of ABX, $J_{\text{AB}} = 13.9$ Hz, $J_{\text{AX}} = 6.6$ Hz, 1H), 3.13 (B of ABX, $J_{\text{AB}} = 13.9$ Hz, $J_{\text{BX}} = 4.6$ Hz, 1H), 4.19 (X of ABX, $J_{\text{AX}} = 6.6$ Hz, $J_{\text{BX}} = 4.6$ Hz, 1H), 4.85-4.89 (m, 1H), 7.07 (br s, 1H), 7.14 (q, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 4.4$ Hz, 4H), 7.43 (br s, 1H), 7.60 (q, $J = 4.7$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 3.6$ Hz, 2H), 8.16 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.64 (dt, $J = 1.1, 4.7$ Hz, 1H), 8.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): 11.1, 15.4, 24.2, 36.8, 37.7, 53.7, 56.6, 121.8, 126.3, 126.7, 128.0, 129.2, 137.3, 137.9, 148.5, 149.2, 163.1, 170.2, 172.7.</p>	

68b	N-((S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)nicotinamide
	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3$ 382.46 g/mol FH0448
<p>68b was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (7.1 mg, 39%). $t_{\text{R}} = 7.57$ min ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): 0.80-0.85 (m, 6H), 1.05-1.11 (m, 1H), 1.42-1.47 (m, 1H), 1.69-1.74 (m, 1H), 2.93 (A of ABX, $J_{\text{AB}} = 13.7$ Hz, $J_{\text{AX}} = 11$ Hz, 1H), 3.13 (B of ABX, $J_{\text{AB}} = 13.7$ Hz, $J_{\text{BX}} = 3.9$ Hz, 1H), 4.17 (X of ABX, $J_{\text{AX}} = 11$ Hz, $J_{\text{BX}} = 3.9$ Hz, 1H), 4.77-4.81 (m, 1H), 7.05 (br s, 1H), 7.16 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.26 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 7.49 (dd, $J = 4.7, 7.9$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 8.10 (dd, $J = 1.9, 9.9$ Hz, 1H), 8.59 (dd, $J = 1.7, 4.9$ Hz, 1H), 8.85 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.89 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): 11.2, 15.4, 24.2, 36.8, 16.8, 54.8, 56.8, 123.5, 126.2, 128.0, 129.2, 129.6, 135.3, 138.2, 148.2, 151.8, 164.8, 170.9, 172.7.</p>	

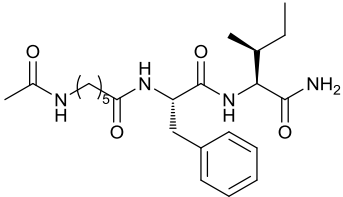
68c	N-((S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)isonicotinamide
	C ₂₁ H ₂₆ N ₄ O ₃ 382.46 g/mol FH0449
<p>68c was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (9.6 mg, 53%). t_R = 7.19 min ¹H NMR (500 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 0.79-0.84 (m, 6H), 1.05-1.11 (m, 1H), 1.41-1.46 (m, 1H), 1.70-1.75 (m, 1H), 2.95 (A of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.8 Hz, <i>J</i>_{AX} = 11 Hz, 1H), 3.12 (B of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.8 Hz, <i>J</i>_{BX} = 3.9 Hz, 1H), 4.14 (X of ABX, <i>J</i>_{AX} = 11 Hz, <i>J</i>_{BX} = 3.9 Hz, 1H), 4.79 (dd, <i>J</i> = 4.1, 11 Hz, 1H), 7.16 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.25 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H), 7.75 (dd, <i>J</i> = 1.6, 4.7 Hz, 2H), 8.75 (dd, <i>J</i> = 1.6, 4.6 Hz, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 11.4, 15.6, 24.4, 36.9, 37.0, 55.0, 57.0, 122.2, 126.6, 128.3, 129.4, 138.2, 142.6, 149.0, 164.6, 170.9, 173.0.</p>	

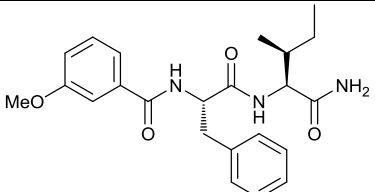
69	N-((S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)furan-2-carboxamide
	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O ₄ 371.44 g/mol FH0451
<p>69 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (9.1 mg, 52%). t_R = 9.09 min ¹H NMR (500 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 0.81-0.84 (m, 6H), 1.04-1.11 (m, 1H), 1.41-1.47 (m, 1H), 1.69-1.75 (m, 1H), 2.98 (A of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.7 Hz, <i>J</i>_{AX} = 10.2 Hz, 1H), 3.07 (B of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.7 Hz, <i>J</i>_{BX} = 3.9 Hz, 1H), 4.17 (X of ABX, <i>J</i>_{AX} = 10.2 Hz, <i>J</i>_{BX} = 3.9 Hz, 1H), 4.71-4.76 (m, 1H), 6.59 (dd, <i>J</i> = 1.7, 3.5 Hz, 1H), 7.05 (br s, 1H), 7.10 (dd, <i>J</i> = 0.5, 3.3 Hz, 1H), 7.16 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 7.23 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 7.29 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 7.38 (br s, 1H), 7.82 (m, 1H), 7.93 (d, <i>J</i> = 9 Hz, 1H), 8.35 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 11.7, 15.9, 24.7, 37.3, 37.4, 54.4, 57.2, 112.3, 114.3, 126.7, 128.5, 129.6, 138.5, 145.6, 147.8, 157.9, 171.3, 173.2.</p>	

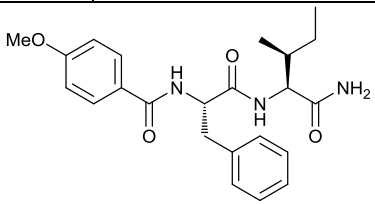
70	6-amino-N-((S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)hexanamide
	C ₂₁ H ₃₄ N ₄ O ₃ 390.53 g/mol FH0454
<p>70 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (7.1 mg, 78%). t_R = 6.02 min ¹H NMR (500 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 0.82-0.84 (m, 6H), 1.02-1.14 (m, 3H), 1.33-1.46 (m, 5H), 1.67-1.73 (m,</p>	

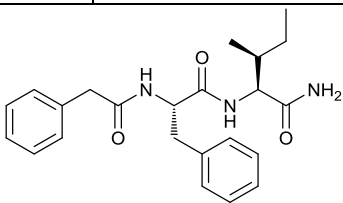
1H), 2.01 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.67-2.75 (m, 3H), 3.00 (dd, $J = 4.3, 13.9$ Hz, 1H), 4.14 (dd, $J = 6.9, 8.8$ Hz, 1H), 4.54-4.58 (m, 1H), 7.06 (br s, 1H), 7.17 (q, $J = 4.3$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 4.4$ Hz, 4H), 7.36 (br s, 1H), 7.66 (br s, 2H), 7.72 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H).

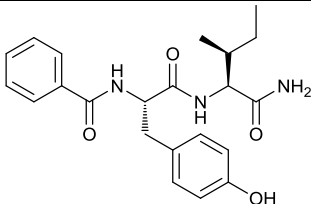
^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 11.2, 15.4, 24.2, 24.7, 25.2, 26.8, 34.9, 36.9, 37.1, 38.7, 53.8, 56.6, 126.2, 127.9, 129.2, 138.1, 171.1, 171.9, 172.8.

71	6-acetamido-N-((S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)hexanamide
	$\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4$ 432.56 g/mol FH0454
<p>71 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (5.8 mg, 56%). $t_R = 8.36$ min ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): 0.81-0.83 (m, 6H), 1.05-1.08 (m, 3H), 1.27-1.44 (m, 5H), 1.67-1.73 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.73 (A of ABX, $J_{AB} = 13.9$ Hz, $J_{AX} = 10.2$ Hz, 1H), 2.93 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.01 (B of ABX, $J_{AB} = 13.9$ Hz, $J_{BX} = 4.3$ Hz, 1H), 4.13 (X of ABX, $J_{AX} = 10.2$ Hz, $J_{BX} = 4.3$ Hz, 1H), 4.53-4.57 (m, 1H), 7.05 (br s, 1H), 7.16 (q, $J = 4.3$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 4.4$ Hz, 4H), 7.34 (br s, 1H), 7.70 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.75 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): 11.2, 15.4, 22.6, 24.1, 15.0, 25.9, 28.9, 35.2, 36.9, 37.1, 38.4, 53.7, 56.6, 126.2, 127.9, 129.1, 138.1, 168.9, 171.1, 172.1, 172.7.</p>	

72a	N-((S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-3-methoxybenzamide
	$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$ 411.50 g/mol FH0452
<p>72a was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (10 mg, 52%). $t_R = 10.37$ min ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): 0.81-0.84 (m, 6H), 1.05-1.11 (m, 1H), 1.43-1.48 (m, 1H), 1.70-1.75 (m, 1H), 2.98 (A of ABX, $J_{AB} = 13.7$ Hz, $J_{AX} = 10.9$ Hz, 1H), 3.01 (B of ABX, $J_{AB} = 13.7$ Hz, $J_{BX} = 3.9$ Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 4.17 (X of ABX, $J_{AX} = 10.9$ Hz, $J_{BX} = 3.9$ Hz, 1H), 4.72-4.76 (m, 1H), 7.06-7.08 (m, 2H), 7.15-7.17 (m, 1H), 7.24-7.27 (m, 3H), 7.31-7.37 (m, 4H), 7.39 (br s, 1H), 7.82 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.59 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): 11.2, 15.4, 24.2, 36.7, 16.9, 54.8, 55.2, 56.7, 112.5, 117.1, 119.5, 126.2, 128.0, 129.2, 129.4, 135.5, 138.4, 159.0, 166.2, 171.1, 172.7.</p>	

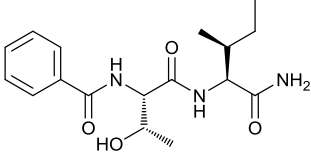
72b	N-((S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-4-methoxybenzamide
	C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O ₄ 411.50 g/mol FH0453
<p>72b was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (9.7 mg, 50%). t_R = 10.26 min ¹H NMR (500 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 0.80-0.82 (m, 6H), 1.03-1.09 (m, 1H), 1.39-1.45 (m, 1H), 1.69-1.73 (m, 1H), 2.97 (A of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.8 Hz, <i>J</i>_{AX} = 11 Hz, 1H), 3.08 (B of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.8 Hz, <i>J</i>_{BX} = 4.1 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 4.14 (X of ABX, <i>J</i>_{AX} = 10.9 Hz, <i>J</i>_{BX} = 3.9 Hz, 1H), 4.70 (dd, <i>J</i> = 4.1, 10.9 Hz, 1H), 6.96 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.15 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.24 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 7.33 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 7.72 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 11.4, 15.6, 24.3, 36.8, 36.9, 54.9, 55.5, 56.8, 113.7, 126.2, 126.4, 128.3, 129.3, 129.4, 138.6, 161.9, 166.2, 171.4, 173.0.</p>	

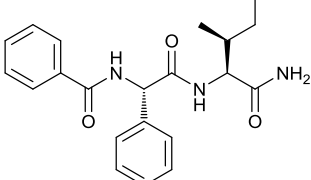
73	(2S,3S)-3-methyl-2-((S)-3-phenyl-2-(2-phenylacetamido)propanamido)pentanamide
	C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O ₃ 395.50 g/mol FH0450
<p>73 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (9.3 mg, 50%). t_R = 10.44 min ¹H NMR (500 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 0.78-0.81 (m, 6H), 0.98-1.04 (m, 1H), 1.36-1.41 (m, 1H), 1.66-1.71 (m, 1H), 2.76 (A of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.7 Hz, <i>J</i>_{AX} = 10.1 Hz, 1H), 3.00 (B of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.7 Hz, <i>J</i>_{BX} = 4.3 Hz, 1H), 3.36 (q, <i>J</i> = 11.7 Hz, 2H), 4.14 (X of ABX, <i>J</i>_{AX} = 10.1 Hz, <i>J</i>_{BX} = 4.3 Hz, 1H), 4.57-4.61 (m, 1H), 7.04 (br s, 1H), 7.07 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 7.16-7.20 (m, 3H), 7.22 (d, <i>J</i> = 4.4 Hz, 4H), 7.31 (br s, 1H), 7.78 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 8.32 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H) . ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 11.2, 15.4, 24.1, 36.7, 37.2, 42.0, 53.8, 56.6, 126.1, 127.9, 128.0, 128.9, 129.2, 136.2, 137.8, 169.9, 170.9, 172.7.</p>	

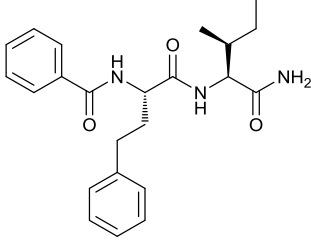
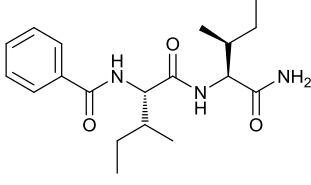
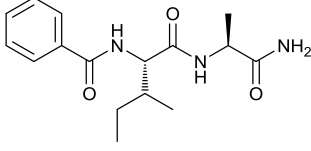
74	N-((S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxopropan-2-yl)benzamide
	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₄ 397.47 g/mol FH0442
<p>74 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (5.9 mg, 35%). t_R = 8.90 min ¹H NMR (500 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 0.80-0.84 (m, 6H), 1.05-1.10 (m, 1H), 1.42-1.46 (m, 1H), 1.70-1.73 (m, 1H), 2.87 (A of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.7 Hz, <i>J</i>_{AX} = 10.7 Hz, 1H), 2.97 (B of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.7 Hz, <i>J</i>_{BX} = 3.9 Hz, 1H),</p>	

4.16 (X of ABX, $J_{AX} = 10.7$ Hz, $J_{BX} = 3.9$ Hz, 1H), 4.63-4.65 (m, 1H), 6.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.25 (br s, 1H), 7.13 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.40 (br s, 1H), 7.44 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.49 (m, 1H), 7.74 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.78 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 8.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 9.14 (br s, 1H).

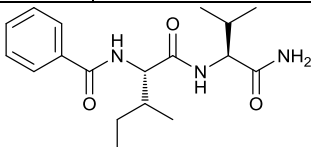
^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 11.2, 12.1, 15.4, 17.8, 24.2, 35.9, 36.9, 55.2, 56.6, 114.8, 127.3, 128.2, 128.4, 130.0, 130.1, 130.1, 134.3, 131.3, 134.1, 155.7, 166.4, 171.2, 172.8.

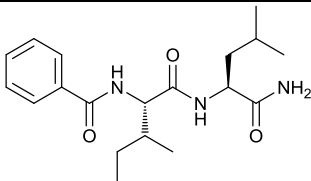
75	N-((2S,3S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentane-2-yl)amino)-3-hydroxy-1-oxobutane-2-yl)benzamide
	$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$ 335.40 g/mol FH0443
<p>75 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (6.6 mg, 47%). $t_R = 8.13$ min ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): 0.80-0.84 (m, 6H), 1.07-1.11 (m, 4H), 1.42-1.47 (m, 1H), 1.71-1.75 (m, 1H), 4.08 (br t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.17 (dd, $J = 6.6, 8.7$ Hz, 1H), 4.47 (dd, $J = 4.9, 8.4$ Hz, 1H), 4.97 (br s, 1H), 7.05 (br s, 1H), 7.36 (br s, 1H), 7.49 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.56 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 8.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): 16.5, 20.7, 25.2, 29.4, 41.9, 61.9, 64.5, 72.1, 132.6, 133.5, 136.6, 139.5, 171.8, 175.0, 178.0.</p>	

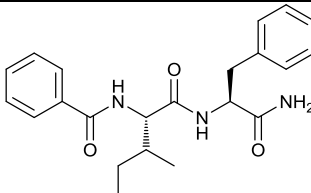
76	N-((S)-2-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentane-2-yl)amino)-2-oxo-1-phenylethyl)benzamide
	$\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$ 367.45 g/mol FH0444
<p>76 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (7.8 mg, 51%). $t_R = 3.47$ min ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 0.80-0.85 (m, 6H), 1.07-1.12 (m, 1H), 1.42-1.48 (m, 1H), 1.69-1.73 (m, 1H), 4.18 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.79 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.00 (br s, 1H), 7.28-7.36 (m, 4H), 7.49-7.55 (m, 5H), 7.89 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 8.12 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.81 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): 11.1, 15.4, 24.3, 36.9, 56.7, 56.9, 127.5, 127.5, 127.6, 128.2, 128.2, 131.4, 133.9, 150.3, 166.1, 169.4, 172.4.</p>	

77	N-((S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxo-4-phenylbutan-2-yl)benzamide	
		$C_{23}H_{29}N_3O_3$ 395.50 g/mol FH0445
<p>77 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (5.6 mg, 34%).</p> <p>$t_R = 10.83$ min</p> <p>1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): 0.79-0.83 (m, 6H), 1.05-1.08 (m, 1H), 1.42-1.44 (m, 1H), 1.69-1.71 (m, 1H), 2.00-2.05 (m, 2H), 2.57-2.73 (m, 2H), 4.15 (dd, $J = 7.1, 8.8$ Hz, 1H), 4.44-4.50 (m, 1H), 7.02 (br s, 1H), 7.16-7.21 (m, 3H), 7.28 (t, $J = 9.4$ Hz, 2H), 7.40 (br s, 1H), 7.49 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.54 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 8.60 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): 11.2, 15.4, 24.2, 31.9, 33.3, 36.8, 53.4, 56.5, 125.8, 127.5, 128.3, 128.3, 128.9, 131.4, 134.2, 141.5, 166.71, 171.3, 172.8.</p>		
78	N-((2S,3S)-1-(((2S,3S)-1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamide	
		$C_{19}H_{29}N_3O_3$ 347.46 g/mol FH0437
<p>78 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (7 mg, 48%).</p> <p>$t_R = 10.00$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 0.77-0.88 (m, 12H), 1.02-1.11 (m, 1H), 1.13-1.20 (m, 1H), 1.40-1.54 (m, 2H), 1.65-1.74 (m, 1H), 1.91-2.02 (m, 1H), 7.15 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.32 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.02 (br s, 1H), 7.35 (br s, 1H), 7.47 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.73 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 8.39 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H).</p>		
79	N-((2S,3S)-1-(((S)-1-amino-1-oxopropan-2-yl)amino)-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamide	
		$C_{16}H_{23}N_3O_3$ 305.38 g/mol FH0441
<p>79 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (11.8 mg, 92%).</p> <p>$t_R = 8.45$ min</p> <p>1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): 0.83 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.15-1.19 (m, 1H), 1.21 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.47-1.53 (m, 1H), 1.90-1.94 (m, 1H), 4.23 (quint, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.32 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.99 (br s, 1H), 7.27 (br s, 1H), 7.46 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.54 (m, 1H), 7.86 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 8.00 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.32 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): 10.8, 15.4, 18.4, 24.8, 36.0, 47.9, 57.9, 127.5, 128.2, 131.3, 134.3,</p>		

166.5, 170.6, 173.9.

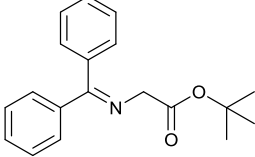
80	N-((2S,3S)-1-(((S)-1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)amino)-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamide
	C ₁₈ H ₂₇ N ₃ O ₃ 333.43 g/mol FH0440
<p>80 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (11.3 mg, 81%).</p> <p>$t_R = 9.38$ min</p> <p>¹H NMR (500 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 0.82-0.85 (m, 9H), 0.88-0.89 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H), 1.15-1.25 (m, 1H), 1.47-1.54 (m, 1H), 1.92-1.97 (m, 2H), 4.13 (dd, <i>J</i> = 6.6, 9 Hz, 1H), 4.34 (t, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.04 (br s, 1H), 7.35 (br s, 1H), 7.47 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H), 7.54 (m, 1H), 7.71 (d, <i>J</i> = 9 Hz, 1H), 7.84 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 8.42 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (125 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 10.6, 15.5, 17.9, 19.2, 24.8, 30.6, 35.5, 57.3, 58.1, 127.4, 128.2, 131.2, 134.4, 166.5, 170.9, 172.7.</p>	

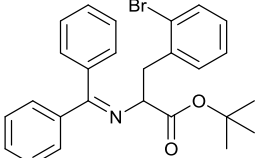
81	N-((2S,3S)-1-(((S)-1-amino-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamide
	C ₁₉ H ₂₉ N ₃ O ₃ 347.46 g/mol FH0439
<p>81 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (11.2 mg, 77%).</p> <p>$t_R = 10.13$ min</p> <p>¹H NMR (500 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 0.81-0.89 (m, 12H), 1.14-1.23 (m, 1H), 1.44-1.53 (m, 3H), 1.56-1.63 (m, 1H), 1.90-1.96 (m, 1H), 4.23-4.31 (m, 2H), 6.98 (br s, 1H), 7.25 (br s, 1H), 7.47 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.85 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.90 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 8.32 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (125 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 10.7, 15.5, 21.6, 22.9, 24.2, 24.8, 35.7, 40.9, 51.8, 58.1, 127.5, 128.2, 131.2, 134.3, 166.66, 170.8, 173.9.</p>	

82	N-((2S,3S)-1-(((S)-1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)benzamide
	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₃ 381.48 g/mol FH0438
<p>82 was obtained as a white powder after solid phase synthesis following method G (10.8 mg, 67%).</p> <p>$t_R = 10.40$ min</p> <p>¹H NMR (500 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 0.72 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H), 0.78 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 3H), 1.09-1.14 (m, 1H), 1.36-1.44 (m, 1H), 1.78-1.86 (m, 1H), 2.80 (A of ABX, <i>J</i>_{AB} = 13.8 Hz, <i>J</i>_{AX} = 9.1 Hz, 1H), 3.00 (B of ABX,</p>	

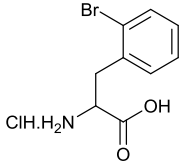
$J_{AB} = 13.8$ Hz, $J_{BX} = 4.9$ Hz, 1H), 4.25 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.50 (X of ABX, $J_{AX} = 9.1$ Hz, $J_{BX} = 4.9$ Hz, 1H), 7.08 (br s, 1H), 7.11-7.21 (m, 5H), 7.35 (br s, 1H), 7.47 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.84 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H).

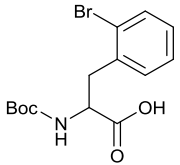
^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 10.6, 15.3, 24.7, 35.7, 37.6, 53.5, 58.2, 126.1, 127.5, 127.9, 128.2, 129.1, 131.3, 134.3, 137.8, 166.5, 170.7, 172.7.

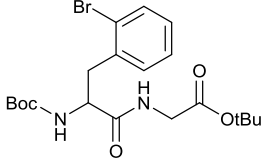
83	tert-butyl 2-((diphenylmethylene)amino)acetate
	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_2$ g/mol FH0181
Benzophenone imine (500 μL , 3 mmol, 1 eq) was added to a solution of glycine <i>tert</i> -butyl ester hydrochloride (500 mg, 3 mmol, 1 eq) in DCM (10 mL) then stirred overnight at rt. After completion, solvent was removed under vacuum and the residue was solubilized in EtOAc and water. The organic layer was isolated and dried over Na_2SO_4 and evaporated to give 83 as a white solid (845 mg, 96%).	
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 1.46 (s, 9H), 4.12 (s, 2H), 7.18-7.18 (m, 2H), 7.31-7.46 (m, 6H), 7.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H).	
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 28.3, 56.6, 81.2, 127.9, 128.2, 128.8, 128.9, 128.9, 130.5, 136.4, 139.7, 170.0, 171.7.	

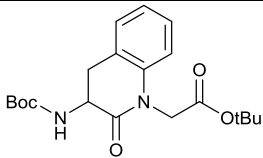
84	tert-butyl 3-(2-bromophenyl)-2-((diphenylmethylene)amino)propanoate
	$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{BrNO}_2$ 464.40 g/mol FH0184
83 (750 mg, 2.5 mmol, 1 eq), 2-bromobenzyl bromide (1078 mg, 4.3 mmol, 1.7 eq) and TBAC (289.2 mg, 1.25 mmol, 0.5 eq) were solubilized in DCM (20 mL) and a solution of KOH (9M in water, 2 mL) was added to the mixture and strongly stirred for 4.5 h. After completion, the reaction mixture was diluted with water and DCM. The organic layer was isolated, washed with water, brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The oily residue was purified on silica gel column chromatography (EtOAc 5 to 10% in heptane) to give 84 as a colorless oil (1037 g, 88%).	
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 1.45 (s, 9H), 3.23 (dd, $J = 9.7, 13.3$ Hz, 1H), 3.46 (dd, $J = 4.1, 13.4$ Hz, 1H), 4.33 (dd, $J = 4.1, 9.7$ Hz, 1H), 6.60 (br d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 7.04 (td, $J = 1.8, 7.8$ Hz, 1H), 7.13 (td, $J = 1.0, 7.4$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J = 1.6, 7.7$ Hz, 1H), 7.26-7.36 (m, 6H), 7.42 (dd, $J = 0.9, 7.9$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H).	
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 28.3, 39.8, 65.4, 81.4, 125.4, 127.1, 127.9, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.9, 130.3, 132.7, 132.9, 136.4, 137.8, 138.7, 170.8, 170.8.	

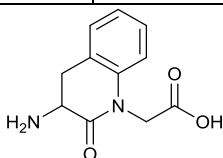
85	2-amino-3-(2-bromophenyl)propanoic acid hydrochloride
-----------	--

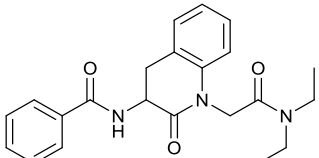
	$C_9H_{11}ClNO_2$ 280.55 g/mol FH0188
<p>84 (1037 mg, 2.2 mmol, 1 eq) was heated under reflux in a solution of HCl 6N (20 mL) for 6h. After completion, 20 mL water was added and the aqueous phase was washed twice with diethyl ether then evaporated to give 85 a white crystalline powder (613 mg, 98%).</p> <p>$t_R = 2.82$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, MeOD): 3.19 (dd, $J = 8.5, 14.2$ Hz, 1H), 3.47 (dd, $J = 6.7, 14.3$ Hz, 1H), 4.26 (dd, $J = 6.7, 8.3$ Hz, 1H), 7.21 (td, $J = 2.1, 8.7$ Hz, 1H), 7.31-7.37 (m, 2H), 7.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, MeOD): 38.1, 53.8, 125.8, 129.4, 130.9, 133.2, 134.6, 132.6, 171.1.</p>	

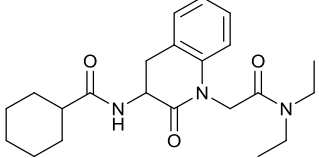
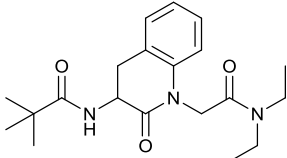
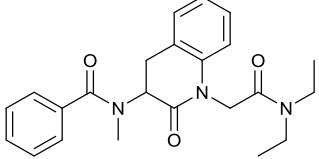
86	3-(2-bromophenyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid
	$C_{14}H_{18}BrNO_4$ 344.20 g/mol FH0204
<p>85 (249 mg, 0.89 mmol, 1 eq) was added to a mixture of NaOH (1M in water, 2.04 mL, 2 mmol, 2.3 eq) and Dioxane (1.5 mL) and stirred for 5 minutes at 0°C. Boc₂O (222.8 mg, 1.02 mmol, 1.15 eq) was then added at 0°C and the mixture was strongly stirred 3h at rt. Volatiles were removed under vacuum and EtOAc and water were added to the mixture. Aqueous phase was acidified until pH 1 with HCl 2N and extracted trice with EtOAc. Organic layers were combined, washed with water and brine to give 86 as a white solid after evaporation (296.6 mg, 97%).</p> <p>$t_R = 4.04$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz,): 1.08, 1.38 (2s, 9H), 2.81, 3.04 (2m, 1H), 3.32-3.45 (m, 1H), 4.58-4.64 (m, 1H), 5.06, 6.93 (2d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.05-7.06 (m, 1H), 7.16-7.18 (m, 2H), 7.48 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 9.10 (br s, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃): 14.4, 21.2, 27.9, 28.4, 38.4, 40.8, 53.7, 53.9, 60.7, 80.4, 81.6, 125.3, 125.4, 127.7, 128.8, 131.5, 132.5, 132.9, 133.1, 136.1, 136.7, 155.5, 156.8, 171.6, 175.6, 176.4.</p>	

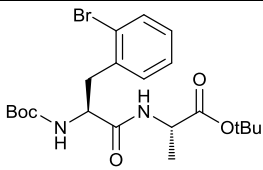
87a	tert-butyl (3-(2-bromophenyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoyl)glycinate
	$C_{20}H_{29}BrN_2O_5$ 456.36 g/mol FH0223
<p>87a was obtained following method A as a white powder (1127 mg, 77%)</p> <p>$t_R = 4.28$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.34 (s, 9H), 1.46 (s, 9H), 3.04-3.09 (m, 1H), 3.34 (dd, $J = 5.4, 13.9$ Hz, 1H), 3.90 (qd, $J = 5, 18.3$ Hz, 2H), 4.51-4.54 (m, 1H), 5.12-5.15 (m, 1H), 6.45 (br s, 1H), 7.10 (td, $J = 2.1, 8$ Hz, 1H), 7.21-7.26 (m, 2H), 7.54 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃): 28.2, 28.4, 38.9, 42.3, 54.9, 80.3, 82.6, 125.2, 127.8, 128.8, 131.7, 133.1, 136.7, 168.7, 168.7, 171.2.</p>	

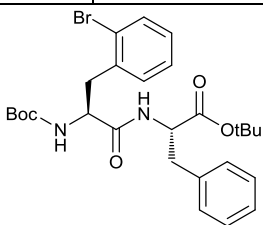
88a	tert-butyl 2-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-oxo-3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)acetate
	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅ 376.45 g/mol
<p>88a was prepared following method H.</p> <p>$t_R = 11.96$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.42 (s, 9H), 1.46 (s, 9H), 2.84 (t, $J = 14.4$ Hz, 1H), 3.43 (dd, $J = 4.5, 14.4$ Hz, 1H), 4.29-4.35 (m, 1H), 4.42 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 5.70 (br s, 1H), 6.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.04 (td, $J = 0.6, 7.4$ Hz, 1H), 7.21-7.25 (m, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 28.1, 28.5, 32.5, 46.0, 50.5, 80.0, 82.6, 114.8, 124.1, 124.9, 128.1, 128.9, 138.9, 155.7, 167.4, 169.4.</p>	

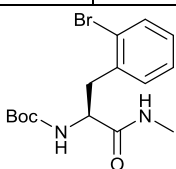
90	2-(3-amino-2-oxo-3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)acetic acid
	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₃ 220.23 g/mol FH0284
<p>88a (25 mg, 0.067 mmol, 1 eq) is treated by TFA (1 mL) in DCM (1 mL) for 2h then volatiles were evacuated under vacuum. The residue was precipitated with diethyl ether to give 90 as a grey powder after filtration (14.6 mg, quant.).</p> <p>$t_R = 1.57$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, MeOD): 3.07-3.09 (m, 1H), 3.36 (q, $J = 7$ Hz, 1H), 1.12 (dd, $J = 7.7, 13.3$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J = 17.9$ Hz, 1H), 4.79 (d, $J = 17.9$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.02 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.19-7.24 (m, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, MeOD): 30.8, 45.8, 50.5, 116.8, 123.6, 125.6, 129.9, 130.0, 139.9, 167.7, 171.7.</p>	

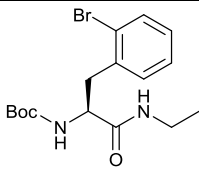
26a	N-(1-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)benzamide
	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₃ 379.46 g/mol FH0294
<p>26a was obtained as a white oil following method I (25.2 mg, quant.).</p> <p>$t_R = 3.57$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.14 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 2.97 (t, $J = 14.4$ Hz, 1H), 3.37-3.46 (m, 4H), 3.67 (dd, $J = 5.8, 14.8$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 4.77 (dt, $J = 4.9, 13.4$ Hz, 1H), 4.95 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.06 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.23-7.27 (m, 2H), 7.42-7.53 (m, 4H), 7.86 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 13.2, 14.6, 31.9, 40.9, 41.6, 45.6, 50.2, 115.4, 124.2, 125.0, 127.3, 128.2, 128.7, 129.1, 131.9, 134.2, 139.2, 165.5, 167.5, 169.9.</p>	

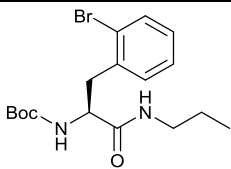
26b	N-(1-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)cyclohexanecarboxamide
	$C_{22}H_{31}N_3O_3$ 385.51 g/mol FH0304
<p>26b was obtained as a white powder following method I (14.5 mg, 64%).</p> <p>$t_R = 3.81$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.14 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.27-1.29 (m, 2H), 1.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.39-1.51 (m, 3H), 1.65-1.68 (m, 1H), 1.77-1.81 (m, 2H), 1.89-1.93 (m, 2H), 2.19 (tt, $J = 3.6, 11.6$ Hz, 1H), 2.83 (t, $J = 14.4$ Hz, 1H), 3.41 (q, $J = 7.3$ Hz, 4H), 3.52 (dd, $J = 5.8, 14.7$ Hz, 1H), 4.50-4.59 (m, 2H), 4.90 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 6.78 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.03 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.20-7.23 (m, 2H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 13.2, 14.5, 25.9, 25.9, 26.0, 29.8, 29.8, 31.9, 40.9, 41.5, 45.5, 49.6, 77.4, 115.3, 124.1, 125.1, 128.1, 129.0, 139.2, 165.6, 169.9, 176.5.</p>	
26c	N-(1-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)pivalamide
	$C_{20}H_{29}N_3O_3$ 359.47 g/mol FH0303
<p>26c was obtained as a white powder following method I (14.5 mg, 64%).</p> <p>$t_R = 3.54$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.14 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.24 (s, 9H), 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 2.82 (t, $J = 14.4$ Hz, 1H), 3.41 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H), 3.53 (dd, $J = 5.8, 14.8$ Hz, 1H), 4.49-4.55 (m, 2H), 4.93 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.04 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.21-7.24 (m, 2H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 13.2, 14.5, 27.7, 31.7, 39.1, 40.9, 41.5, 45.5, 49.7, 115.2, 124.1, 125.1, 128.1, 128.9, 139.2, 165.6, 170.1, 179.0.</p>	
26d	N-(1-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)-N-methylbenzamide
	$C_{23}H_{27}N_3O_3$ 393.49 g/mol FH0300
<p>26d was obtained as a white powder following method B (2.7 mg, 43%).</p> <p>$t_R = 2.95$ min</p> <p>LC-MS calcd : 393.2, Found [M+H] : 394.2</p>	

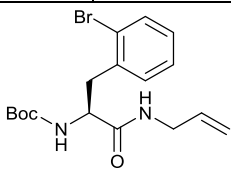
87b	tert-butyl ((S)-3-(2-bromophenyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoyl)-L-alaninate
	$C_{21}H_{31}BrN_2O_5$ 471.39 g/mol FH0636
Following method A , 87b was obtained as a white powder (422.8 mg, 90%). $t_R = 5.33$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.35 (s, 9H), 1.45 (m, 12H), 3.07 (A of ABX, $J_{AB} = 13.7$ Hz, $J_{AX} = 9$ Hz, 1H), 3.29 (B of ABX, $J_{AB} = 13.7$ Hz, $J_{BX} = 5.6$ Hz, 1H), 4.34-4.48 (m, 2H), 5.14 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 6.45 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.09 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 7.19-7.24 (m, 2H), 7.53 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 18.9, 28.2, 28.4, 39.2, 49.1, 54.9, 80.2, 82.3, 125.2, 127.8, 128.8, 131.8, 133.1, 136.7, 155.4, 170.5, 171.8.	

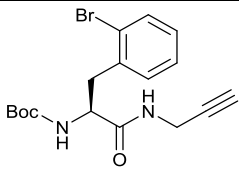
87c	tert-butyl ((S)-3-(2-bromophenyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoyl)-L-phenylalaninate
	$C_{27}H_{35}BrN_2O_5$ 547.49 g/mol FH0348
Following method A , 87c was obtained as a white powder (390 mg, quant.). $t_R = 5.19$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.36 (s, 18H), 2.99-3.11 (m, 3H), 3.26 (dd, $J = 5.5, 13.8$ Hz, 1H), 4.43-4.46 (m, 1H), 4.64-4.69 (m, 1H), 5.16 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.06 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 7.17-7.27 (m, 5H), 7.51 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 28.0, 28.3, 38.2, 39.0, 53.9, 54.9, 80.1, 82.5, 125.1, 127.1, 127.7, 128.5, 128.7, 129.7, 131.6, 132.9, 136.1, 136.6, 155.3, 170.1, 170.6.	

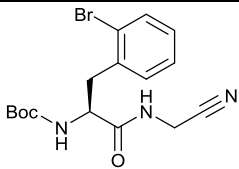
87d	tert-butyl (S)-(3-(2-bromophenyl)-1-(methylamino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate
	$C_{15}H_{21}BrN_2O_3$ 357.25 g/mol FH0405
Following method A , 87d was obtained as a white powder (230.1 mg, 91%). $t_R = 3.88$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.34 (s, 9H), 2.75 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 3.05-3.11 (m, 1H), 3.24-3.29 (m, 1H), 4.39-4.45 (m, 1H), 5.16 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.95 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 2.6, 8$ Hz, 1H), 7.20-7.25 (m, 2H), 7.53 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 26.3, 28.2, 38.9, 54.8, 80.1, 124.9, 127.6, 128.6, 131.6, 132.9, 136.7, 153.3, 171.6.	

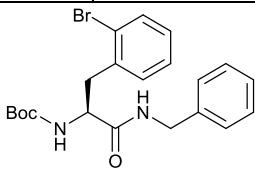
87e	tert-butyl (S)-(3-(2-bromophenyl)-1-(ethylamino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate
	$C_{16}H_{23}BrN_2O_3$ 371.27 g/mol FH0740
Following method A , 87e was obtained as a white powder (165 mg, 85%). $t_R = 4.02$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.03 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.35 (d, 9H), 3.06-3.12 (m, 1H), 3.19-3.25 (m, 3H), 4.37-4.44 (m, 1H), 5.17 (br s, 1H), 5.83 (br s, 1H), 7.08 (td, $J = 2.3, 7.9$ Hz, 1H), 7.20-7.27 (m, 2H), 7.53 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 14.8, 28.4, 34.6, 39.7, 54.7, 80.5, 128.1, 127.8, 128.8, 131.9, 133.1, 136.9, 155.1, 170.9.	

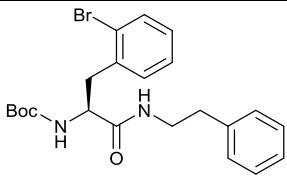
87f	tert-butyl (S)-(3-(2-bromophenyl)-1-oxo-1-(propylamino)propan-2-yl)carbamate
	$C_{17}H_{25}BrN_2O_3$ 385.30 g/mol FH0728
Following method A , 87f was obtained as a white powder (453 mg, 81%). $t_R = 4.20$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 0.83 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.33-1.44 (m, 11H), 3.06-3.27 (m, 4H), 4.38-4.44 (m, 1H), 5.17 (br s, 1H), 5.88-5.91 (m, 1H), 7.09 (td, $J = 2.1, 7.9$ Hz, 1H), 7.20-7.27 (m, 2H), 7.53 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 11.5, 22.8, 28.4, 39.1, 41.4, 55.0, 80.2, 125.1, 127.8, 128.8, 131.9, 133.1, 136.9, 155.5, 171.1.	

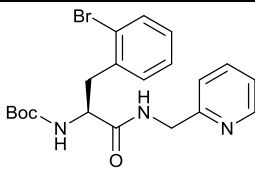
87g	tert-butyl (S)-(1-(allylamino)-3-(2-bromophenyl)-1-oxopropan-2-yl)carbamate
	$C_{17}H_{23}BrN_2O_3$ 383.29 g/mol FH0743
Following method A , 87g was obtained as a white powder (453 mg, 81%). $t_R = 4.10$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.35 (s, 9H), 3.11-3.14 (m, 1H), 3.26-3.30 (m, 1H), 3.82-3.87 (m, 2H), 4.44-4.48 (m, 1H), 5.07 (s, 1H), 5.10 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 5.16 (br s, 1H), 5.67-5.77 (m, 1H), 6.03 (br s, 1H), 7.10 (td, $J = 2.4, 8.2$ Hz, 1H), 7.21-7.27 (m, 2H), 7.54 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 28.4, 39.1, 42.1, 55.1, 80.4, 116.7, 125.1, 127.8, 128.8, 131.9, 133.1, 133.8, 136.8, 161.7, 171.0.	

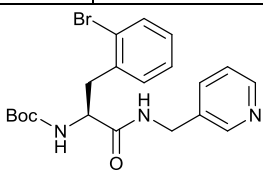
87h	tert-butyl (S)-(3-(2-bromophenyl)-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)propan-2-yl)carbamate
	C ₁₇ H ₂₁ BrN ₂ O ₃ 381.27 g/mol FH0729
Following method A , 87h was obtained as a white powder (166 mg, 84%). t_R = 3.92 min ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.35 (s, 9H), 2.19-2.22 (m, 1H), 3.05-3.13 (m, 1H), 3.26-3.32 (m, 1H), 3.93-4.07 (m, 2H), 4.42-4.51 (m, 1H), 5.13 (br s, 1H), 93.30 (br s, 1H), 7.08-7.12 (m, 1H), 7.21-7.24 (m, 2H), 7.54 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 28.2, 29.2, 38.6, 53.9, 71.7, 79.0, 80.5, 124.9, 127.7, 128.7, 131.7, 132.9, 136.4, 155.5, 170.8.	

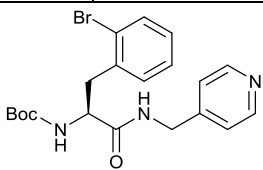
87i	tert-butyl (S)-(3-(2-bromophenyl)-1-((cyanomethyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate
	C ₁₆ H ₂₀ BrN ₃ O ₃ 382.26 g/mol FH0409
Following method A , 87i was obtained as a white powder (163 mg, quant.). t_R = 3.80 min ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.36 (s, 9H), 3.06-3.16 (m, 1H), 3.24-3.34 (m, 1H), 4.05-4.17 (m, 2H), 4.48-4.52 (m, 1H), 5.23 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.03 (br s, 1H), 7.09-7.14 (m, 1H), 7.23-7.26 (m, 2H), 7.54 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 27.6, 28.4, 38.3, 54.7, 81.2, 115.8, 125.0, 128.0, 129.1, 131.9, 133.2, 136.1, 171.8, 180.5.	

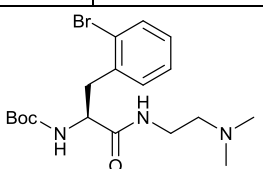
87j	tert-butyl (S)-(1-(benzylamino)-3-(2-bromophenyl)-1-oxopropan-2-yl)carbamate
	C ₂₁ H ₃₁ BrN ₂ O ₅ g/mol FH0707
Following method A , 87j was obtained as a white powder (88 mg, 95%). t_R = 12.27 min ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.35 (s, 9H), 3.10-3.17 (m, 1H), 3.31 (dd, <i>J</i> = 6.4, 13.6 Hz, 1H), 4.33-4.51 (m, 3H), 5.12 (br s, 1H), 6.18 (br s, 1H), 7.10 (td, <i>J</i> = 1.9, 7.7 Hz, 1H), 7.15 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 7.21 (td, <i>J</i> = 1.3, 7.3 Hz, 1H), 7.25-7.31 (m, 4H), 7.53 (dd, <i>J</i> = 1.3, 8 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 28.4, 43.8, 55.32, 82.7, 105.6, 124.1, 127.7, 127.9, 128.8, 128.9, 128.9, 131.9, 133.1, 136.8, 137.9, 155.8, 171.1.	

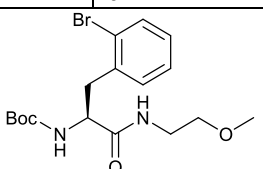
87k	tert-butyl (S)-(3-(2-bromophenyl)-1-oxo-1-(phenethylamino)propan-2-yl)carbamate
	$C_{22}H_{27}BrN_2O_3$ 447.37 g/mol FH0706
Following method A , 87k was obtained as a white powder (92 mg, 96%). $t_R = 12.63$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.35 (s, 9H), 2.63-2.76 (m, 2H), 3.01-3.09 (m, 1H), 3.22 (dd, $J = 6.4, 13.8$ Hz, 1H), 3.37-3.53 (m, 2H), 4.34-4.39 (m, 1H), 5.09 (br s, 1H), 5.81-5.85 (m, 1H), 7.07-7.12 (m, 3H), 7.19-7.30 (m, 5H), 7.54 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 28.2, 35.5, 40.6, 44.8, 51.3, 80.2, 124.9, 126.6, 127.6, 128.6, 128.7, 128.7, 131.7, 132.9, 136.7, 138.5, 149.5, 170.8.	

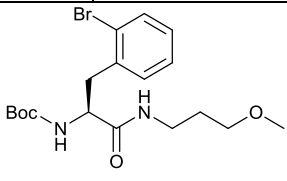
87l	tert-butyl (S)-(3-(2-bromophenyl)-1-oxo-1-((pyridin-2-ylmethyl)amino)propan-2-yl)carbamate
	$C_{20}H_{24}BrN_3O_3$ 434.33 g/mol FH0744
Following method A , 87l was obtained as a white powder (207 mg, 91%). $t_R = 3.30$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.36 (s, 9H), 3.01-3.15 (m, 1H), 3.32 (dd, $J = 6.1, 13.9$ Hz, 1H), 4.46-4.57 (m, 3H), 5.20 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.04-7.08 (m, 2H), 7.16-7.20 (m, 3H), 7.24-7.26 (m, 1H), 7.50 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.63 (t, $J = 7$ Hz, 1H), 8.48 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 28.4, 39.2, 44.6, 54.9, 80.4, 122.0, 122.5, 125.2, 127.7, 128.7, 131.7, 133.0, 136.8, 136.8, 149.2, 152.9, 161.6, 171.1.	

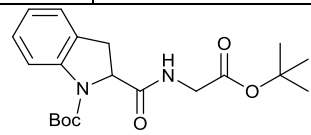
87m	tert-butyl (S)-(3-(2-bromophenyl)-1-oxo-1-((pyridin-3-ylmethyl)amino)propan-2-yl)carbamate
	$C_{20}H_{24}BrN_3O_3$ 434.33 g/mol FH0760
Following method A , 87m was obtained as a white powder (209 mg, 92%). $t_R = 3.04$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.33 (s, 9H), 3.09-3.15 (m, 1H), 3.25-3.30 (m, 1H), 4.34-4.43 (m, 2H), 4.47-4.50 (m, 1H), 5.19 (br s, 1H), 6.54 (br s, 1H), 7.09 (td, $J = 2.3, 7.9$ Hz, 1H), 7.17-7.23 (m, 3H), 7.48 (br s, 1H), 7.51 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.42 (br s, 1H), 8.49 (dd, $J = 1.5, 4.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 28.4, 38.9, 41.2, 55.1, 80.6, 123.7, 125.1, 127.8, 128.9, 131.9, 133.1, 133.7, 135.6, 136.6, 149.1, 149.4, 161.1, 171.3.	

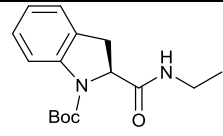
87n	tert-butyl (S)-(3-(2-bromophenyl)-1-oxo-1-((pyridin-4-ylmethyl)amino)propan-2-yl)carbamate
	C ₂₀ H ₂₄ BrN ₃ O ₃ 434.33 g/mol FH0756
<p>Following method A, 87n was obtained as a white powder (200 mg, 88%).</p> <p>$t_R = 2.98$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.35 (s, 9H), 3.11-3.16 (m, 1H), 3.26-3.31 (m, 1H), 4.38 (d, $J = 6$ Hz, 2H), 4.53-4.55 (m, 1H), 5.22 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 6.71 (br s, 1H), 7.04 (d, $J = 3.1$ Hz, 2H), 7.11 (td, $J = 2.1, 7.8$ Hz, 1H), 7.18-7.24 (m, 2H), 7.53 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.48 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 28.4, 38.7, 42.4, 55.1, 80.7, 122.3, 125.1, 127.9, 128.9, 131.9, 133.2, 136.5, 147.1, 150.2, 160.5, 171.6.</p>	

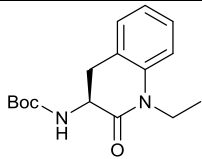
87o	tert-butyl (S)-(3-(2-bromophenyl)-1-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate
	C ₁₈ H ₂₈ BrN ₃ O ₃ 424.34 g/mol FH0766
<p>Following method A, 87o was obtained as a white powder (195 mg, 90%).</p> <p>$t_R = 2.92$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.36 (s, 9H), 2.36 (s, 6H), 2.55-2.59 (m, 2H), 3.05-3.12 (m, 1H), 3.23-3.29 (m, 2H), 3.40-3.47 (m, 1H), 4.38-4.42 (m, 1H), 5.24 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 6.53 (br s, 1H), 7.10 (td, $J = 2.5, 8$ Hz, 1H), 7.21-7.27 (m, 2H), 7.54 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 28.5, 36.6, 39.2, 45.0, 55.1, 58.2, 80.4, 125.1, 127.8, 128.8, 131.8, 133.1, 136.7, 155.7, 172.0.</p>	

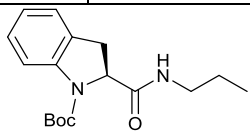
87p	tert-butyl (S)-(3-(2-bromophenyl)-1-((2-methoxyethyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate
	C ₁₇ H ₂₅ BrN ₂ O ₄ 401.30 g/mol FH0750
<p>Following method A, 87p was obtained as a white powder (212 mg, quant.).</p> <p>$t_R = 3.95$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.36 (s, 9H), 3.06-3.14 (m, 1H), 3.24-3.34 (m, 5H), 3.36-3.41 (m, 3H), 4.41-4.47 (m, 1H), 5.15 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 7.10 (td, $J = 2.6, 8.0$ Hz, 1H), 7.21-7.27 (m, 2H), 7.54 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 28.4, 39.3, 39.4, 55.3, 58.9, 71.1, 80.6, 125.1, 127.8, 128.8, 131.8, 133.1, 136.9, 160.8, 171.1.</p>	

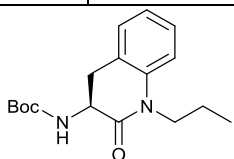
87q	tert-butyl (S)-(3-(2-bromophenyl)-1-((3-methoxypropyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate
	$C_{18}H_{27}BrN_2O_4$ 415.33 g/mol FH0761
<p>Following method A, 87q was obtained as a white powder (168 mg, 93%).</p> <p>$t_R = 4.04$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.36 (s, 9H), 1.63-1.70 (m, 2H), 3.05-3.11 (m, 1H), 3.22-3.39 (m, 8H), 4.38-4.45 (m, 1H), 5.17 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 6.37 (s, 1H), 7.09 (td, $J = 2.5, 8.0$ Hz, 1H), 7.20-7.26 (m, 2H), 7.54 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 28.4, 28.9, 38.4, 39.5, 54.9, 58.9, 71.8, 80.1, 125.1, 127.7, 128.7, 131.9, 133.1, 136.9, 162.4, 170.9.</p>	

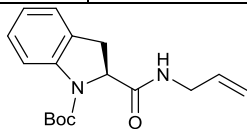
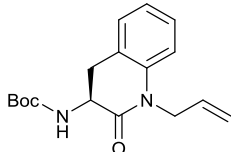
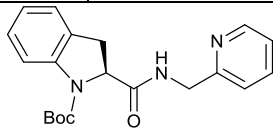
89a	tert-butyl 2-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)carbamoyl)indoline-1-carboxylate
	$C_{20}H_{28}N_2O_5$ 376.45 g/mol
<p>89a was obtained as a white oil following method H.</p> <p>$t_R = 11.67$ min</p> <p>1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 1.44 (s, 9H), 1.55 (br s, 9H), 3.28-3.34 (m, 1H), 3.47-3.53 (m, 1H), 3.85 (B of ABX, $J_{AB} = 18.3$ Hz, $J_{BX} = 4.7$ Hz, 1H), 3.98 (A of ABX, $J_{AB} = 18.3$ Hz, $J_{AX} = 5.3$ Hz, 1H), 4.87 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.58 (br s, 1H), 6.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.19 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.71 (br s, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): 28.2, 28.5, 33.0, 42.2, 62.1, 82.5, 82.6, 115.7, 123.5, 125.0, 127.9, 129.6, 141.9, 152.9, 168.6, 172.0.</p>	

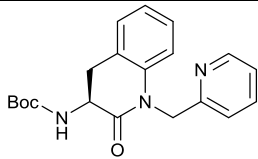
89e	tert-butyl (S)-2-(ethylcarbamoyl)indoline-1-carboxylate
	$C_{16}H_{22}N_2O_3$ 290.36 g/mol FH0745
<p>89e was obtained as a white oil following method H (18.5 mg, 47%).</p> <p>$t_R = 3.65$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.11 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.55 (s, 9H), 3.13-3.52 (m, 4H), 4.82 (dd, $J = 4.3, 11.2$ Hz, 1H), 6.11 (br s, 1H), 6.99 (td, $J = 0.9, 7.4$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.19 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.71 (br s, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 15.0, 28.5, 31.1, 34.5, 62.2, 82.4, 115.6, 123.5, 125.0, 127.8, 129.8, 141.8, 161.3, 171.6.</p>	

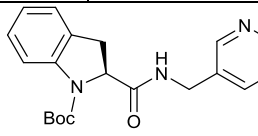
88e	tert-butyl (S)-(1-ethyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)carbamate
	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₃ 290.36 g/mol FH0745
<p>88e was obtained as a white oil following method H (10.2 mg, 26%).</p> <p>$t_R = 4.04$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.26 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.47 (s, 9H), 2.75 (t, $J = 14.6$ Hz, 1H), 3.41 (dd, $J = 5.3, 14.6$ Hz, 1H), 3.91 (dq, $J = 7.2, 14.2$ Hz, 1H), 4.08 (dq, $J = 7.2, 14.2$ Hz, 1H), 4.19-4.26 (m, 1H), 5.74 (br s, 1H), 7.03 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.27 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 13.1, 28.6, 38.7, 43.7, 50.6, 80.1, 115.1, 123.7, 125.1, 128.1, 128.9, 138.7, 161.8, 168.7.</p>	

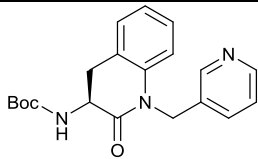
89f	tert-butyl (S)-2-(propylcarbamoyl)indoline-1-carboxylate
	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O ₃ 304.39g/mol FH0732
<p>89f was obtained as a white oil following method H (19.4 mg, 49%).</p> <p>$t_R = 3.86$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.49 (sex, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.55 (s, 9H), 3.07-3.15 (m, 1H), 3.24-3.33 (m, 2H), 3.43-3.52 (m, 1H), 4.84 (dd, $J = 4.1, 11.0$ Hz, 1H), 6.99 (td, $J = 0.8, 7.4$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.19 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.69 (br s, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 11.6, 23.4, 28.7, 35.8, 41.7, 62.4, 82.5, 115.8, 123.8, 125.4, 127.9, 133.2, 136.9, 162.9, 171.9.</p>	

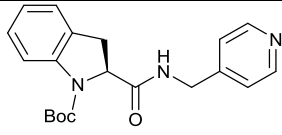
88f	tert-butyl (S)-(2-oxo-1-propyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)carbamate
	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O ₃ 304.39g/mol FH0732
<p>88f was obtained as a white oil following method H (6.2 mg, 16%).</p> <p>$t_R = 4.31$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.61-1.74 (m, 2H), 2.75 (t, $J = 14.6$ Hz, 1H), 3.41 (dd, $J = 5.0, 14.4$ Hz, 1H), 3.85-3.96 (m, 2H), 4.20-4.25 (m, 1H), 5.76 (br s, 1H), 8.99-7.05 (m, 2H), 7.20 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.26 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 11.5, 20.9, 28.7, 32.8, 45.0, 50.7, 80.0, 115.4, 123.7, 125.2, 128.1, 129.0, 138.8, 163.7, 169.3.</p>	

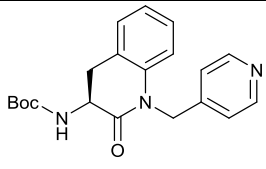
89g	tert-butyl (S)-2-(allylcarbamoyl)indoline-1-carboxylate		$C_{17}H_{22}N_2O_3$ 302.37 g/mol FH0751
<p>89g was obtained as a white oil following method H (19.4 mg, 49%).</p> <p>$t_R = 3.76$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.55 (s, 9H), 3.27-3.33 (m, 1H), 3.45-3.53 (m, 1H), 3.74-3.81 (m, 1H), 3.93-3.99 (m, 1H), 4.87 (dd, $J = 4.1, 11.2$ Hz, 1H), 5.08-5.15 (m, 2H), 5.76-5.83 (m, 1H), 6.28 (br s, 1H), 6.99 (td, $J = 0.9, 7.5$ Hz, 1H), 7.15-7.21 (m, 2H), 7.69 (br s, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 28.5, 32.9, 41.9, 62.2, 82.5, 115.7, 116.6, 123.6, 124.7, 128.9, 127.8, 1129.8, 134.0, 161.2, 171.6.</p>			
88g	tert-butyl (S)-(1-allyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)carbamate		$C_{17}H_{22}N_2O_3$ 302.37 g/mol FH0751
<p>88g was obtained as a white oil following method H (9.1 mg, 23%).</p> <p>$t_R = 4.10$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.47 (s, 9H), 2.80 (t, $J = 14.6$ Hz, 1H), 3.43 (dd, $J = 4.9, 14.4$ Hz, 1H), 4.26-4.33 (m, 2H), 4.79-4.85 (ddt, $J = 1.8, 4.8, 16.7$ Hz, 1H), 5.13-5.22 (m, 2H), 5.75 (br s, 1H), 5.89 (ddt, $J = 4.9, 10.4, 17.2$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.03 (td, $J = 0.5, 7.2$ Hz, 1H), 7.20-7.26 (m, 2H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 28.8, 32.7, 46.3, 50.6, 80.0, 115.8, 116.9, 123.9, 124.9, 128.1, 128.8, 132.3, 139.1, 162.2, 168.9.</p>			
89I	tert-butyl (S)-2-((pyridin-2-ylmethyl)carbamoyl)indoline-1-carboxylate		$C_{20}H_{23}N_3O_3$ 353.42 g/mol FH0767
<p>89I was obtained as a white oil following method H (5.7 mg, 14%).</p> <p>$t_R = 3.09$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.48 (s, 9H), 3.29-3.35 (m, 1H), 3.49-3.57 (m, 1H), 4.43 (B of ABX, $J_{AB} = 16.1$ Hz, $J_{BX} = 4.6$ Hz, 1H), 4.67 (A of ABX, $J_{AB} = 16.1$ Hz, $J_{AX} = 5.8$ Hz, 1H), 4.92 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 6.98 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 7.14-7.25 (m, 4H), 7.32 (br s, 1H), 7.63 (td, $J = 1.6, 7.7$ Hz, 1H), 7.72 (br s, 1H), 8.49 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 28.4, 32.3, 44.6, 62.3, 82.8, 115.7, 122.1, 122.6, 123.4, 125.0, 127.8, 136.9, 141.3, 143.4, 149.3, 156.5, 163.6, 172.9.</p>			

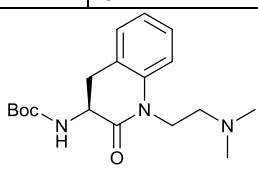
88l	tert-butyl (S)-(2-oxo-1-(pyridin-2-ylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)carbamate
	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₃ 353.42 g/mol FH0767
<p>88l was obtained as a white oil following method H (6.1 mg, 15%).</p> <p>$t_R = 3.50$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.48 (s, 9H), 2.89 (t, $J = 14.7$ Hz, 1H), 3.48 (dd, $J = 4.1, 14.4$ Hz, 1H), 4.38-4.45 (m, 1H), 4.45 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 5.58 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 5.78 (br s, 1H), 6.98-7.03 (m, 2H), 7.14-7.22 (m, 4H), 7.61 (td, $J = 1.6, 7.7$ Hz, 1H), 8.57 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 28.6, 32.9, 49.7, 66.0, 80.1, 116.2, 121.3, 122.6, 124.0, 124.8, 128.2, 128.8, 137.2, 139.3, 149.7, 156.7, 160.9, 169.6.</p>	

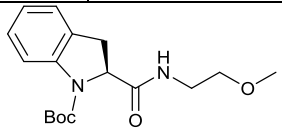
89m	tert-butyl (S)-2-((pyridin-3-ylmethyl)carbamoyl)indoline-1-carboxylate
	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₃ 353.42 g/mol FH0762
<p>89m was obtained as a white oil following method H (11.6 mg, 28%).</p> <p>$t_R = 2.87$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 1.23 (s, 9H), 2.88-2.94 (m, 1H), 3.48 (dd, $J = 11.3, 16.4$ Hz, 1H), 4.25-4.36 (m, 3H), 4.75 (dd, $J = 3.6, 11.4$ Hz, 1H), 6.89-6.94 (m, 1H), 7.13-7.17 (m, 2H), 7.24-7.36 (m, 2H), 7.55-7.60 (m, 1H), 8.45-8.51 (m, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 28.5, 35.6, 43.6, 66.0, 80.5, 117.2, 123.1, 124.5, 126.1, 127.5, 134.2, 135.6, 136.1, 141.0, 147.5, 147.9, 155.0, 171.3.</p>	

88m	tert-butyl (S)-(2-oxo-1-(pyridin-3-ylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)carbamate
	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₃ 353.42 g/mol FH0762
<p>88m was obtained as a white oil following method H (8 mg, 20%).</p> <p>$t_R = 2.95$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.48 (s, 9H), 2.85 (t, $J = 14.6$ Hz, 1H), 3.44-3.49 (m, 1H), 4.39-4.43 (m, 1H), 5.03 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 5.336 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 5.75 (br s, 1H), 6.88 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.03 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.17 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.21-7.26 (m, 2H), 7.52 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.54 (d, $J = 19.6$ Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 28.4, 32.3, 41.1, 62.1, 80.4, 115.7, 123.7, 125.1, 127.8, 128.8, 131.9, 133.1, 135.7, 136.6, 148.9, 149.3, 162.0, 171.5.</p>	

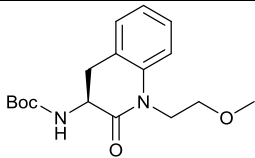
89n	tert-butyl (S)-2-((pyridin-4-ylmethyl)carbamoyl)indoline-1-carboxylate
	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₃ 353.42 g/mol FH0763
<p>89n was obtained as a white oil following method H (13 mg, 34%).</p> <p>$t_R = 7.74$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.35 (s, 9H), 3.12-3.18 (m, 1H), 3.28-3.34 (m, 1H), 4.38-4.39 (m, 2H), 4.49-4.59 (m, 1H), 6.64 (br s, 1H), 7.09-7.17 (m, 2H), 7.19-7.26 (m, 3H), 7.55 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.48-8.56 (m, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 28.5, 38.7, 42.5, 55.1, 80.8, 122.3, 125.1, 126.3, 127.9, 128.9, 131.9, 136.6, 147.1, 150.2, 160.3, 171.6.</p>	

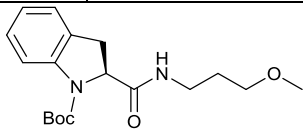
88n	tert-butyl (S)-(2-oxo-1-(pyridin-4-ylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)carbamate
	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₃ 353.42 g/mol FH0763
<p>88n was obtained as a white oil following method H (8.5 mg, 21%).</p> <p>$t_R = 7.52$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.68 (s, 9H), 3.09 (t, $J = 13.9$ Hz, 1H), 3.69 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H), 4.29-4.34 (m, 1H), 4.63-4.66 (m, 1H), 5.10 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 5.63 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.24-7.37 (m, 3H), 7.43-7.46 (d, 1H), 7.59-7.61 (m, 1H), 8.75 (m, 2H).</p>	

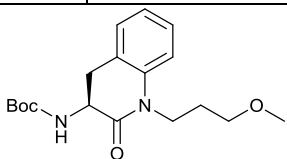
88o	tert-butyl (S)-(1-(2-(dimethylamino)ethyl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)carbamate
	C ₁₈ H ₂₇ N ₃ O ₃ 333.43 g/mol FH0769
<p>88o was obtained as a white oil following method H (7 mg, 17%).</p> <p>$t_R = 7.25$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.47 (s, 9H), 2.34 (s, 6H), 2.51-2.55 (m, 2H), 3.15-3.19 (m, 2H), 4.01-4.15 (m, 2H), 4.23-4.27 (m, 1H), 5.73 (br s, 1H), 7.02-7.07 (m, 2H), 7.20 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H).</p>	

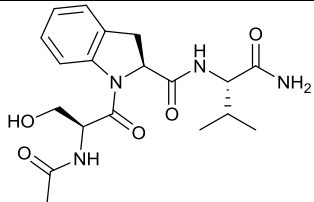
89p	tert-butyl (S)-2-((2-methoxyethyl)carbamoyl)indoline-1-carboxylate
	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O ₄ 320.39 g/mol FH0765-756
<p>89p was obtained as a white oil following method H (24.2 mg, 61%).</p> <p>$t_R = 3.63$ min</p>	

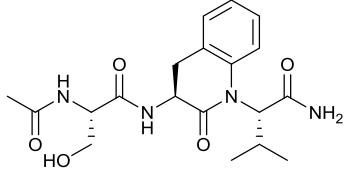
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 1.55 (s, 9H), 3.29 (s, 3H), 3.31-3.57 (m, 6H), 4.83 (dd, $J = 4.1, 11.0$ Hz, 1H), 6.49 (br s, 1H), 6.97 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.18 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.69 (s, 1H).
 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 28.4, 32.9, 39.4, 58.9, 62.2, 70.2, 82.3, 115.6, 123.4, 124.9, 127.8, 129.7, 141.8, 164.4, 171.9.

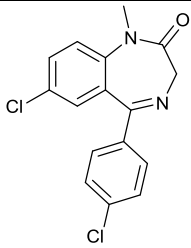
88p	tert-butyl (S)-(1-(2-methoxyethyl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)carbamate
	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ 320.39 g/mol FH0765-756
<p>88p was obtained as a white oil following method H (8.8 mg, 22%). $t_{\text{R}} = 3.90$ min ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 1.47 (s, 9H), 2.77 (t, $J = 14.6$ Hz, 1H), 3.35-3.42 (m, 4H), 3.59-3.67 (m, 2H), 3.95-4.03 (m, 1H), 4.24 (dt, $J = 5.0, 14.4$ Hz, 1H), 4.24-4.29 (m, 1H), 5.73 (br s, 1H), 7.04 (td, $J = 1.0, 7.3$ Hz, 1H), 7.18-7.28 (m, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 28.6, 32.8, 44.4, 50.7, 59.2, 69.9, 79.9, 116.3, 123.9, 125.2, 128.1, 128.8, 139.4, 161.2, 169.3.</p>	

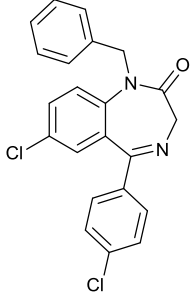
89q	tert-butyl (S)-2-((3-methoxypropyl)carbamoyl)indoline-1-carboxylate
	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ 334.42 g/mol FH0768
<p>89q was obtained as a white oil following method H (18.9 mg, 47%). $t_{\text{R}} = 3.74$ min ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 1.54 (s, 9H), 1.71 (quint., $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.22-3.27 (m, 5H), 3.34-3.54 (m, 4H), 4.81 (dd, $J = 3.6, 11.3$ Hz, 1H), 6.85 (br s, 1H), 6.97 (td, $J = 0.8, 7.4$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.19 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.74 (br s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 28.5, 28.9, 31.1, 38.6, 58.9, 62.3, 72.1, 82.1, 115.5, 123.4, 125.0, 127.8, 129.8, 141.9, 159.6, 171.8.</p>	

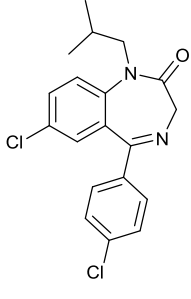
88q	tert-butyl (S)-(1-(3-methoxypropyl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-3-yl)carbamate
	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ 334.42 g/mol FH0768
<p>88q was obtained as a white oil following method H (6.1 mg, 15%). $t_{\text{R}} = 4.05$ min ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 1.47 (s, 9H), 1.87-1.97 (m, 2H), 2.76 (t, $J = 14.6$ Hz, 1H), 3.32 (s, 3H), 3.38-3.47 (m, 3H), 3.98-4.10 (m, 2H), 4.20-4.28 (m, 1H), 5.74 (br s, 1H), 7.03 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.26 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 27.9, 28.6, 31.0, 41.2, 40.4, 58.8, 70.2, 79.9, 115.4, 123.7, 125.0, 128.2, 128.9, 138.9, 161.0, 168.9.</p>	

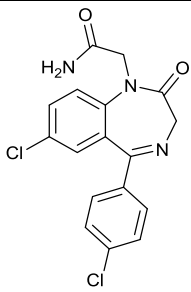
109	(S)-1-(acetyl-L-seryl)-N-((S)-1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)indoline-2-carboxamide
	$C_{19}H_{26}N_4O_5$ 394.44 g/mol
<p>109 was obtained as a white powder following method J. $t_R = 6.84$ min LC-MS calcd : 390.1, Found [M+H] : 391.0.</p>	

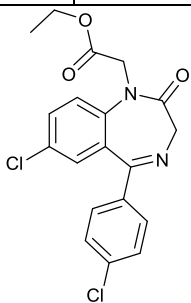
110	(S)-2-((S)-3-((S)-2-acetamido-3-hydroxypropanamido)-2-oxo-3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)-3-methylbutanamide
	$C_{19}H_{26}N_4O_5$ 394.44 g/mol
<p>109 was detected by UV. UVmax = 250 nm $t_R = 7.54$ min</p>	

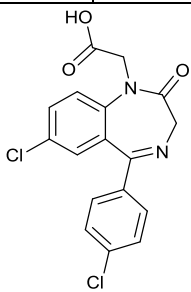
3	7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-1-methyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one
	$C_{16}H_{12}Cl_2N_2O$ 319.19 g/mol FH0150
<p>Method B was applied to 37 (400 mg, 1.31 mmol, 1 eq) to give 3 as an orange crystalline solid (346.3 mg, 83%) after purification on flash chromatography (0 to 70% of EtOAc in heptane). $t_R = 4.34$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 3.37 (s, 3H), 3.75 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 4.81 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.51 (dd, $J = 2.5, 8.8$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 35.1, 57.1, 122.8, 128.8, 129.6, 129.8, 129.8, 130.9, 131.8, 136.7, 137.1, 142.8, 167.9, 169.9.</p>	

122a	1-benzyl-7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one
	$C_{22}H_{16}Cl_2N_2O$ 395.28 g/mol FH0152
<p>Method B was applied to 37 (100 mg, 0.33 mmol, 1 eq) to give 122a as a white pale oil (128.7 mg, 99%) after purification on flash chromatography (0 to 70% of EtOAc in heptane).</p> <p>t_R = 4.87 min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 3.84 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 15.4 Hz, 1H), 4.89 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 5.64 (d, J = 15.4 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 7.10-7.17 (m, 4H), 7.28-7.41 (m, 6H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 49.9, 57.1, 124.2, 127.6, 127.7, 128.7, 128.9, 129.5, 130.2, 130.8, 131.6, 131.6, 136.4, 136.6, 137.1, 140.8, 168.3, 169.0.</p>	

122b	7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-1-(2-methylpropyl)-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one
	$C_{19}H_{18}Cl_2N_2O$ 361.27 g/mol FH0153
<p>37 (100 mg, 0.33 mmol, 1 eq) was added to a solution of toluene (2.5 mL) containing isobutyl bromide (71.3 μL, 0.65 mmol, 2 eq) and one drop of Aliquat 336. NaOH (50% aqueous solution, 0.5 mL) was added and heated for 16h at 55°C. Water (10 mL) and EtOAc (10 mL) were added to the reaction mixture and the organic phase was extracted, washed with brine, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. The yellow resulting residue was purified on flash chromatography (0 to 70% of EtOAc in heptane) to give 122b as a white pale oil (43.5 mg, 37%).</p> <p>t_R = 6.81 min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 0.63 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.76(d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.72-1.79 (m, 1H), 3.31 (dd, J = 6.0, 13.8 Hz, 1H), 3.74 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 4.33 (dd, J = 9.2, 13.7 Hz, 1H), 4.79 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.4 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.50 (dd, J = 2.5, 8.9 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 8.5 Hz, 2H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 19.5, 20.4, 27.2, 53.3, 57.4, 124.2, 129.0, 129.7, 130.0, 130.7, 131.5, 131.7, 136.6, 137.2, 141.7, 167.9, 169.8.</p>	

122c	2-[7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-1-yl]acetamide
	$C_{17}H_{13}Cl_2N_3O_2$ 362.21 g/mol FH0166
<p>Method B was applied to 37 (50 mg, 0.16 mmol, 1 eq) to give 122c as a yellow oil (58 mg, 98%) after purification on flash chromatography (0 to 10% of MeOH in DCM).</p> <p>$t_R = 3.97$min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 3.84 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 4.20 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 4.83 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 5.68 (br s, 1H), 6.26 (br s, 1H), 7.24 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.50-7.58 (m, 4H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 51.9, 56.8, 124.1, 128.9, 129.8, 130.2, 130.7, 131.0, 132.3, 136.6, 137.4, 141.7, 168.7, 168.8, 170.5.</p>	

122d	Ethyl 2-[7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-1-yl]acetate
	$C_{19}H_{16}Cl_2N_2O_3$ 391.25 g/mol FH0154
<p>Method B was applied to 37 (80 mg, 0.26 mmol, 1 eq) to give 122d as a white solid (99.4 mg, 97%) after purification on flash chromatography (0 to 70% of EtOAc in heptane).</p> <p>$t_R = 4.44$ min</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.22 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 3.84 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 4.10-4.22 (m, 2H), 4.47 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 4.83 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 7.25-7.28 (m, 2H), 7.38 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.49 (dd, $J = 2.5, 8.8$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 14.2, 49.6, 56.7, 61.9, 123.2, 128.9, 129.9, 130.3, 130.3, 131.0, 132.0, 136.8, 137.2, 141.6, 168.3, 168.6, 169.2.</p>	

123	2-[7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-1-yl]acetic acid
	$C_{17}H_{12}Cl_2N_2O_3$ 362.19 g/mol FH0159

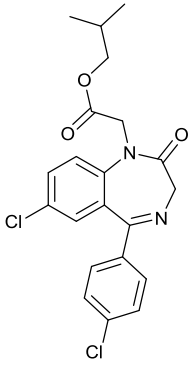
NaOH (30.2 mg, 0.75 mmol, 3 eq) was added to a solution of **122d** (98.5 mg, 0.25 mmol, 1 eq) in ethanol (5 mL) and water (2 mL) and stirred at rt for 2 h. Reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and acidified to pH 1 with an HCl 1N solution. Aqueous phase was extracted by 3x15 mL of DCM. Organic phases were assembled, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford **123** as a yellow solid (90 mg, 98%).

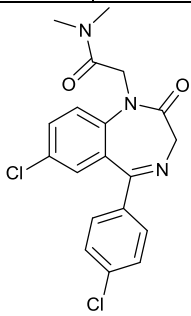
mp = 140°C

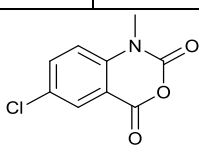
t_R = 4.17 min

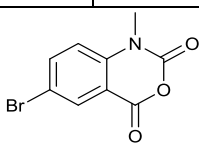
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.82 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.52 (s, 2H), 4.83 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 6.08 (br s, 1H), 7.22 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.49-7.52 (m, 3H).

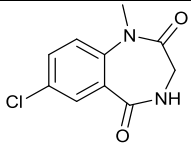
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 49.5, 56.1, 123.4, 128.9, 130.1, 130.6, 130.7, 131.1, 132.4, 136.4, 137.4, 141.3, 169.2, 169.3, 172.3.

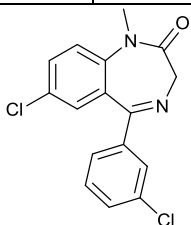
122f	2-methylpropyl 2-[7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-1-yl]acetate
	<p>C₂₁H₂₀Cl₂N₂O₃ 419.30 g/mol FH0160</p>
<p>122f was accidentally synthesized instead of 122e because the reaction was launched at rt instead of -10°C. 123 (25 mg, 0.068 mmol, 1 eq) was added to a solution of isobutyl chloroformate (10.8 μL, 0.083 mmol, 1.2 eq), dimethylamine (2M in THF, 41.3 μL, 0.083 mmol, 1.2 eq) and DIEA (22.7 μL, 0.13 mmol, 2 eq) in DCM (1.5 mL) and stirred for 2 h at rt. After completion in HPLC, reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was solubilized in EtOAc (10 mL) and washed twice with HCl 1N, NaHCO₃ sat, brine dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified on flash chromatography (0 to 70% of EtOAc in heptane) to afford 122f as a pale oil (15.1 mg, 52%) instead of 122e.</p> <p>t_R = 4.81 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.88 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz, 6H), 1.88 (n, <i>J</i> = 6.7 Hz, 1H), 3.83-3.98 (m, 3H), 4.48, 4.58 (ABq, <i>J</i>_{AB} = 17.4 Hz, 2H), 4.85 (d, <i>J</i> = 10.7 Hz, 1H), 7.26-7.28 (m, 2H), 7.40 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 7.50 (dd, <i>J</i> = 2.5, 8.8 Hz, 1H), 7.57 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 19.2, 19.2, 27.9, 49.6, 56.7, 71.9, 123.1, 128.9, 129.9, 130.4, 130.6, 131.0, 132.0, 137.2, 140.3, 141.6, 168.4, 168.7, 169.2.</p>	

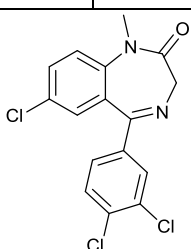
122e	2-[7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-1-yl]-N,N-dimethylacetamide
	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂ 390.26 g/mol FH0162
<p>122e was prepared following the same method than 122f but at -10°C. 122e was obtained as a colorless oil (10 mg, 40%) after purification on reversed phase flash chromatography (0 to 100% MeOH in Water) and characterized by LCMS.</p> <p>t_R = 4.08 min LC-MS calcd : 389.0, Found [M+H] : 390.0</p>	

125a	5-Chloro-N-methylisatoic anhydride
	C ₉ H ₆ ClNO ₃ 211.60 g/mol FH0190
<p>6-chloroisatoic anhydride 124a (1 g, 4.9 mmol, 1 eq) was alkylated by MeI (397 μL, 5.9 mmol, 1.2 eq) following method B and 125a was obtained as a crystalline white powder after precipitation and filtration (898 mg, 86%)</p> <p>t_R = 3.41 min ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.58 (s, 3H), 7.14 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.72 (dd, J = 2.5, 8.9 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 2.5 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 32.7, 113.1, 115.7, 130.1, 130.2, 137.4, 140.7, 147.7, 157.5.</p>	

125b	5-Bromo-N-methylisatoic anhydride
	C ₉ H ₆ BrNO ₃ 256.06 g/mol FH0285
<p>According to method B, 125b was obtained as a beige powder (518.7 mg, 49%).</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.57 (s, 3H), 7.08 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.85 (dd, J = 2.0, 8.8 Hz, 1H), 8.26 (d, J = 2.0 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 32.2, 113.4, 115.9, 117.1, 133.2, 140.3, 141.2, 147.6, 157.4.</p>	

126a	7-Chloro-3,4-dihydro-1-methyl-1H-1,4-benzodiazepine-2,5-dione
	C ₁₀ H ₉ ClN ₂ O ₂ 224.64 g/mol FH0203
<p>Compound 125a (750 mg, 3.44 mmol, 1 eq) and glycine ethyl ester hydrochloride (1.68 g, 12.05 mmol, 3.4 eq) were heated in pyridine (5.5 mL) at 120°C for 6 h. AcOH (8 mL) was added to the reaction mixture and the vessel was heated at 120°C for 12 more hours. Reaction mixture was poured on a mixture of water and ice and extracted with EtOAc. Organic layers were combined, washed by HCl 1N, NaHCO₃ sat and brine. After drying and evaporation, the transparent oily residue was purified on flash chromatography (10 to 100% of EtOAc in heptane) to give 126a as a white solid (462 mg, 58%).</p> <p>$t_R = 2.95$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.37 (s, 3H), 3.82 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 7.17 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.50 (dd, $J = 2.5, 8.7$ Hz, 1H), 7.65-7.68 (m, 1H), 7.85 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 35.7, 45.5, 123.1, 128.9, 130.6, 131.7, 132.8, 140.0, 168.4, 169.6.</p>	

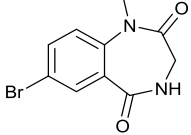
128a	7-chloro-5-(3-chlorophenyl)-1-methyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one
	C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O 319.19 g/mol FH0263
<p>Following method D, 128a was obtained as a white solid after purification on semi-preparative HPLC (12 mg, 46%).</p> <p>$t_R = 5.85$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.43 (s, 3H), 3.81 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.89 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.36-7.43 (m, 2H), 7.48-7.58 (m, 3H), 7.62 (dd, $J = 1.4, 8.8$ Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 35.6, 55.3, 123.3, 128.4, 128.5, 130.2, 130.3, 130.4, 130.7, 132.4, 133.5, 135.2, 138.0, 143.0, 167.1, 170.5.</p> <p>HR-MS calcd: 318.0327, Found [M+H]: 319.0406</p>	

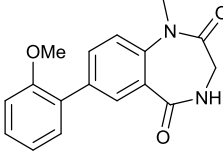
128b	7-chloro-5-(3,4-dichlorophenyl)-1-methyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one
	C ₁₆ H ₁₁ Cl ₃ N ₂ O 353.63 g/mol FH0264
<p>Following method D, 128b was obtained as a white oil after purification on semi-preparative HPLC (4.7 mg, 22%).</p> <p>$t_R = 6.34$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.43 (s, 3H), 3.78 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.88 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 7.25-7.27</p>	

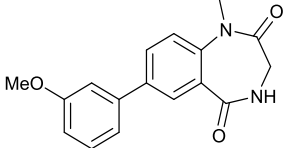
(m, 1H), 7.36 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.62 (dd, $J = 2.5, 8.8$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 35.5, 55.9, 123.3, 128.7, 129.1, 130.2, 130.3, 130.9, 131.7, 133.1, 133.5, 136.5, 136.8, 142.9, 168.7, 169.4.

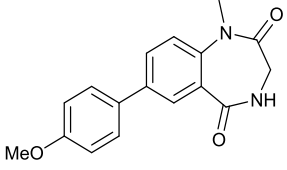
HR-MS calcd: 351.9937, Found $[\text{M}+\text{H}]$: 353.0015

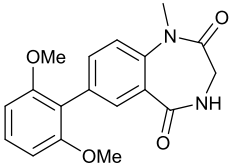
126b	7-Bromo-3,4-dihydro-1-methyl-1H-1,4-benzodiazepine-2,5-dione
	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}_2$ 269.10 g/mol FH0287
Same protocole as for 126a , 126b was obtained, after purification on flash chromatography (10 to 100% of EtOAc in heptane), as a white solid (130 mg, 62%). $t_R = 3.06$ min ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 3.37 (s, 3H), 3.82 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 7.10 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.32-7.34 (m, 1H), 7.65 (dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 35.7, 45.5, 119.3, 123.4, 129.2, 133.6, 135.8, 140.5, 168.1, 168.5.	

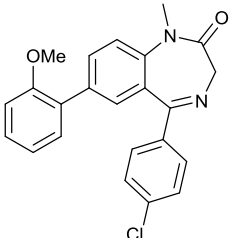
127c	7-(2-methoxyphenyl)-1-methyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1,4-benzodiazepine-2,5-dione
	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ 296.33 g/mol FH0329
Following method C , 127c (48.6 mg, 88%) was obtained as a white powder after purification on reversed-phase flash chromatography (0 to 100% of MeOH in water). $t_R = 3.34$ min ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 3.43 (s, 3H), 3.84-3.87 (m, 5H), 7.02-7.04 (m, 2H), 7.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.35-7.37 (m, 2H), 7.76-7.78 (m, 2H), 8.05 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 35.7, 45.7, 55.7, 11.4, 121.2, 121.3, 126.8, 128.3, 129.6, 130.8, 131.6, 134.1, 136.5, 140.2, 156.6, 170.0, 170.2.	

127d	7-(3-methoxyphenyl)-1-methyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1,4-benzodiazepine-2,5-dione
	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ 296.33 g/mol FH0309
Following method C , 127d (57.6 mg, 95%) was obtained as a white solid after purification on reversed-phase flash chromatography (0 to 100% MeOH in water). $t_R = 3.39$ min ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 3.45 (s, 3H), 3.87-3.89 (m, 5H), 6.92 (dd, $J = 2.4, 8.2$ Hz, 1H), 7.15-7.18 (m, 1H), 7.21 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.37 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.77 (dd, $J = 2.1, 8.5$ Hz, 1H), 8.06-8.09 (m, 1H), 8.12 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 35.6, 45.6, 55.5, 112.7, 113.6, 119.5, 122.1, 127.8, 129.1, 130.1, 134.2,	

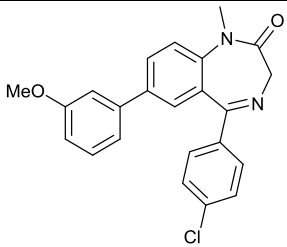
138.7, 140.4, 140.6, 160.2, 169.8, 170.0.

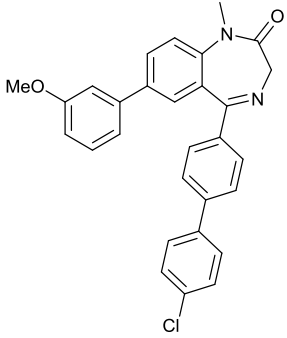
127e	7-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1,4-benzodiazepine-2,5-dione
	$C_{17}H_{16}N_2O_3$ 296.33 g/mol FH0301
Following method C , 127e (40.6 mg, 74%) was obtained as a white solid after purification on reversed-phase flash chromatography (0 to 100% MeOH in water). $t_R = 3.36$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 3.41 (s, 3H), 3.83-3.86 (m, 5H), 6.98 (dd, $J = 1.5, 8.7$ Hz, 2H), 7.24-7.28 (m, 1H), 7.52-7.55 (m, 3H), 7.70-7.74 (m, 1H), 8.05-8.09 (m, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 35.6, 45.7, 55.6, 114.6, 122.1, 127.8, 128.2, 128.5, 130.7, 131.4, 138.6, 140.0, 159.9, 169.7, 169.9.	

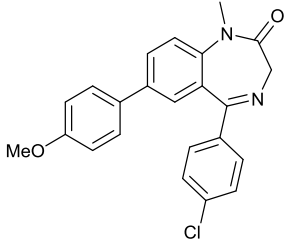
127f	7-(2,6-dimethoxyphenyl)-1-methyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1,4-benzodiazepine-2,5-dione
	$C_{18}H_{18}N_2O_4$ 326.35 g/mol FH0310
Following method C , 127f (33.1 mg, 55%) was obtained as a pale oil after purification on reversed-phase flash chromatography (0 to 100% MeOH in water). $t_R = 3.23$ min 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 3.43 (s, 3H), 3.75 (s, 6H), 3.86-3.90 (m, 2H), 6.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.19-7.25 (m, 2H), 7.29 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.56 (dd, $J = 2.1, 8.5$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 35.7, 45.5, 119.3, 123.4, 129.2, 133.6, 135.8, 140.5, 168.1, 168.5.	

128c	5-(4-chlorophenyl)-7-(2-methoxyphenyl)-1-methyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one
	$C_{23}H_{19}ClN_2O_2$ 390.87 g/mol FH0342
128c was prepared following method D followed by a reversed-phase flash chromatography (0 to 100% MeOH in water). 128c was obtained as an orange solid (11.6 mg, 19%). $t_R = 12.75$ min 1H NMR (500 MHz, MeOD): 3.51 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 4.10 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 7.00 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.34 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.60 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.68-7.73 (m, 3H), 7.95 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD): 35.9, 55.2, 56.1, 112.8, 122.3, 123.3, 126.6, 128.9, 130.4, 131.1, 131.4,	

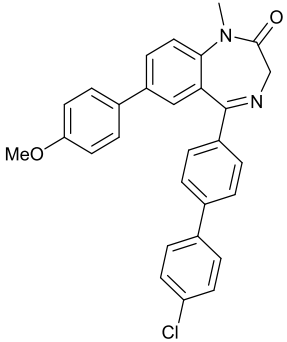
133.7, 134.3, 136.3, 136.9, 140.8, 144.9, 157.9, 170.3, 175.0.

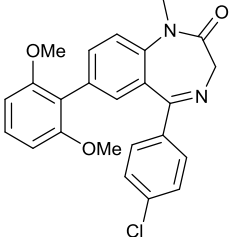
128d	5-(4-chlorophenyl)-7-(3-methoxyphenyl)-1-methyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one
	$C_{23}H_{19}ClN_2O_2$ 390.87 g/mol FH0315
<p>128d was obtained as a minority product (1.8 mg, 5%) after method D on 127d and reversed phase flash chromatography (0 to 100% MeOH in water). Characterization was performed by LC-MS.</p> <p>$t_R = 3.15$ min LC-MS calcd : 390.1, Found [M+H] : 391.0</p>	

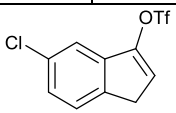
129d	5-[4-(4-chlorophenyl)phenyl]-7-(3-methoxyphenyl)-1-methyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one
	$C_{29}H_{23}ClN_2O_2$ 466.97 g/mol FH0315
<p>129d was obtained as a minority product (2.6 mg, 5%) after method D on 127d and reversed phase flash chromatography (0 to 100% MeOH in water). Characterization was performed by LC-MS</p> <p>$t_R = 3.46$ min LC-MS calcd : 466.1, Found [M+H] : 467.0</p>	

128e	5-(4-chlorophenyl)-7-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one
	$C_{23}H_{19}ClN_2O_2$ 390.87 g/mol FH0314
<p>128e (12.8 mg, 32%) was obtained after method D on 127e and reversed phase flash chromatography (0 to 100% MeOH in water). Characterization was performed by LC-MS.</p> <p>$t_R = 3.77$ min</p>	

LC-MS calcd : 390.1, Found [M+H] : 391.0

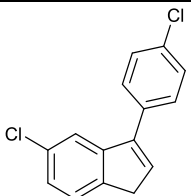
129e	5-[4-(4-chlorophenyl)phenyl]-7-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one
	C ₂₉ H ₂₃ ClN ₂ O ₂ 466.97 g/mol FH0314
<p>129e (5.7mg, 12%) was obtained as a minority product after method D on 127e and reversed phase flash chromatography (0 to 100% MeOH in water). Characterization was performed by LC-MS</p> <p>t_R = 3.44 min</p> <p>LC-MS calcd : 466.1, Found [M+H] : 467.0</p>	

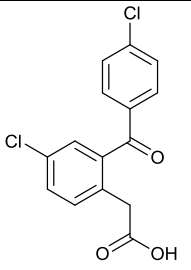
128f	5-(4-chlorophenyl)-7-(2,6-dimethoxyphenyl)-1-methyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one
	C ₂₄ H ₂₁ ClN ₂ O ₃ 420.89 g/mol FH0341
<p>128f (4.7 mg, 11%) was obtained after method D on 127e and reversed phase flash chromatography (0 to 100% MeOH in water).</p> <p>t_R = 12.37 min</p> <p>¹H NMR (500 MHz, MeOD): 3.51 (s, 3H), 3.72 (s, 6H), 4.14 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 4.62 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.27-7.32 (m, 2H), 7.60 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.5 Hz, 1H).</p> <p>¹³C NMR (125 MHz, MeOD): 35.9, 55.2, 56.4, 105.5, 114.7, 122.6, 126.2, 129.6, 130.3, 131.2, 132.6, 133.7, 135.2, 136.2, 139.1, 140.8, 144.7, 158.9, 170.3, 175.1</p>	

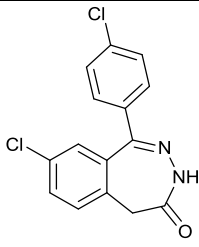
141	5-chloro-1H-inden-3-yl trifluoromethanesulfonate
	C ₁₀ H ₆ ClF ₃ O ₃ S 298.66 g/mol FH0161
<p>To a solution of 6-chloroindan-1-one 140 (200 mg, 1.2 mmol, 1 eq) and Tf₂O (238.6 μL, 1.44 mmol, 1.2 eq) in DCM (4 mL) was added 2,6-<i>tert</i>-butylpyridine (349.4 μL, 1.56 mmol, 1.3 eq). After 20 min</p>	

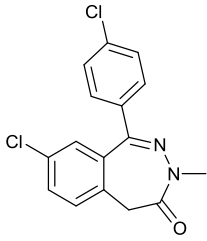
stirring at rt, reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was solubilized in EtOAc (15 mL). The organic phase was washed twice with water and brine. After drying on Na₂SO₄ and concentration under reduced pressure, the resulting residue was purified on silica gel (EtOAc 10% in heptane) to afford **141** as a colorless oil (349.6 mg, 98%).

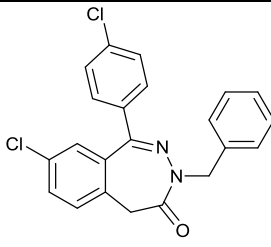
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 3.47 (s, 2H), 6.44 (s, 1H), 7.32-7.39 (m, 3H).

142	5-chloro-3-(4-chlorophenyl)-1H-indene
	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ 261.15 g/mol FH0178
<p>Following method C on 141, 142 was obtained as a pale cream solid (313 mg, 85%).</p> <p>$t_R = 5.91$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.30 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 6.45 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.08 (dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, 1H), 7.25-7.34 (m, 6H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 38.0, 120.5, 125.2, 125.2, 19.0, 129.1, 132.6, 133.1, 133.9, 134.0, 142.9, 143.7, 145.5.</p>	

143	2-(4-chloro-2-(4-chlorobenzoyl)phenyl)acetic acid
	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ O ₃ 309.14 g/mol FH0180
<p>H₂SO₄ (1.5 mL) was added dropwise at 0°C to a solution of Na₂Cr₂O₇ (601.9 mg, 2.30 mmol, 2 eq) in water (10 mL). 142 (300 mg, 1.15 mmol, 1eq) was solubilized in acetone (10 mL) then added dropwise at 0°C to the previous solution. Reaction mixture was warmed up to rt for 5h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and 50 mL of EtOAc and brine were added. Phases were decanted and organic phase was extracted trice by 50 mL of NaOH 1M solution. Basics aqueous phase were combined then acidified until pH 1 with HCl 2N then extracted three time with DCM. Organic phases were assembled then washed over brine and dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to afford 143 as a slightly yellow oil (169.3 mg, 48%).</p> <p>$t_R = 4.51$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.81 (s, 2H), 7.32 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.44-7.49 (m, 3H), 7.73 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 38.5, 129.1, 130.0, 131.6, 132.0, 132.2, 133.3, 133.5, 135.3, 139.2, 140.5, 175.0, 196.0.</p>	

144	8-chloro-1-(4-chlorophenyl)-4,5-dihydro-3H-2,3-benzodiazepin-4-one
	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O 305.16 g/mol FH0192
<p>A solution of 143 (169 mg, 0.55 mmol, 1 eq) and hydrazine hydrate (60.3 mg, 1.20 mmol, 2.2 eq) in <i>n</i>-BuOH (15 mL) was stirred at 120°C for 36 hours. After completion, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified over silica gel (MeOH 4% in DCM) to afford 144 as a white powder (129 mg, 78%).</p> <p>t_R = 4.63 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.56 (s, 2H), 7.19 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 7.34 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 7.42 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 7.50-7.56 (m, 3H), 8.85 (br s, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 41.7, 129.0, 129.2, 129.8, 130.6, 132.4, 132.6, 133.3, 134.6, 135.8, 136.8, 159.6, 170.7.</p>	

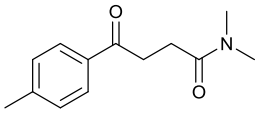
145a	8-chloro-1-(4-chlorophenyl)-3-methyl-4,5-dihydro-3H-2,3-benzodiazepin-4-one
	C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O 319.19 g/mol FH0210
<p>145a was obtained, after method B in THF and purification on flash chromatography (EtOAc 0 to 70% in heptane), as a white solid (20 mg, 96%).</p> <p>t_R = 6.54 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.61 (s, 3H), 3.42 (s, 2H), 7.18 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 7.34 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.41 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 7.49 (dd, <i>J</i> = 2.1, 8.3, Hz, 1H), 7.55 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 38.5, 41.1, 128.9, 129.0, 129.4, 130.7, 132.1, 32.4, 133.0, 135.4, 135.7, 136.9, 159.6, 167.7.</p> <p>HR-MS calcd: 318.0326, Found [M+H]⁺: 319.0397</p>	

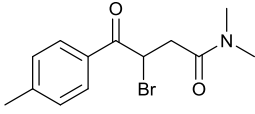
145b	3-benzyl-8-chloro-1-(4-chlorophenyl)-4,5-dihydro-3H-2,3-benzodiazepin-4-one
	C ₂₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O 395.28 g/mol FH0211
<p>145b was obtained, after method B in THF and purification on flash chromatography (EtOAc 0 to 70% in heptane), as a white solid (25 mg, 97%).</p> <p>t_R = 7.34 min</p>	

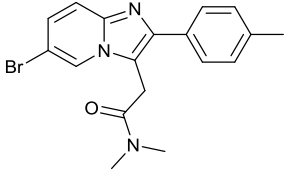
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.42 (br s, 1H), 3.69 (br s, 1H), 4.89 (br s, 1H), 5.22 (br s, 1H), 7.12 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.17-7.27 (m, 5H), 7.34-7.37 (m, 3H), 7.42 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.50 (dd, *J* = 2.1, 8.2 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 41.9, 54.1, 127.5, 128.4, 128.6, 128.8, 129.0, 129.5, 130.7, 132.1, 132.5, 133.1, 135.3, 135.8, 136.9, 137.3, 160.3, 167.3.

HR-MS calcd: 394.0639, **Found [M+H]:** 395.0722

156	N,N-dimethyl-4-oxo-4-(p-tolyl)butanamide
	C ₁₃ H ₁₇ NO ₂ 219.28 g/mol FH0189
<p>EDCI HCl (299.2 mg, 1.56 mmol, 1 eq) was added to a solution of 3-(p-toluoyl)propionic acid 155 (300 mg, 1.56 mmol, 1 eq) in DCM (10 mL) and stirred for 10 minutes. Dimethylamine (2M in THF, 1.17 mL, 2.34 mmol, 1.5 eq) was added and stirred overnight. Reaction mixture was then concentrated and the residue was solubilized in EtOAc (20 mL) and HCl 1N (20 mL). The organic phase was washed by HCl 1N (1x20 mL), NaHCO₃ sat (2x10 mL) and brine (1x10 mL). The orange organic layer was then dried on Na₂SO₄ and volatiles were evaporated under reduce pressure to give a crude orange oil that was purified on silica gel column (5% MeOH in DCM) to give an orange solid (173 mg, 51%).</p> <p><i>t_R</i> = 3.34 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.35 (s, 3H), 2.72 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz, 2H), 2.92 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 3.28 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz, 2H), 7.21 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H), 7.87 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 21.6, 27.3, 33.6, 34.5, 37.1, 128.2, 129.2, 134.4, 143.7, 171.7, 198.9.</p>	

157	3-bromo-N,N-dimethyl-4-oxo-4-(p-tolyl)butanamide
	C ₁₃ H ₁₆ BrNO ₂ 298.18 g/mol FH0193
<p>Br₂ (59.7 μL, 1.16 mmol, 1.5 eq) was added at 0°C to a solution of 156 (170 mg, 0.77 mmol, 1 eq) in DCM (8mL) and stirred for 1 h at 0°C then allowed to return to rt. The reaction mixture was stirred overnight, concentrated and directly purified on flash chromatography (EtOAc 10 to 70% in heptane) to afford product 157 as white crystals (195 mg, 84%).</p> <p><i>t_R</i> = 3.72 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.41 (s, 3H), 2.90 (s, 3H), 3.04 (dd, <i>J</i> = 4.4, 16.1 Hz, 1H), 3.06 (s, 3H), 3.58 (dd, <i>J</i> = 9.8, 16.2 Hz, 1H), 5.64 (dd, <i>J</i> = 4.5, 9.8 Hz, 1H), 7.28 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H), 7.97 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 21.8, 35.3, 37.2, 38.4, 40.7, 129.2, 129.5, 131.7, 144.7, 169.8, 192.8.</p>	

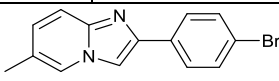
159	2-(6-bromo-2-(p-tolyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dimethylacetamide
	C ₁₈ H ₁₈ BrN ₃ O 372.26 g/mol FH0252
<p>158 (84 mg, 0.28 mmol, 1 eq) and 2-amino-5-bromopyridine (48.7 mg, 0.28 mmol, 1 eq) were</p>	

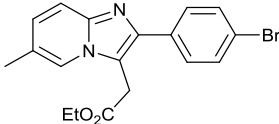
heated in *n*-BuOH for 20h. The reaction mixture was concentrated under reduce pressure and the residue was purified by flash chromatography (EtOAc 20 to 80% in heptane) to give a yellow solid (60.9 mg, 58%).

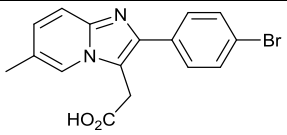
$t_R = 2.97$ min

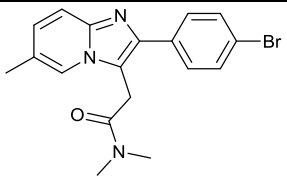
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.42 (s, 3H), 2.95 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 4.08 (s, 2H), 7.25-7.29 (m, 3H), 7.52-7.58 (m, 3H), 8.36 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H).

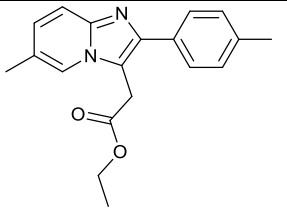
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 21.5, 30.1, 36.1, 37.7, 107.1, 114.9, 117.7, 124.9, 128.1, 128.6, 129.6, 131.1, 138.2, 143.6, 144.8, 168.0.

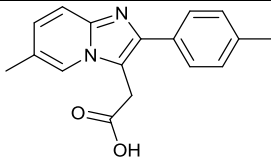
168	2-(4-bromophenyl)-6-methylimidazo[1,2-a]pyridine
	$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrN}_2$ 287.16 g/mol FH0089
2-amino-5-methylpyridine 166 (1 g, 9.24 mmol, 1eq) and 2,4'-dibromoacetophenone 167 (2.7 g, 9.71 mmol, 1.05 eq) were refluxed in EtOH with K_2CO_3 (2.55 g, 18.49 mmol, 2 eq) over the weekend. Water was added to the mixture and the brown precipitate was filtered, washed until it's white with water and EtOH then dried to give a white/beige powder (1.67 g, 63%).	
$t_R = 3.32$ min	
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.31 (s, 3H), 7.02 (dd, $J = 1.8, 9.3$ Hz, 1H), 7.49-7.55 (m, 3H), 7.74 (s, 1H), 7.79 (dt, $J = 2.5, 8.5$ Hz, 2H), 7.86-7.87 (m, 1H).	
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 18.3, 108.2, 117.0, 121.9, 122.6, 123.5, 127.7, 128.5, 132.0, 133.0, 144.5, 144.9.	

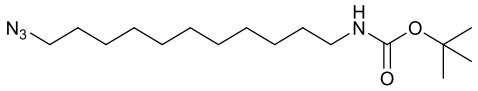
169	ethyl 2-(2-(4-bromophenyl)-6-methylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)acetate
	$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{BrN}_2\text{O}_2$ 373.25 g/mol FH0092
Ethyl diazoacetate (366 μL , 3.48 mmol, 1 eq) was slowly added to a solution of 168 (1 g, 3.48 mmol, 1 eq) and copper (177 mg, 2.78 mmol, 0.8 eq) in toluene (7 mL) then refluxed for 1h. After cooling, 10 mL of methanol were added to the reaction mixture and the organic phase was extracted with 3x10mL HCl 1N. The aqueous phases were combined and neutralized with NaHCO_3 sat. The formed precipitate was extracted 3 times with DCM. Organic phases were combined, dried over Na_2SO_4 and evaporated. The resulting oil was purified on reverse phase flash chromatography (MeOH 0 to 100% in water) to give 169 as a yellow oil (507 mg, 39%).	
$t_R = 3.41$ min	
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 2.50 (s, 3H), 4.02 (s, 2H), 4.28 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.65-7.70 (m, 4H), 8.09 (s, 1H), 8.26 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H).	
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 14.3, 18.7, 30.2, 62.7, 114.5, 114.6, 122.5, 125.3, 126.2, 127.4, 130.6, 132.9, 134.4, 136.4, 140.1, 167.9.	

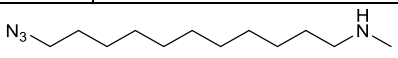
170	2-(2-(4-bromophenyl)-6-methylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)acetic acid
	C ₁₆ H ₁₃ BrN ₂ O ₂ 345.20 g/mol FH0098
<p>169 (500 mg, 1.34 mmol, 1 eq) was solubilized in an ethanol/water mixture (9/1) with KOH (150 mg, 2.67 mmol, 2 eq) and stirred for 2 hours. 2 spoon of Amberlyst 15 were added to the mixture and an orange precipitate appeared. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was solubilized in DMF and filtered over celite to remove resin marbles. Filtrate was concentrated under reduce pressure affording an orange solid (422 mg, 91%).</p> <p>$t_R = 3.19$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 4.18 (s, 2H), 7.50 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.66-7.72 (m, 3H), 7.76 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 8.49 (s, 1H), 13.06 (br s, 1H).</p>	

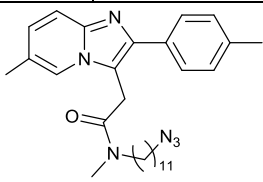
171	2-(2-(4-bromophenyl)-6-methylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-dimethylacetamide
	C ₁₈ H ₁₈ BrN ₃ O 372.27 g/mol FH0099
<p>170 (50 mg, 0.14 mmol, 1 eq) was coupled with dimethylamine (2M in THF, 79.7 μL, 0.159 mmol, 1.1 eq) following method A. Resulting crude was purified on column chromatography (1 to 10% of MeOH in DCM) to give a slightly orange brown oil (23.5 mg, 44%).</p> <p>$t_R = 3.08$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.33 (s, 3H), 2.94 (s, 3H), 2.96 (s, 3H), 4.04 (s, 2H), 7.06 (dd, <i>J</i> = 1.8, 9.3 Hz, 1H), 7.49-7.58 (m, 5H), 7.92 (s, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 18.7, 30.3, 36.1, 36.7, 114.3, 116.9, 122.1, 122.3, 122.3, 128.1, 130.3, 131.9, 133.9, 142.8, 144.4, 168.2.</p>	

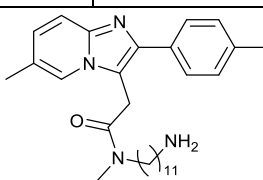
177	ethyl 2-(6-methyl-2-(p-tolyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)acetate
	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₂ 308.38 g/mol FH0073
<p>Ethyl diazoacetate (236 μL, 2.24 mmol, 1 eq) was slowly added to a solution of 176 (500 mg, 2.24 mmol, 1 eq) and copper (114 mg, 1.79 mmol, 0.8 eq) in toluene (15 mL) then refluxed for 1h. After cooling, 10 mL of methanol were added to the reaction mixture and the organic phase was extracted with 3x10mL HCl 1N. The aqueous phases a assembled and neutralized with NaHCO₃ sat and the precipitate was extracted 3 times with DCM. Organic phases were combined, dried over Na₂SO₄ and evaporated. The resulting oil was an inseparable mixture of starting material and desired product. Estimated yield : 50% (ratio and quantity)</p> <p>$t_R = 3.37$ min</p> <p>No NMR could be performed, the purification will occur on next step.</p>	

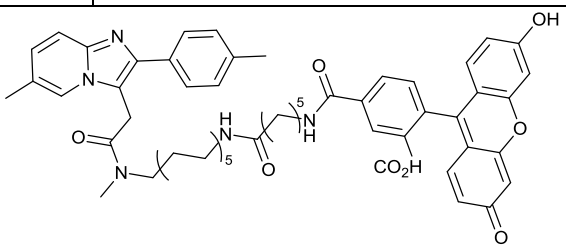
178	2-(6-methyl-2-(p-tolyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)acetic acid
	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₂ 280.33 g/mol FH0076
<p>177 (70 mg, 0.22 mmol, 1 eq) was solubilized in an EtOH/water mixture (9/1) with KOH (25 mg, 0.45 mmol, 2 eq) and stirred for 2 hours. 2 spoon of Amberlyst 15 were added to the mixture and an orange precipitate appears. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was solubilized in DMF and filtered on celite to remove resin marbles. Filtrate was concentrated under reduce pressure affording brown solid (16 mg, 26%). Low yield was due to the retention of the product on celite.</p> <p>$t_R = 3.06$ min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): 2.28 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 3.67 (s, 2H), 7.04 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.22 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H), 7.42 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.81 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H), 8.18 (s, 1H).</p>	

152	<i>tert</i>-butyl (11-azidoundecyl)carbamate
	C ₁₆ H ₃₂ N ₄ O ₂ 312.46 g/mol FH0081
<p>11-azidoundecanamine hydrochloride 151 (63.4 mg, 0.25 mmol, 1 eq) was solubilized was solubilized in DCM and DIEA (42 μL, 0.25 mmol, 1 eq) was added. After 15 minutes stirring, mixture Boc₂O (55.6 mg, 0.25 mmol, 1 eq) was added. After 1h stirring, volatiles were evaporated under reduced pressure and the crude was purified on column chromatography (EtOAc 20% in heptane) to give 152 as a pale yellow paste (62 mg, 78%).</p> <p>R_f (EtOAc/Hept, 3/7) = 0.87</p> <p>¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.27 (s, 9H), 1.44-1.59 (m, 18H), 3.09 (q, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 3.25 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 4.49 (br s, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 26.3, 27.0, 27.6, 28.6, 29.1, 29.3, 29.5, 29.6, 29.7, 30.3, 40.8, 51.7, 85.4, 156.2.</p>	

154	11-azido-<i>N</i>-methylundecan-1-amine
	C ₁₂ H ₂₆ N ₄ 226.36 g/mol FH0087
<p>Compound 152 was alkylated following method B then the crude was directly dissolved in a mixture of TFA and DCM (1/1) for deprotection. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the resulting crude oil was dissolved in EtOAc then washed trice by NaHCO₃ sat then brine. Organic phase was dried over Na₂SO₄ then filtered and concentrated under reduced pressure to afford 154 as a slightly yellow oil (40.7 mg, 90%).</p> <p>¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.25-1.28 (m, 14H), 1.52-1.61 (m, 4H), 2.49 (s, 3H), 2.65 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 3.25 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 22.7, 26.7, 27.1, 28.8, 29.1, 29.4, 29.4, 29.5, 29.7, 35.5, 51.5, 51.5.</p>	

179	<i>N</i>-(11-azidoundecyl)-<i>N</i>-methyl-2-[6-methyl-2-(4-methylphenyl)imidazo[1,2-<i>a</i>]pyridin-3-yl]acetamide
	C ₂₉ H ₄₀ N ₆ O 488.68 g/mol FH0102
<p>179 was prepared following method A then purified over flash chromatography (MeOH 1 to 10% in DCM). 179 was obtained as a pale yellow oil (11.6 mg, 52%). Due to the disubstituted amide, the molecule seems to dedoublet in NMR, giving doublets with large <i>J</i>-coupling instead of singlets.</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.11-1.29 (m, 14H), 1.52 (q, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.76, 2.82 (2s, 3H), 3.00 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 3.19 (q, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 3.28 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 4.01 (s, 1H), 4.04 (s, 1H), 6.98 (dd, <i>J</i> = 1.8, 9.2 Hz, 1H), 7.17 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.43-7.49 (m, 3H), 7.94, 8.03 (2s, 1H).</p> <p>¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 18.7, 21.5, 26.9, 29.1, 29.4, 29.4, 29.7, 30.7, 30.9, 33.8, 35.8, 48.4, 50.4, 51.7, 114.1, 114.2, 116.6, 116.6, 122.1, 122.1, 122.8, 127.9, 128.7, 129.6, 131.7, 137.8, 139.2, 144.1, 168.2.</p>	

180	<i>N</i>-(11-aminoundecyl)-<i>N</i>-methyl-2-(6-methyl-2-(<i>p</i>-tolyl)imidazo[1,2-<i>a</i>]pyridin-3-yl)acetamide
	C ₂₉ H ₄₂ N ₄ O 462.68 g/mol FH0104
<p>179 (8 mg, 16.3 μmol, 1 eq) was added to a solution of PPh₃ (5.1 mg, 19.6 μmol, 1.2 eq) in a mixture of water and THF (0.6 mL, 1/2) and stirred overnight at rt. Reaction mixture was concentrated under reduced pressure then dissolved in HCL 1N solution. The aqueous phase was washed twice with DCM then neutralized with NaHCO₃ sat and extracted twice with DCM. Organic phases were combined, washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford 180 as a white oil (3.9 mg, 51%).</p> <p>t_R = 3.40 min</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.17-1.32 (m, 14H), 1.43-1.47 (m, 2H), 2.05-2.17 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.4 (s, 3H), 2.64-2.72 (m, 2H), 2.83, 2.89 (2s, 3H), 3.05 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 3.34 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 4.07 (s, 1H), 4.11 (s, 1H), 4.7 (s, 2H), 7.04 (dd, <i>J</i> = 1.6, 7.2 Hz, 1H), 7.26 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.51-7.56 (m, 3H), 8.08 (s, 1H).</p>	

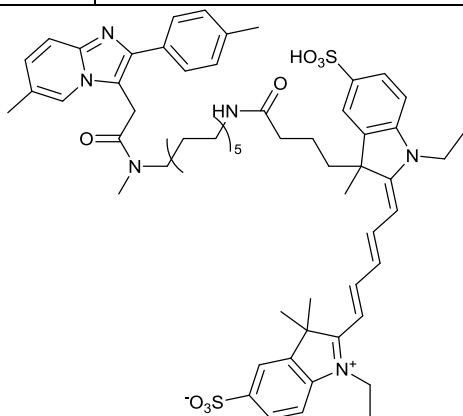
181	2-(6-hydroxy-3-oxo-3<i>H</i>-xanthen-9-yl)-5-(((11-(<i>N</i>-methyl-2-(6-methyl-2-(<i>p</i>-tolyl)imidazo[1,2-<i>a</i>]pyridin-3-yl)acetamido)undecyl)amino)-6-oxohexyl)carbamoyl)benzoic acid
	C ₅₆ H ₆₃ N ₅ O ₈ 934.14 g/mol FH0109

Fluorescein-5-SFX **148** (24 mM solution in DMF, 0.9 μmol , 37.5 μL , 1 eq) was added to a solution of **180** (10.8 mM solution in DMF, 1.08 μmol , 100 μL , 1.2 eq) in DMF (100 μL) with one drop of DIEA. The reaction mixture was stirred 1 h at rt then directly purified over semi-preparative HPLC to give **181** as an orange powder (0.27 mg, 32%). Yield was determined by quantitative analysis.

t_R = 5.66 min

HR-MS calcd: 933.4676, Found [M] : 933.4685

182 Sodium 1-ethyl-2-((1*E*,3*E*)-5-((*E*)-1-ethyl-3-methyl-3-(4-((11-(*N*-methyl-2-(6-methyl-2-(*p*-tolyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)acetamido)undecyl)amino)-4-oxobutyl)-5-sulfoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3*H*-indol-1-ium-5-sulfonate



$\text{C}_{61}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{NaO}_8\text{S}_2$

1110.44 g/mol

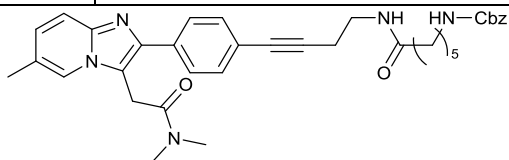
FH0110

DYE-647-NHS **147** (14.5 mM solution, 1.08 μmol , 74.5 μL , 1 eq) was added to a solution of **180** (10.8 mM solution in DMF, 1.08 μmol , 100 μL , 1 eq) in DMF (100 μL) with one drop of DIEA. The reaction mixture was stirred 1 h at rt then directly purified over semi-preparative HPLC to give **182** as a blue powder (0.53 mg, 44%). Yield was determined by quantitative analysis.

t_R = 4.84 min

HR-MS calcd: 1086.5322, Found [M] : 1086.5292

172 benzyl (6-((4-(4-(3-(2-(dimethylamino)-2-oxoethyl)-6-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)phenyl)but-3-yn-1-yl)amino)-6-oxohexyl)carbamate



$\text{C}_{36}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_4$

607.75 g/mol

FH0103

Bromide **171** (50 mg, 0.13 mmol, 1 eq) and $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (7.54 mg, 0.01 mmol, 8 mol%) were weighed and sealed in a 2 mL reaction vessel and degassed three times with argon. Triethylamine (1 mL) and THF (2 mL) were then added and the reaction vessel was degassed trice with argon. CuI (2.0 mg, 0.01 mmol, 8 mol%) and alkyne (51 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq) were then added and the vessel was heated at 80°C overnight. Reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was solubilized in EtOAc and washed twice with NaHCO_3 sat and brine. Organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was purified over reversed-phase flash chromatography (MeOH 0 to 100% in water) to afford **172** as a colorless oil (33 mg, 40%).

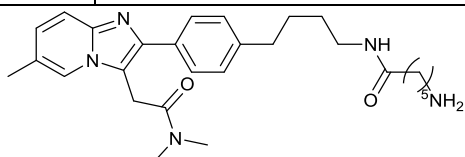
t_R = 3.44 min

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1.26-1.34 (m, 2H), 1.45 (quint, J = 7.3 Hz, 2H), 1.62 (quint, J = 7.8 Hz, 2H),

2.16 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.62 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.94 (s, 3H), 3.11 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.46 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.04 (s, 2H), 5.06 (s, 2H), 5.11 (br s, 1H), 6.12 (br s, 1H), 7.02 (dd, $J = 1.3, 9.3$ Hz, 1H), 7.26-7.33 (m, 5H), 7.45-7.49 (m, 3H), 7.58 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 7.92 (s, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 18.6, 20.7, 25.4, 26.4, 29.9, 30.3, 36.1, 36.7, 37.7, 38.4, 40.9, 66.7, 82.1, 88.2, 114.4, 116.9, 122.2, 122.3, 122.8, 127.9, 128.2, 128.2, 128.5, 1286, 132.1, 134.6, 136.9, 143.3, 144.5, 156.7, 168.3, 173.2.

173 2-(2-(4-(4-((5-aminopentyl)amino)butyl)phenyl)-6-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-*N,N*-dimethylacetamide



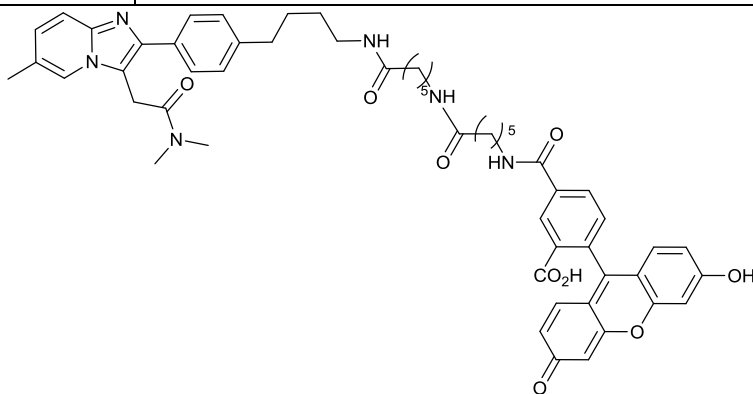
$\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_2$
477.65 g/mol
FH0108

172 (30 mg, 0.05 mmol, 1 eq) was solubilized in MeOH and degassed with argon for 15 minutes. Pd/C (10 mg) was added and the vessel was placed in a pressurized hydrogen system. Flask was washed 3 times with hydrogen then pressure was set to 65 psi and the reaction vessel was mechanically stirred for 24h. Solution was filtered over a celite pad and directly purified on reversed phase flash chromatography (MeOH 0 to 100% in water) to give **173** as a white oil (3 mg, 13%). Product was characterized by LC-MS.

$t_R = 2.51$ min

LC-MS calcd : 477.3, Found [M+H] : 478.2

174 5-((6-((4-(4-(3-(2-(dimethylamino)-2-oxoethyl)-6-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)phenyl)butyl)amino)-6-oxohexyl)amino)-6-oxohexyl)carbonyl)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid

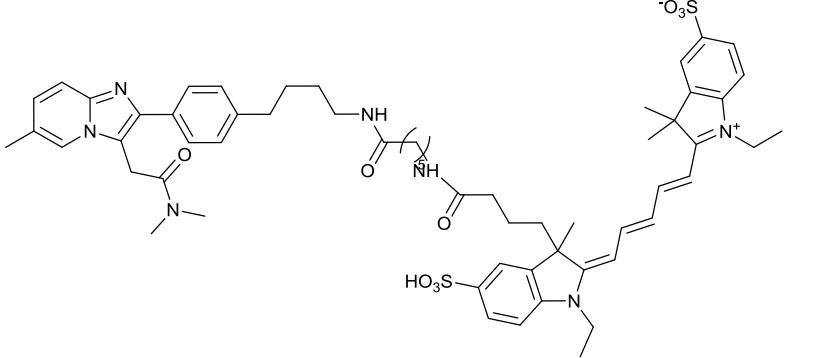


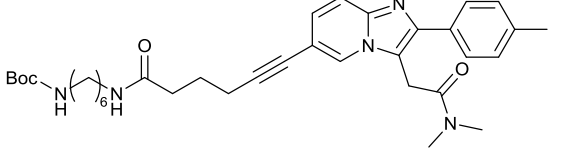
$\text{C}_{55}\text{H}_{60}\text{N}_6\text{O}_9$
949.12 g/mol
FH0111

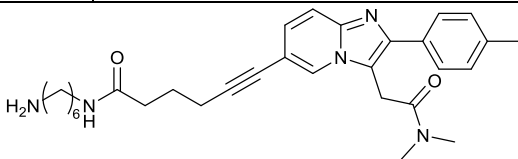
Fluorescein-5-SFX **148** (24 mM solution in DMF, 0.87 μmol , 36.5 μL , 1 eq) was added to a solution of **173** (10.5 mM solution in DMF, 1.05 μmol , 100 μL , 1.2 eq) in DMF (100 μL) with one drop of DIEA. The reaction mixture was stirred 1 h at rt then directly purified over semi-preparative HPLC to give **174** as an orange powder (0.20 mg, 25%). Yield was determined by quantitative analysis.

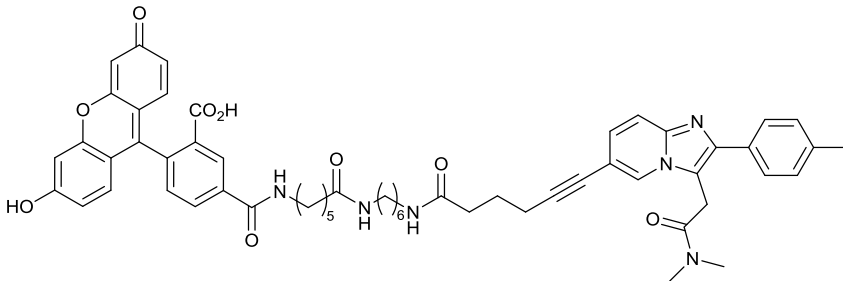
$t_R = 4.29$ min

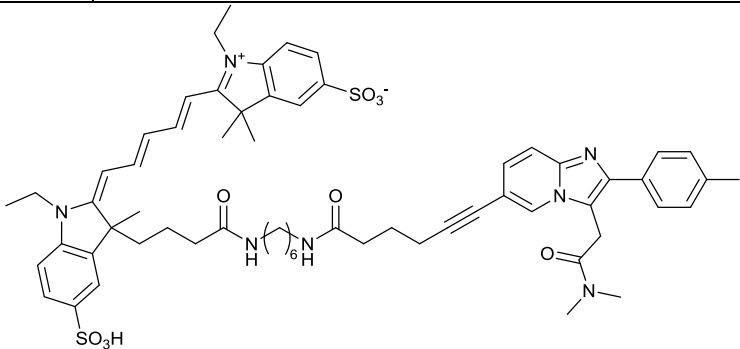
HR-MS calcd: 948.4421, Found [M] : 948.4425

175	2-((1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-5-((<i>E</i>)-3-(4-((6-((4-(4-(3-(2-(dimethylamino)-2-oxoethyl)-6-methylimidazo[1,2- <i>a</i>]pyridin-2-yl)phenyl)butyl)amino)-6-oxohexyl)amino)-4-oxobutyl)-1-ethyl-3-methyl-5-sulfoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3 <i>H</i> -indol-1-ium-5-sulfonate
	$C_{60}H_{75}N_7O_9S_2$ 1102.42 g/mol FH0112
<p>DYE-647-NHS 147 (14.5 mM solution, 0.87 μmol, 60.5 μL, 1 eq) was added to a solution of 173 (10.5 mM solution in DMF, 1.05 μmol, 100 μL, 1.2 eq) in DMF (100 μL) with one drop of DIEA. The reaction mixture was stirred 1 h at rt then directly purified over semi-preparative HPLC to give 175 as a blue powder (0.39 mg, 41%). Yield was determined by quantitative analysis.</p> <p>t_R = 4.43 min HR-MS calcd: 1101.5067, Found [M] : 1101.5055</p>	

162	<i>tert</i> -butyl (6-(6-(3-(2-(dimethylamino)-2-oxoethyl)-2-(<i>p</i> -tolyl)imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridin-6-yl)hex-5-ynamido)hexyl)carbamate
	$C_{35}H_{47}N_5O_4$ 601.79 g/mol FH0265
<p>Bromide 159 (25 mg, 67.1 μmol, 1 eq) and $PdCl_2(PPh_3)_2$ (3.7 mg, 5.3 μmol, 8 mol%) were weighed and sealed in a 2 mL reaction vessel then degassed three times with argon. Triethylamine (0.5 mL) and THF (1 mL) were then added and the reaction vessel was degassed trice with argon. CuI (1.0 mg, 5.3 μmol, 8 mol%) and alkyne 150 (51 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq) were added and the vessel was heated at 80°C overnight. Reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was solubilized in EtOAc and washed twice with $NaHCO_3$ sat and brine. Organic phase was dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was purified over flash chromatography (EtOAc 0 to 80% in heptane) to afford 162 as a brown oil (30.7 mg, 76%).</p> <p>1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 1.42 (m, 9H), 1.82-1.96 (m, 4H), 2.25-2.32 (m, 4H), 2.37 (s, 3H), 2.47 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.95 (s, 3H), 3.07-3.10 (m, 4H), 3.19-3.24 (m, 4H), 4.06 (s, 2H), 5.84 (br s, 1H), 5.99 (br s, 1H), 7.14 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.50-7.52 (m, 3H), 8.28 (s, 1H).</p> <p>^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 18.5, 19.1, 21.5, 24.3, 24.6, 26.3, 26.4, 28.6, 29.6, 29.7, 30.2, 35.3, 35.6, 36.1, 37.8, 39.3, 39.4, 40.4, 66.2, 78.2, 79.2, 90.7, 116.9, 127.5, 127.8, 128.6, 129.6, 156.3, 156.3, 168.2, 172.2, 172.4.</p>	

163	N-(6-aminohexyl)-6-(3-(2-(dimethylamino)-2-oxoethyl)-2-(p-tolyl)imidazo[1,2-a]pyridin-6-yl)hex-5-ynamide
	$C_{30}H_{39}N_5O_2$ 501.67 g/mol FH0276
162 (20 mg, 0.033 mmol, 1 eq) was treated by a solution of TFA and DCM (1/1, 2mL) for 30 min and volatiles were removed under vacuum. The residue was dried under vacuum for 24h to give 163 as an orange oil. (14.9 mg, 89%) $t_R = 3.33$ min HR-MS calcd: 501.3104, Found [M+H] : 502.3154	

164	5-(((6-((6-(3-(2-(dimethylamino)-2-oxoethyl)-2-(p-tolyl)imidazo[1,2-a]pyridin-6-yl)hex-5-ynamido)hexyl)amino)-6-oxohexyl)carbonyl)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid
	$C_{57}H_{60}N_6O_9$ 973.14 g/mol FH0281
Fluorescein-5-SFX 148 (24 mM solution in DMF, 0.87 μ mol, 36.5 μ L, 1 eq) was added to a solution of 163 (10.5 mM solution in DMF, 1.00 μ mol, 100 μ L, 1.2 eq) in DMF (100 μ L) with one drop of DIEA. The reaction mixture was stirred 1 h at rt then directly purified over semi-preparative HPLC to give 164 as an orange powder (0.4 mg, 50%). Yield was determined by quantitative analysis. $t_R = 4.77$ min HR-MS calcd: 972.4422, Found [M+H] : 973.4441	

165	2-((1E,3E)-5-((E)-3-(4-(((6-(3-(2-(dimethylamino)-2-oxoethyl)-2-(p-tolyl)imidazo[1,2-a]pyridin-6-yl)hex-5-ynamido)hexyl)amino)-4-oxobutyl)-1-ethyl-3-methyl-5-sulfoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate
	$C_{67}H_{75}N_7O_9S_2$ 1126.44 g/mol FH0288
DYE-647-NHS 147 (14.3 mM solution, 0.83 μ mol, 58.1 μ L, 1 eq) was added to a solution of 163 (10.5 mM solution in DMF, 1.00 μ mol, 100 μ L, 1.2 eq) in DMF (100 μ L) with one drop of DIEA. The reaction	

mixture was stirred 1 h at rt then directly purified over semi-preparative HPLC to give **165** as a blue powder (0.024 mg, 3%). Yield was determined by quantitative analysis.

t_R = 4.77 min

HR-MS calcd: 1125.5068, **Found [M]:** 1125.5086

Bibliographie

- (1) Braestrup, C.; Squires, R. F. Specific Benzodiazepine Receptors in Rat Brain Characterized by High-Affinity (3H)diazepam Binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74* (9), 3805–3809.
- (2) Papadopoulos, V.; Baraldi, M.; Guilarte, T. R.; Knudsen, T. B.; Lacapère, J.-J.; Lindemann, P.; Norenberg, M. D.; Nutt, D.; Weizman, A.; Zhang, M.-R.; Gavish, M. Translocator Protein (18 kDa): New Nomenclature for the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Based on Its Structure and Molecular Function. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27* (8), 402–409.
- (3) Taniguchi, T.; Wang, J. K. T.; Spector, S. [3H]Diazepam Binding Sites on Rat Heart and Kidney. *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31* (4), 589–590.
- (4) Taniguchi, T.; Wang, J. K. T.; Spector, S. Properties of [3H] Diazepam Binding to Rat Peritoneal Mast Cells. *Life Sci.* **1980**, *27* (2), 171–178.
- (5) Wang, J. K. T.; Taniguchi, T.; Spector, S. Properties of [3H]diazepam Binding Sites on Rat Blood Platelets. *Life Sci.* **1980**, *27* (20), 1881–1888.
- (6) Schoemaker, H.; Bliss, M.; Yamamura, H. I. Specific High-Affinity Saturable Binding of [3H] Ro5-4864 To Benzodiazepine Binding Sites in the Rat Cerebral Cortex. *Eur. J. Pharmacol.* **1981**, *71* (1), 173–175.
- (7) Syapin, P. J.; Skolnick, P. Characterization of Benzodiazepine Binding Sites in Cultured Cells of Neural Origin. *J. Neurochem.* **1979**, *32* (3), 1047–1051.
- (8) Woods, M. J.; Williams, D. C. Multiple Forms and Locations for the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52* (12), 1805–1814.
- (9) Marangos, P. J.; Patel, J.; Boulenger, J. P.; Clark-Rosenberg, R. Characterization of Peripheral-Type Benzodiazepine Binding Sites in Brain Using [3H]Ro 5-4864. *Mol. Pharmacol.* **1982**, *22* (1), 26–32.
- (10) Le Fur, G.; Perrier, M. L.; Vaucher, N.; Imbault, F.; Flamier, A.; Benavides, J.; Uzan, A.; Renault, C.; Dubroeuq, M. C.; Guérémy, C. Peripheral Benzodiazepine Binding Sites: Effect of PK 11195, 1-(2-Chlorophenyl)-N-Methyl-N-(1-Methylpropyl)-3-Isoquinolinecarboxamide: I. In Vitro Studies. *Life Sci.* **1983**, *32* (16), 1839–1847.
- (11) Le Fur, G.; Guilloux, F.; Rufat, P.; Benavides, J.; Uzan, A.; Renault, C.; Dubroeuq, M. C.; Guérémy, C. Peripheral Benzodiazepine Binding Sites: Effect of PK 11195, 1-(2-Chlorophenyl)-N-Methyl-(1-Methylpropyl)-3 Isoquinolinecarboxamide: II. In Vivo Studies. *Life Sci.* **1983**, *32* (16), 1849–1856.
- (12) Benavides, J.; Quarteronet, D.; Imbault, F.; Malgouris, C.; Uzan, A.; Renault, C.; Dubroeuq, M. C.; Gueremy, C.; Le Fur, G. Labelling of “Peripheral-Type” Benzodiazepine Binding Sites in the Rat Brain by Using [3H]PK 11195, an Isoquinoline Carboxamide Derivative: Kinetic Studies and Autoradiographic Localization. *J. Neurochem.* **1983**, *41* (6), 1744–1750.
- (13) Benavides, J.; Guilloux, F.; Rufat, P.; Uzan, A.; Renault, C.; Dubroeuq, M.-C.; Gueremy, C.; Le Fur, G. In Vivo Labelling in Several Rat Tissues of “peripheral Type” Benzodiazepine Binding Sites. *Eur. J. Pharmacol.* **1984**, *99* (1), 1–7.
- (14) Anholt, R. R.; Murphy, K. M.; Mack, G. E.; Snyder, S. H. Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors in the Central Nervous System: Localization to Olfactory Nerves. *J. Neurosci.* **1984**, *4* (2), 593–603.
- (15) Gavish, M.; Bachman, I.; Shoukrun, R.; Katz, Y.; Veenman, L.; Weisinger, G.; Weizman, A. Enigma of the Peripheral Benzodiazepine Receptor. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51* (4), 629–650.
- (16) Grandison, L. Actions of Benzodiazepines on the Neuroendocrine System. *Neuropharmacology* **1983**, *22* (12B), 1505–1510.

- (17) Marc, V.; Morselli, P. L. Effect of Diazepam on Plasma Corticosterone Levels in the Rat. *J. Pharm. Pharmacol.* **1969**, *21* (11), 784–786.
- (18) Cook, P. S.; Notelovitz, M.; Kalra, P. S.; Kalra, S. P. Effect of Diazepam on Serum Testosterone and the Ventral Prostate Gland in Male Rats. *Arch. Androl.* **1979**, *3* (1), 31–35.
- (19) Argüelles, A. E.; Rosner, J. DIAZEPAM AND PLASMA-TESTOSTERONE LEVELS. *The Lancet* **1975**, *306* (7935), 607.
- (20) Lacapère, J.-J.; Papadopoulos, V. Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor: Structure and Function of a Cholesterol-Binding Protein in Steroid and Bile Acid Biosynthesis. *Steroids* **2003**, *68* (7–8), 569–585.
- (21) Kinnally, K. W.; Zorov, D. B.; Antonenko, Y. N.; Snyder, S. H.; McEnery, M. W.; Tedeschi, H. Mitochondrial Benzodiazepine Receptor Linked to Inner Membrane Ion Channels by Nanomolar Actions of Ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90* (4), 1374–1378.
- (22) Venturini, I.; Zeneroli, M. L.; Corsi, L.; Avallone, R.; Farina, F.; Alho, H.; Baraldi, C.; Ferrarese, C.; Pecora, N.; Frigo, M.; Ardizzone, G.; Arrigo, A.; Pellicci, R.; Baraldi, M. Up-Regulation of Peripheral Benzodiazepine Receptor System in Hepatocellular Carcinoma. *Life Sci.* **1998**, *63* (14), 1269–1280.
- (23) Hardwick, M.; Fertikh, D.; Culty, M.; Li, H.; Vidic, B.; Papadopoulos, V. Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor (PBR) in Human Breast Cancer Correlation of Breast Cancer Cell Aggressive Phenotype with PBR Expression, Nuclear Localization, and PBR-Mediated Cell Proliferation and Nuclear Transport of Cholesterol. *Cancer Res.* **1999**, *59* (4), 831–842.
- (24) Olson, J. M. M.; Ciliax, B. J.; Mancini, W. R.; Young, A. B. Presence of Peripheral-Type Benzodiazepine Binding Sites on Human Erythrocyte Membranes. *Eur. J. Pharmacol.* **1988**, *152* (1–2), 47–53.
- (25) Oke, B. O.; Suarez-Quian, C. A.; Riond, J.; Ferrara, P.; Papadopoulos, V. Cell Surface Localization of the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor (PBR) in Adrenal Cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1992**, *87* (1–3), R1–R6.
- (26) Liu, J.; Rone, M. B.; Papadopoulos, V. Protein-Protein Interactions Mediate Mitochondrial Cholesterol Transport and Steroid Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2006**.
- (27) Sprengel, R.; Werner, P.; Seeburg, P. H.; Mukhin, A. G.; Santi, M. R.; Grayson, D. R.; Guidotti, A.; Krueger, K. E. Molecular Cloning and Expression of cDNA Encoding a Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (34), 20415–20421.
- (28) Doble, A.; Ferris, O.; Burgevin, M. C.; Menager, J.; Uzan, A.; Dubroeuq, M. C.; Renault, C.; Gueremy, C.; Fur, G. L. Photoaffinity Labeling of Peripheral-Type Benzodiazepine-Binding Sites. *Mol. Pharmacol.* **1987**, *31* (1), 42–49.
- (29) Joseph-Liauzun, E.; Delmas, P.; Shire, D.; Ferrara, P. Topological Analysis of the Peripheral Benzodiazepine Receptor in Yeast Mitochondrial Membranes Supports a Five-Transmembrane Structure. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (4), 2146–2152.
- (30) Garnier, M.; Dimchev, A. B.; Boujrad, N.; Price, J. M.; Musto, N. A.; Papadopoulos, V. In Vitro Reconstitution of a Functional Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor from Mouse Leydig Tumor Cells. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45* (2), 201–211.
- (31) Lacapère, J.-J.; Delavoie, F.; Li, H.; Péranzi, G.; Maccario, J.; Papadopoulos, V.; Vidic, B. Structural and Functional Study of Reconstituted Peripheral Benzodiazepine Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *284* (2), 536–541.

- (32) Jaremko, Ł.; Jaremko, M.; Giller, K.; Becker, S.; Zweckstetter, M. Structure of the Mitochondrial Translocator Protein in Complex with a Diagnostic Ligand. *Science* **2014**, *343* (6177), 1363–1366.
- (33) Murail, S.; Robert, J.-C.; Coïc, Y.-M.; Neumann, J.-M.; Ostuni, M. A.; Yao, Z.-X.; Papadopoulos, V.; Jamin, N.; Lacapère, J.-J. Secondary and Tertiary Structures of the Transmembrane Domains of the Translocator Protein TSPO Determined by NMR. Stabilization of the TSPO Tertiary Fold upon Ligand Binding. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2008**, *1778* (6), 1375–1381.
- (34) Korkhov, V. M.; Sachse, C.; Short, J. M.; Tate, C. G. Three-Dimensional Structure of TspO by Electron Cryomicroscopy of Helical Crystals. *Struct. England* **2010**, *18* (6), 677–687.
- (35) Li, H.; Papadopoulos, V. Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Function in Cholesterol Transport. Identification of a Putative Cholesterol Recognition/interaction Amino Acid Sequence and Consensus Pattern. *Endocrinology* **1998**, *139* (12), 4991–4997.
- (36) Jamin, N.; Neumann, J.-M.; Ostuni, M. A.; Vu, T. K. N.; Yao, Z.-X.; Murail, S.; Robert, J.-C.; Giatzakis, C.; Papadopoulos, V.; Lacapère, J.-J. Characterization of the Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus Sequence of the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **2005**, *19* (3), 588–594.
- (37) Krueger, K. E. Molecular and Functional Properties of Mitochondrial Benzodiazepine Receptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* **1995**, *1241* (3), 453–470.
- (38) Papadopoulos, V.; Miller, W. L. Role of Mitochondria in Steroidogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *26* (6), 771–790.
- (39) Arakane, F.; King, S. R.; Du, Y.; Kallen, C. B.; Walsh, L. P.; Watari, H.; Stocco, D. M.; Strauss, J. F. Phosphorylation of Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) Modulates Its Steroidogenic Activity. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (51), 32656–32662.
- (40) Verrier, F.; Mignotte, B.; Jan, G.; Brenner, C. Study of PTPC Composition during Apoptosis for Identification of Viral Protein Target. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *1010* (1), 126–142.
- (41) Veenman, L.; Shandalov, Y.; Gavish, M. VDAC Activation by the 18 kDa Translocator Protein (TSPO), Implications for Apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2008**, *40* (3), 199–205.
- (42) Šileikytė, J.; Petronilli, V.; Zulian, A.; Dabbeni-Sala, F.; Tognon, G.; Nikolov, P.; Bernardi, P.; Ricchelli, F. Regulation of the Inner Membrane Mitochondrial Permeability Transition by the Outer Membrane Translocator Protein (Peripheral Benzodiazepine Receptor). *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (2), 1046–1053.
- (43) Šileikytė, J.; Blachly-Dyson, E.; Sewell, R.; Carpi, A.; Menabò, R.; Lisa, F. D.; Ricchelli, F.; Bernardi, P.; Forte, M. Regulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by the Outer Membrane Does Not Involve the Peripheral Benzodiazepine Receptor (Translocator Protein of 18 kDa (TSPO)). *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (20), 13769–13781.
- (44) « Steroidogenesis » Par David Richfield (User:Slashme) and Mikael Häggström Derived from Previous Version by Hoffmeier and Settersr. — Self-Made Using Bkchem and Inkscape. Sous Licence Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 via Wikimedia Commons - <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Steroidogenesis.svg#mediaviewer/Fichier:Steroidogenesis.svg>.
- (45) Morrow, A. L. Recent Developments in the Significance and Therapeutic Relevance of Neuroactive Steroids — Introduction to the Special Issue. *Pharmacol. Ther.* **2007**, *116* (1), 1–6.
- (46) Zheng, P. Neuroactive Steroid Regulation of Neurotransmitter Release in the CNS: Action, Mechanism and Possible Significance. *Prog. Neurobiol.* **2009**, *89* (2), 134–152.

- (47) Brinton, R. D. Neurosteroids as Regenerative Agents in the Brain: Therapeutic Implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2013**, *9* (4), 241–250.
- (48) Naylor, J. C.; Kilts, J. D.; Hulette, C. M.; Steffens, D. C.; Blazer, D. G.; Ervin, J. F.; Strauss, J. L.; Allen, T. B.; Massing, M. W.; Payne, V. M.; Youssef, N. A.; Shampine, L. J.; Marx, C. E. Allopregnanolone Levels Are Reduced in Temporal Cortex in Patients with Alzheimer's Disease Compared to Cognitively Intact Control Subjects. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2010**, *1801* (8), 951–959.
- (49) Schumacher, M.; Hussain, R.; Gago, N.; Oudinet, J.-P.; Mattern, C.; Ghomari, A. M. Progesterone Synthesis in the Nervous System: Implications for Myelination and Myelin Repair. *Front. Neurosci.* **2012**, *6*.
- (50) Wang, J. M.; Johnston, P. B.; Ball, B. G.; Brinton, R. D. The Neurosteroid Allopregnanolone Promotes Proliferation of Rodent and Human Neural Progenitor Cells and Regulates Cell-Cycle Gene and Protein Expression. *J. Neurosci.* **2005**, *25* (19), 4706–4718.
- (51) Sun, C.; Ou, X.; Farley, J. M.; Stockmeier, C.; Bigler, S.; Brinton, R. D.; Wang, J. M. Allopregnanolone Increases the Number of Dopaminergic Neurons in Substantia Nigra of a Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, *9* (4), 473–480.
- (52) Irwin, R. W.; Wang, J. M.; Chen, S.; Brinton, R. D. Neuroregenerative Mechanisms of Allopregnanolone in Alzheimer's Disease. *Neuroendocr. Sci.* **2012**, *2*, 117.
- (53) Rupprecht, R.; Papadopoulos, V.; Rammes, G.; Baghai, T. C.; Fan, J.; Akula, N.; Groyer, G.; Adams, D.; Schumacher, M. Translocator Protein (18 kDa) (TSPO) as a Therapeutic Target for Neurological and Psychiatric Disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (12), 971–988.
- (54) Garnier, M.; Boujrad, N.; Ogwuegbu, S. O.; Hudson, J. R.; Papadopoulos, V. The Polypeptide Diazepam-Binding Inhibitor and a Higher Affinity Mitochondrial Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Sustain Constitutive Steroidogenesis in the R2C Leydig Tumor Cell Line. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (35), 22105–22112.
- (55) Kelly-HersHKovitz, E.; Weizman, R.; Spanier, I.; Leschiner, S.; Lahav, M.; Weisinger, G.; Gavish, M. Effects of Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Antisense Knockout on MA-10 Leydig Cell Proliferation and Steroidogenesis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (10), 5478–5483.
- (56) Levin, E.; Premkumar, A.; Veenman, L.; Kugler, W.; Leschiner, S.; Spanier, I.; Weisinger, G.; Lakomek, M.; Weizman, A.; Snyder, S. H.; Pasternak, G. W.; Gavish, M. The Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor and Tumorigenicity: Isoquinoline Binding Protein (IBP) Antisense Knockdown in the C6 Glioma Cell Line†. *Biochemistry (Mosc.)* **2005**, *44* (29), 9924–9935.
- (57) Hauet, T.; Yao, Z.-X.; Bose, H. S.; Wall, C. T.; Han, Z.; Li, W.; Hales, D. B.; Miller, W. L.; Culty, M.; Papadopoulos, V. Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor-Mediated Action of Steroidogenic Acute Regulatory Protein on Cholesterol Entry into Leydig Cell Mitochondria. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **2005**, *19* (2), 540–554.
- (58) Zeno, S.; Zaaroor, M.; Leschiner, S.; Veenman, L.; Gavish, M. CoCl₂ Induces Apoptosis via the 18 kDa Translocator Protein in U118MG Human Glioblastoma Cells. *Biochemistry (Mosc.)* **2009**, *48* (21), 4652–4661.
- (59) Li, W.; Hardwick, M. J.; Rosenthal, D.; Culty, M.; Papadopoulos, V. Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Overexpression and Knockdown in Human Breast Cancer Cells Indicate Its Prominent Role in Tumor Cell Proliferation. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73* (4), 491–503.
- (60) Kletsas, D.; Li, W.; Han, Z.; Papadopoulos, V. Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor (PBR) and PBR Drug Ligands in Fibroblast and Fibrosarcoma Cell Proliferation: Role of ERK, c-Jun and Ligand-Activated PBR-Independent Pathways. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67* (10), 1927–1932.

- (61) Papadopoulos, V.; Amri, H.; Boujrad, N.; Cascio, C.; Culty, M.; Garnier, M.; Hardwick, M.; Li, H.; Vidic, B.; Brown, A. S.; Reversa, J. L.; Bernassau, J. M.; Drieu, K. Peripheral Benzodiazepine Receptor in Cholesterol Transport and Steroidogenesis. *Steroids* **1997**, *62* (1), 21–28.
- (62) Morohaku, K.; Pelton, S. H.; Daugherty, D. J.; Butler, W. R.; Deng, W.; Selvaraj, V. Translocator Protein/Peripheral Benzodiazepine Receptor Is Not Required for Steroid Hormone Biosynthesis. *Endocrinology* **2014**, *155* (1), 89–97.
- (63) Stocco, D. M. The Role of PBR/TSPO in Steroid Biosynthesis Challenged. *Endocrinology* **2014**, *155* (1), 6–9.
- (64) Tu, L. N.; Morohaku, K.; Manna, P. R.; Pelton, S. H.; Butler, W. R.; Stocco, D. M.; Selvaraj, V. Peripheral Benzodiazepine Receptor/Translocator Protein Global Knockout Mice Are Viable with No Effects on Steroid Hormone Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2014**, jbc.M114.578286.
- (65) Verma, A.; Nye, J. S.; Snyder, S. H. Porphyrins Are Endogenous Ligands for the Mitochondrial (peripheral-Type) Benzodiazepine Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84* (8), 2256–2260.
- (66) Mocchetti, I.; Santi, M. R. Diazepam Binding Inhibitor Peptide: Cloning and Gene Expression. *Neuropharmacology* **1991**, *30* (12, Part 2), 1365–1371.
- (67) Papadopoulos, V.; Berkovich, A.; Krueger, K. E.; Costa, E.; Guidotti, A. Diazepam Binding Inhibitor and Its Processing Products Stimulate Mitochondrial Steroid Biosynthesis via an Interaction with Mitochondrial Benzodiazepine Receptors. *Endocrinology* **1991**, *129* (3), 1481–1488.
- (68) Lacor, P.; Gandolfo, P.; Tonon, M.-C.; Brault, E.; Dalibert, I.; Schumacher, M.; Benavides, J.; Ferzaz, B. Regulation of the Expression of Peripheral Benzodiazepine Receptors and Their Endogenous Ligands during Rat Sciatic Nerve Degeneration and Regeneration: A Role for PBR in Neurosteroidogenesis. *Brain Res.* **1999**, *815* (1), 70–80.
- (69) Tokay, T.; Hachem, R.; Masmoudi-Kouki, O.; Gandolfo, P.; Desrues, L.; Leprince, J.; Castel, H.; Diallo, M.; Amri, M.; Vaudry, H.; Tonon, M.-C. Beta-Amyloid Peptide Stimulates Endozepine Release in Cultured Rat Astrocytes through Activation of N-Formyl Peptide Receptors. *Glia* **2008**, *56* (13), 1380–1389.
- (70) Ferrarese, C.; Appollonio, I.; Frigo, M.; Meregalli, S.; Piolti, R.; Tamma, F.; Frattola, L. Cerebrospinal Fluid Levels of Diazepam-binding Inhibitor in Neurodegenerative Disorders with Dementia. *Neurology* **1990**, *40* (4), 632–632.
- (71) Chen, M.-K.; Guilarte, T. R. Translocator Protein 18 kDa (TSPO): Molecular Sensor of Brain Injury and Repair. *Pharmacol. Ther.* **2008**, *118* (1), 1–17.
- (72) Cosenza-Nashat, M.; Zhao, M.-L.; Suh, H.-S.; Morgan, J.; Natividad, R.; Morgello, S.; Lee, S. C. Expression of the Translocator Protein of 18 kDa by Microglia, Macrophages and Astrocytes Based on Immunohistochemical Localization in Abnormal Human Brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2009**, *35* (3), 306–328.
- (73) Karchewski, L. A.; Bloechlinger, S.; Woolf, C. J. Axonal Injury-Dependent Induction of the Peripheral Benzodiazepine Receptor in Small-Diameter Adult Rat Primary Sensory Neurons. *Eur. J. Neurosci.* **2004**, *20* (3), 671–683.
- (74) Mills, C. D.; Bitler, J. L.; Woolf, C. J. Role of the Peripheral Benzodiazepine Receptor in Sensory Neuron Regeneration. *Mol. Cell. Neurosci.* **2005**, *30* (2), 228–237.
- (75) Costigan, M.; Befort, K.; Karchewski, L.; Griffin, R. S.; Urso, D. D'; Allchorne, A.; Sitariski, J.; Mannion, J. W.; Pratt, R. E.; Woolf, C. J. Replicate High-Density Rat Genome Oligonucleotide Microarrays Reveal Hundreds of Regulated Genes in the Dorsal Root Ganglion after Peripheral Nerve Injury. *BMC Neurosci.* **2002**, *3* (1), 16.

- (76) Wang, H.; Sun, H.; Penna, K. Della; Benz, R. J.; Xu, J.; Gerhold, D. L.; Holder, D. J.; Koblan, K. S. Chronic Neuropathic Pain Is Accompanied by Global Changes in Gene Expression and Shares Pathobiology with Neurodegenerative Diseases. *Neuroscience* **2002**, *114* (3), 529–546.
- (77) Xiao, H.-S.; Huang, Q.-H.; Zhang, F.-X.; Bao, L.; Lu, Y.-J.; Guo, C.; Yang, L.; Huang, W.-J.; Fu, G.; Xu, S.-H.; Cheng, X.-P.; Yan, Q.; Zhu, Z.-D.; Zhang, X.; Chen, Z.; Han, Z.-G.; Zhang, X. Identification of Gene Expression Profile of Dorsal Root Ganglion in the Rat Peripheral Axotomy Model of Neuropathic Pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (12), 8360–8365.
- (78) Chen, M.-K.; Baidoo, K.; Verina, T.; Guilarte, T. R. Peripheral Benzodiazepine Receptor Imaging in CNS Demyelination: Functional Implications of Anatomical and Cellular Localization. *Brain* **2004**, *127* (6), 1379–1392.
- (79) Gerhard, A.; Schwarz, J.; Myers, R.; Wise, R.; Banati, R. B. Evolution of Microglial Activation in Patients after Ischemic Stroke: A [¹¹C](R)-PK11195 PET Study. *NeuroImage* **2005**, *24* (2), 591–595.
- (80) Moustafa, R. R.; Baron, J.-C. Pathophysiology of Ischaemic Stroke: Insights from Imaging, and Implications for Therapy and Drug Discovery. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153* (Suppl 1), S44–S54.
- (81) Papadopoulos, V.; Lecanu, L. Translocator Protein (18 kDa) TSPO: An Emerging Therapeutic Target in Neurotrauma. *Exp. Neurol.* **2009**, *219* (1), 53–57.
- (82) Ji, B.; Maeda, J.; Sawada, M.; Ono, M.; Okauchi, T.; Inaji, M.; Zhang, M.-R.; Suzuki, K.; Ando, K.; Staufenbiel, M.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y.; Higuchi, M.; Suhara, T. Imaging of Peripheral Benzodiazepine Receptor Expression as Biomarkers of Detrimental versus Beneficial Glial Responses in Mouse Models of Alzheimer's and Other CNS Pathologies. *J. Neurosci.* **2008**, *28* (47), 12255–12267.
- (83) Agnello, D.; Carvelli, L.; Muzio, V.; Villa, P.; Bottazzi, B.; Polentarutti, N.; Mennini, T.; Mantovani, A.; Ghezzi, P. Increased Peripheral Benzodiazepine Binding Sites and Pentraxin 3 Expression in the Spinal Cord during EAE: Relation to Inflammatory Cytokines and Modulation by Dexamethasone and Rolipram. *J. Neuroimmunol.* **2000**, *109* (2), 105–111.
- (84) Castellano, S.; Taliani, S.; Viviano, M.; Milite, C.; Da Pozzo, E.; Costa, B.; Barresi, E.; Bruno, A.; Cosconati, S.; Marinelli, L.; Greco, G.; Novellino, E.; Sbardella, G.; Da Settimo, F.; Martini, C. Structure–Activity Relationship Refinement and Further Assessment of 4-Phenylquinazoline-2-Carboxamide Translocator Protein Ligands as Antiproliferative Agents in Human Glioblastoma Tumors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (6), 2413–2428.
- (85) Austin, C. J. D.; Kahlert, J.; Kassiou, M.; Rendina, L. M. The Translocator Protein (TSPO): A Novel Target for Cancer Chemotherapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45* (7), 1212–1216.
- (86) Tang, D.; McKinley, E. T.; Hight, M. R.; Uddin, M. I.; Harp, J. M.; Fu, A.; Nickels, M. L.; Buck, J. R.; Manning, H. C. Synthesis and Structure–Activity Relationships of 5,6,7-Substituted Pyrazolopyrimidines: Discovery of a Novel TSPO PET Ligand for Cancer Imaging. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (8), 3429–3433.
- (87) Wu, X.; Gallo, K. A. The 18-kDa Translocator Protein (TSPO) Disrupts Mammary Epithelial Morphogenesis and Promotes Breast Cancer Cell Migration. *PLoS ONE* **2013**, *8* (8), e71258.
- (88) O'Brien, E. R.; Kersemans, V.; Tredwell, M.; Checa, B.; Serres, S.; Soto, M. S.; Gouverneur, V.; Leppert, D.; Anthony, D. C.; Sibson, N. R. Glial Activation in the Early Stages of Brain Metastasis: TSPO as a Diagnostic Biomarker. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (2), 275–280.
- (89) Nudmamud, S.; Siripurkpong, P.; Chindaduangratana, C.; Harnyuttanakorn, P.; Lotrakul, P.; Laarbboonsarp, W.; Srikiatkachorn, A.; Kotchabhakdi, N.; Casalotti, S. O. Stress, Anxiety and Peripheral Benzodiazepine Receptor mRNA Levels in Human Lymphocytes. *Life Sci.* **2000**, *67* (18), 2221–2231.

- (90) Rocca, P.; Beoni, A. M.; Eva, C.; Ferrero, P.; Zanalda, E.; Ravizza, L. Peripheral Benzodiazepine Receptor Messenger RNA Is Decreased in Lymphocytes of Generalized Anxiety Disorder Patients. *Biol. Psychiatry* **1998**, *43* (10), 767–773.
- (91) Chelli, B.; Pini, S.; Abelli, M.; Cardini, A.; Lari, L.; Muti, M.; Gesi, C.; Cassano, G. B.; Lucacchini, A.; Martini, C. Platelet 18 kDa Translocator Protein Density Is Reduced in Depressed Patients with Adult Separation Anxiety. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2008**, *18* (4), 249–254.
- (92) Pini, S.; Martini, C.; Abelli, M.; Muti, M.; Gesi, C.; Montali, M.; Chelli, B.; Lucacchini, A.; Cassano, G. B. Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Binding Sites in Platelets of Patients with Panic Disorder Associated to Separation Anxiety Symptoms. *Psychopharmacology (Berl.)* **2005**, *181* (2), 407–411.
- (93) Gavish, M.; Laor, N.; Bidder, M.; Fisher, D.; Fonia, O.; Muller, U.; Reiss, A.; Wolmer, L.; Karp, L.; Weizman, R. Altered Platelet Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor in Posttraumatic Stress Disorder. *Neuropsychopharmacology* **1996**, *14* (3), 181–186.
- (94) Abelli, M.; Chelli, B.; Costa, B.; Lari, L.; Cardini, A.; Gesi, C.; Muti, M.; Lucacchini, A.; Martini, C.; Cassano, G. B.; Pini, S. Reductions in Platelet 18-kDa Translocator Protein Density Are Associated with Adult Separation Anxiety in Patients with Bipolar Disorder. *Neuropsychobiology* **2010**, *62* (2), 98–103.
- (95) Johnson, M. R.; Marazziti, D.; Brawman-Mintzer, O.; Emmanuel, N. P.; Ware, M. R.; Morton, W. A.; Rossi, A.; Cassano, G. B.; Lydiard, R. B. Abnormal Peripheral Benzodiazepine Receptor Density Associated with Generalized Social Phobia. *Biol. Psychiatry* **1998**, *43* (4), 306–309.
- (96) Ritsner, M.; Modai, I.; Gibel, A.; Leschiner, S.; Silver, H.; Tsinovoy, G.; Weizman, A.; Gavish, M. Decreased Platelet Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors in Persistently Violent Schizophrenia Patients. *J. Psychiatr. Res.* **2003**, *37* (6), 549–556.
- (97) Weizman, A.; Burgin, R.; Harel, Y.; Karp, L.; Gavish, M. Platelet Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor in Major Depression. *J. Affect. Disord.* **1995**, *33* (4), 257–261.
- (98) James, M.; Selleri, S.; Kassiou, M. Development of Ligands for the Peripheral Benzodiazepine Receptor. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13* (17), 1991–2001.
- (99) Rao, V. L. R.; Butterworth, R. F. Characterization of Binding Sites for the ω 3 Receptor Ligands [3H]PK11195 and [3H]RO5-4864 in Human Brain. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *340* (1), 89–99.
- (100) Selleri, S.; Bruni, F.; Costagli, C.; Costanzo, A.; Guerrini, G.; Ciciani, G.; Costa, B.; Martini, C. 2-Arylpyrazolo[1,5-A]pyrimidin-3-yl Acetamides. New Potent and Selective Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9* (10), 2661–2671.
- (101) Versijpt, J. J.; Dumont, F.; Van Laere, K. J.; Decoo, D.; Santens, P.; Audenaert, K.; Achten, E.; Slegers, G.; Dierckx, R. A.; Korf, J. Assessment of Neuroinflammation and Microglial Activation in Alzheimer's Disease with Radiolabelled PK11195 and Single Photon Emission Computed Tomography. *Eur. Neurol.* **2003**, *50* (1), 39–47.
- (102) Fiorini, I.; Nacci, V.; Ciani, S. M.; Garofalo, A.; Campiani, G.; Savini, L.; Novellino, E.; Greco, G.; Bernasconi, P.; Mennini, T. Novel Ligands Specific for Mitochondrial Benzodiazepine Receptors: 6-arylpyrrolo[2,1-d][1,5]benzothiazepine Derivatives. Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Molecular Modeling Studies. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (10), 1427–1438.
- (103) Campiani, G.; Nacci, V.; Fiorini, I.; De Filippis, M.; Garofalo, A.; Ciani, S.; Greco, G.; Novellino, E.; Manzoni, C.; Mennini, T. New Pyrrolobenzothiazepine Derivatives as Molecular Probes of the “peripheral-Type” Benzodiazepine Receptor (PBR) Binding Site. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, *32* (3), 241–251.
- (104) Campiani, G.; Nacci, V.; Fiorini, I.; De Filippis, M. P.; Garofalo, A.; Ciani, S. M.; Greco, G.; Novellino, E.; Williams, D. C.; Zisterer, D. M.; Woods, M. J.; Mihai, C.; Manzoni, C.; Mennini, T. Synthesis, Biological

- Activity, and SARs of Pyrrolobenzoxazepine Derivatives, a New Class of Specific "Peripheral-Type" Benzodiazepine Receptor Ligands. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (18), 3435–3450.
- (105) Chaki, S.; Funakoshi, T.; Yoshikawa, R.; Okuyama, S.; Okubo, T.; Nakazato, A.; Nagamine, M.; Tomisawa, K. Binding Characteristics of [3H]DAA1106, a Novel and Selective Ligand for Peripheral Benzodiazepine Receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *371* (2–3), 197–204.
- (106) Okuyama, S.; Chaki, S.; Yoshikawa, R.; Ogawa, S.; Suzuki, Y.; Okubo, T.; Nakazato, A.; Nagamine, M.; Tomisawa, K. Neuropharmacological Profile of Peripheral Benzodiazepine Receptor Agonists, DAA1097 and DAA1106. *Life Sci.* **1999**, *64* (16), 1455–1464.
- (107) Culty, M.; Silver, P.; Nakazato, A.; Gazouli, M.; Li, H.; Muramatsu, M.; Okuyama, S.; Papadopoulos, V. Peripheral Benzodiazepine Receptor Binding Properties and Effects on Steroid Synthesis of Two New Phenoxyphenyl-Acetamide Derivatives, DAA1097 and DAA1106. *Drug Dev. Res.* **2001**, *52* (3), 475–484.
- (108) Romeo, E.; Cavallaro, S.; Korneyev, A.; Kozikowski, A. P.; Ma, D.; Polo, A.; Costa, E.; Guidotti, A. Stimulation of Brain Steroidogenesis by 2-Aryl-Indole-3-Acetamide Derivatives Acting at the Mitochondrial Diazepam-Binding Inhibitor Receptor Complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *267* (1), 462–471.
- (109) Romeo, E.; Auta, J.; Kozikowski, A. P.; Ma, D.; Papadopoulos, V.; Puia, G.; Costa, E.; Guidotti, A. 2-Aryl-3-Indoleacetamides (FGIN-1): A New Class of Potent and Specific Ligands for the Mitochondrial DBI Receptor (MDR). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *262* (3), 971–978.
- (110) Primofiore, G.; Da Settimo, F.; Taliani, S.; Simorini, F.; Patrizi, M. P.; Novellino, E.; Greco, G.; Abignente, E.; Costa, B.; Chelli, B.; Martini, C. N,N-Dialkyl-2-Phenylindol-3-Ylglyoxylamides. A New Class of Potent and Selective Ligands at the Peripheral Benzodiazepine Receptor. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1852–1855.
- (111) Ferzaz, B.; Brault, E.; Bourliand, G.; Robert, J.-P.; Poughon, G.; Claustre, Y.; Marguet, F.; Liere, P.; Schumacher, M.; Nowicki, J.-P.; Fournier, J.; Marabout, B.; Sevrin, M.; George, P.; Soubrie, P.; Benavides, J.; Scatton, B. SSR180575 (7-Chloro-N,N,5-Trimethyl-4-Oxo-3-Phenyl-3,5-Dihydro-4H-pyridazino[4,5-B]indole-1-Acetamide), a Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligand, Promotes Neuronal Survival and Repair. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301* (3), 1067–1078.
- (112) Sanger, D. J.; Zivkovic, B. Discriminative Stimulus Effects of Alpidem, a New Imidazopyridine Anxiolytic. *Psychopharmacology (Berl.)* **1994**, *113* (3-4), 395–403.
- (113) Trapani, G.; Franco, M.; Ricciardi, L.; Latrofa, A.; Genchi, G.; Sanna, E.; Tuveri, F.; Cagetti, E.; Biggio, G.; Liso, G. Synthesis and Binding Affinity of 2-Phenylimidazo[1,2-A]pyridine Derivatives for Both Central and Peripheral Benzodiazepine Receptors. A New Series of High-Affinity and Selective Ligands for the Peripheral Type. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (19), 3109–3118.
- (114) Trapani, G.; Franco, M.; Latrofa, A.; Carotti, A.; Serra, M.; Sanna, E.; Biggio, G.; Liso, G. Novel 2-Phenylimidazo[1,2-A]pyridine Derivatives as Potent and Selective Ligands for Peripheral Benzodiazepine Receptors: Synthesis, Binding Affinity, and in Vivo Studies. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (19), 3934–3941.
- (115) Selleri, S.; Gratteri, P.; Costagli, C.; Bonaccini, C.; Costanzo, A.; Melani, F.; Guerrini, G.; Ciciani, G.; Costa, B.; Spinetti, F.; Martini, C.; Bruni, F. Insight into 2-phenylpyrazolo[1,5-A]pyrimidin-3-Yl Acetamides as Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligands: Synthesis, Biological Evaluation and 3D-QSAR Investigation. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (16), 4821–4834.
- (116) Verleye, M.; Akwa, Y.; Liere, P.; Ladurelle, N.; Pianos, A.; Eychenne, B.; Schumacher, M.; Gillardin, J.-M. The Anxiolytic Etifoxine Activates the Peripheral Benzodiazepine Receptor and Increases the Neurosteroid Levels in Rat Brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2005**, *82* (4), 712–720.
- (117) Girard, C.; Liu, S.; Cadepond, F.; Adams, D.; Lacroix, C.; Verleye, M.; Gillardin, J.-M.; Baulieu, E.-E.; Schumacher, M.; Schweizer-Groyer, G. Etifoxine Improves Peripheral Nerve Regeneration and Functional

- Recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (51), 20505–20510.
- (118) Aouad, M.; Charlet, A.; Rodeau, J.-L.; Poisbeau, P. Reduction and Prevention of Vincristine-Induced Neuropathic Pain Symptoms by the Non-Benzodiazepine Anxiolytic Etifoxine Are Mediated by 3α -Reduced Neurosteroids. *PAIN* **2009**, *147* (1–3), 54–59.
- (119) Vogel, J. R.; Beer, B.; Clody, D. E. A Simple and Reliable Conflict Procedure for Testing Anti-Anxiety Agents. *Psychopharmacologia* **1971**, *21* (1), 1–7.
- (120) Fiche Technique ECNP Sur Le XBD173.
- (121) Rupprecht, R.; Rammes, G.; Eser, D.; Baghai, T. C.; Schule, C.; Nothdurfter, C.; Troxler, T.; Gentsch, C.; Kalkman, H. O.; Chaperon, F.; Uzunov, V.; McAllister, K. H.; Bertaina-Anglade, V.; La Rochelle, C. D.; Tuerck, D.; Floesser, A.; Kiese, B.; Schumacher, M.; Landgraf, R.; Holsboer, F.; Kucher, K. Translocator Protein (18 kD) as Target for Anxiolytics Without Benzodiazepine-Like Side Effects. *Science* **2009**, *325* (5939), 490–493.
- (122) Owen, D. R. J.; Lewis, A. J. M.; Reynolds, R.; Rupprecht, R.; Eser, D.; Wilkins, M. R.; Bennacef, I.; Nutt, D. J.; Parker, C. A. Variation in Binding Affinity of the Novel Anxiolytic XBD173 for the 18 kDa Translocator Protein in Human Brain. *Synapse* **2011**, *65* (3), 257–259.
- (123) Owen, D. R. J.; Gunn, R. N.; Rabiner, E. A.; Bennacef, I.; Fujita, M.; Kreisl, W. C.; Innis, R. B.; Pike, V. W.; Reynolds, R.; Matthews, P. M.; Parker, C. A. Mixed-Affinity Binding in Humans with 18-kDa Translocator Protein Ligands. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2011**, *52* (1), 24–32.
- (124) Owen, D. R.; Yeo, A. J.; Gunn, R. N.; Song, K.; Wadsworth, G.; Lewis, A.; Rhodes, C.; Pulford, D. J.; Bennacef, I.; Parker, C. A.; StJean, P. L.; Cardon, L. R.; Mooser, V. E.; Matthews, P. M.; Rabiner, E. A.; Rubio, J. P. An 18-kDa Translocator Protein (TSPO) Polymorphism Explains Differences in Binding Affinity of the PET Radioligand PBR28. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, *32* (1), 1–5.
- (125) Chen, Z.-L.; Yu, W.-M.; Strickland, S. Peripheral Regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **2007**, *30* (1), 209–233.
- (126) Torres, S. R.; Fröde, T. S.; Nardi, G. M.; Vita, N.; Reeb, R.; Ferrara, P.; Ribeiro-do-Valle, R. M.; Farges, R. C. Anti-Inflammatory Effects of Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligands in Two Mouse Models of Inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *408* (2), 199–211.
- (127) Girard, C.; Liu, S.; Adams, D.; Lacroix, C.; Sinéus, M.; Boucher, C.; Papadopoulos, V.; Rupprecht, R.; Schumacher, M.; Groyer, G. Axonal Regeneration and Neuroinflammation: Roles for the Translocator Protein 18 kDa. *J. Neuroendocrinol.* **2012**, *24* (1), 71–81.
- (128) Benavides, J.; Dubois, A.; Scatton, B. Peripheral Type Benzodiazepine Binding Sites as a Tool for the Detection and Quantification of CNS Injury. *Curr. Protoc. Neurosci. Editor. Board Jacqueline N Crawley AI* **2001**, *Chapter 7*, Unit7.16.
- (129) Ekdahl, C. T.; Kokaia, Z.; Lindvall, O. Brain Inflammation and Adult Neurogenesis: The Dual Role of Microglia. *Neuroscience* **2009**, *158* (3), 1021–1029.
- (130) Ryu, J. K.; Choi, H. B.; McLarnon, J. G. Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligand PK11195 Reduces Microglial Activation and Neuronal Death in Quinolinic Acid-Injected Rat Striatum. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20* (2), 550–561.
- (131) Veiga, S.; Azcoitia, I.; Garcia-Segura, L. M. Ro5-4864, a Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligand, Reduces Reactive Gliosis and Protects Hippocampal Hilar Neurons from Kainic Acid Excitotoxicity. *J. Neurosci. Res.* **2005**, *80* (1), 129–137.
- (132) Giatti, S.; Pesaresi, M.; Cavaletti, G.; Bianchi, R.; Carozzi, V.; Lombardi, R.; Maschi, O.; Lauria, G.; Garcia-Segura, L. M.; Caruso, D.; Melcangi, R. C. Neuroprotective Effects of a Ligand of Translocator Protein-

- 18kDa (Ro5-4864) in Experimental Diabetic Neuropathy. *Neuroscience* **2009**, *164* (2), 520–529.
- (133) Bordet, T.; Buisson, B.; Michaud, M.; Abitbol, J.-L.; Marchand, F.; Grist, J.; Andriambeloson, E.; Malcangio, M.; Pruss, R. M. Specific Antinociceptive Activity of Cholest-4-En-3-One, Oxime (TRO19622) in Experimental Models of Painful Diabetic and Chemotherapy-Induced Neuropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *326* (2), 623–632.
- (134) Wei, X.-H.; Wei, X.; Chen, F.-Y.; Zang, Y.; Xin, W.-J.; Pang, R.-P.; Chen, Y.; Wang, J.; Li, Y.-Y.; Shen, K.-F.; Zhou, L.-J.; Liu, X.-G. The Upregulation of Translocator Protein (18 kDa) Promotes Recovery from Neuropathic Pain in Rats. *J. Neurosci.* **2013**, *33* (4), 1540–1551.
- (135) Roglio, I.; Giatti, S.; Pesaresi, M.; Bianchi, R.; Cavaletti, G.; Lauria, G.; Garcia-Segura, L.-M.; Melcangi, R. C. Neuroactive Steroids and Peripheral Neuropathy. *Brain Res. Rev.* **2008**, *57* (2), 460–469.
- (136) Soustiel, J. F.; Zaaroor, M.; Vlodaysky, E.; Veenman, L.; Weizman, A.; Gavish, M. Neuroprotective Effect of Ro5-4864 Following Brain Injury. *Exp. Neurol.* **2008**, *214* (2), 201–208.
- (137) Soustiel, J. F.; Vlodaysky, E.; Milman, F.; Gavish, M.; Zaaroor, M. Improvement of Cerebral Metabolism Mediated by Ro5-4864 Is Associated with Relief of Intracranial Pressure and Mitochondrial Protective Effect in Experimental Brain Injury. *Pharm. Res.* **2011**, *28* (11), 2945–2953.
- (138) Vlodaysky, E.; Palzur, E.; Soustiel, J. F. Involvement of the Mitochondrial Benzodiazepine Receptor in Traumatic Brain Injury: Therapeutic Implications. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2014**, *13* (4), 620–629.
- (139) Veenman, L.; Gavish, M. The Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor and the Cardiovascular System. Implications for Drug Development. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *110* (3), 503–524.
- (140) Kunduzova, O. R.; Escourrou, G.; Farge, F. D. L.; Salvayre, R.; Séguélas, M.-H.; Leducq, N.; Bono, F.; Herbert, J.-M.; Parini, A. Involvement of Peripheral Benzodiazepine Receptor in the Oxidative Stress, Death-Signaling Pathways, and Renal Injury Induced by Ischemia-Reperfusion. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15* (8), 2152–2160.
- (141) Thuillier, R.; Hauet, T. Role of Translocator Protein in Renal Ischemia Reperfusion, Renal Preservation and Acute Kidney Injury. *Curr. Mol. Med.* **2012**, *12* (4), 413–425.
- (142) Leducq, N.; Bono, F.; Sulpice, T.; Vin, V. érie; Janiak, P.; Fur, G. L.; O'Connor, S. E.; Herbert, J.-M. Role of Peripheral Benzodiazepine Receptors in Mitochondrial, Cellular, and Cardiac Damage Induced by Oxidative Stress and Ischemia-Reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306* (3), 828–837.
- (143) Daugherty, D. J.; Selvaraj, V.; Chechneva, O. V.; Liu, X.-B.; Pleasure, D. E.; Deng, W. A TSPO Ligand Is Protective in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5* (6), 891–903.
- (144) Kipp, M.; van der Star, B.; Vogel, D. Y. S.; Puentes, F.; van der Valk, P.; Baker, D.; Amor, S. Experimental in Vivo and in Vitro Models of Multiple Sclerosis: EAE and beyond. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2012**, *1* (1), 15–28.
- (145) Yasuno, F.; Ota, M.; Kosaka, J.; Ito, H.; Higuchi, M.; Doronbekov, T. K.; Nozaki, S.; Fujimura, Y.; Koeda, M.; Asada, T.; Suhara, T. Increased Binding of Peripheral Benzodiazepine Receptor in Alzheimer's Disease Measured by Positron Emission Tomography with [C-11]DAA1106. *Biol. Psychiatry* **2008**, *64* (10), 835–841.
- (146) Soldan, S. S.; Retuerto, A. I. A.; Sicotte, N. L.; Voskuhl, R. R. Immune Modulation in Multiple Sclerosis Patients Treated with the Pregnancy Hormone Estriol. *J. Immunol.* **2003**, *171* (11), 6267–6274.
- (147) Noorbakhsh, F.; Ellestad, K. K.; Maingat, F.; Warren, K. G.; Han, M. H.; Steinman, L.; Baker, G. B.; Power, C. Impaired Neurosteroid Synthesis in Multiple Sclerosis. *Brain* **2011**, *134* (9), 2703–2721.

- (148) Gold, S. M.; Chalifoux, S.; Giesser, B. S.; Voskuhl, R. R. Immune Modulation and Increased Neurotrophic Factor Production in Multiple Sclerosis Patients Treated with Testosterone. *J. Neuroinflammation* **2008**, *5* (1), 32.
- (149) Barron, A. M.; Garcia-Segura, L. M.; Caruso, D.; Jayaraman, A.; Lee, J.-W.; Melcangi, R. C.; Pike, C. J. Ligand for Translocator Protein Reverses Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **2013**, *33* (20), 8891–8897.
- (150) Corsi, L.; Geminiani, E.; Baraldi, M. Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR) New Insight in Cell Proliferation and Cell Differentiation Review. *Curr. Clin. Pharmacol.* **2008**, *3* (1), 38–45.
- (151) Gonzalez-Polo, R.-A.; Carvalho, G.; Braun, T.; Decaudin, D.; Fabre, C.; Larochette, N.; Perfettini, J.-L.; Djavaheri-Mergny, M.; Youlyouz-Marfak, I.; Codogno, P.; Raphael, M.; Feuillard, J.; Kroemer, G. PK11195 Potently Sensitizes to Apoptosis Induction Independently from the Peripheral Benzodiazepin Receptor. *Oncogene* **2005**, *24* (51), 7503–7513.
- (152) Hans, G.; Wislet-Gendebien, S.; Lallemand, F.; Robe, P.; Rogister, B.; Belachew, S.; Nguyen, L.; Malgrange, B.; Moonen, G.; Rigo, J.-M. Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR) Ligand Cytotoxicity Unrelated to PBR Expression. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69* (5), 819–830.
- (153) Daniele, S.; Taliani, S.; Da Pozzo, E.; Giacomelli, C.; Costa, B.; Trincavelli, M. L.; Rossi, L.; La Pietra, V.; Barresi, E.; Carotenuto, A.; Limatola, A.; Lamberti, A.; Marinelli, L.; Novellino, E.; Da Settimo, F.; Martini, C. Apoptosis Therapy in Cancer: The First Single-Molecule Co-Activating p53 and the Translocator Protein in Glioblastoma. *Sci. Rep.* **2014**, *4*.
- (154) Kita, A.; Kinoshita, T.; Kohayakawa, H.; Furukawa, K.; Akaike, A. Lack of Tolerance to Anxiolysis and Withdrawal Symptoms in Mice Repeatedly Treated with AC-5216, a Selective TSPO Ligand. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2009**, *33* (6), 1040–1045.
- (155) M. Scarf, A.; M. Auman, K.; Kassiou, M. Is There Any Correlation Between Binding and Functional Effects at the Translocator Protein (TSPO) (18 kDa)? *Curr. Mol. Med.* **2012**, *12* (4), 387–397.
- (156) Francis, J. E.; Bennett, D. A.; Hyun, J. L.; Rovinski, S. L.; Amrick, C. L.; Loo, P. S.; Murphy, D.; Neale, R. F.; Wilson, D. E. Anxiolytic Properties of Certain Annelated [1,2,4]triazolo[1,5-C]pyrimidin-5(6H)-Ones. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (9), 2899–2906.
- (157) Francis, J. E.; Cash, W. D.; Barbaz, B. S.; Bernard, P. S.; Lovell, R. A.; Mazzenga, G. C.; Friedmann, R. C.; Hyun, J. L.; Braunwalder, A. F.; Loo, P. S. Synthesis and Benzodiazepine Binding Activity of a Series of Novel [1,2,4]triazolo[1,5-C]quinazolin-5(6H)-Ones. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (1), 281–290.
- (158) Giesen-Crouse, E. *Peripheral Benzodiazepine Receptors*; Academic Press, 1993.
- (159) Evanno, Y.; Dubois, L.; Sevrin, M.; Marguet, F.; Froissant, J.; Bartsch, R.; Gille, C. 4-OXO-3,5-DIHYDRO-4H-PYRIDAZINO[4,5-B]-INDOLE-1-ACETAMIDE DERIVATIVES, THEIR PREPARATION AND THEIR APPLICATION IN THERAPY. WO9906406 (A1), February 11, 1999.
- (160) Mukhin, A. G.; Papadopoulos, V.; Costa, E.; Krueger, K. E. Mitochondrial Benzodiazepine Receptors Regulate Steroid Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86* (24), 9813–9816.
- (161) Krueger, K. E.; Papadopoulos, V. Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors Mediate Translocation of Cholesterol from Outer to Inner Mitochondrial Membranes in Adrenocortical Cells. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (25), 15015–15022.
- (162) Papadopoulos, V.; Mukhin, A. G.; Costa, E.; Krueger, K. E. The Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Is Functionally Linked to Leydig Cell Steroidogenesis. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (7), 3772–3779.

- (163) Papadopoulos, V.; Guarneri, P.; Kreuger, K. E.; Guidotti, A.; Costa, E. Pregnenolone Biosynthesis in C6-2B Glioma Cell Mitochondria: Regulation by a Mitochondrial Diazepam Binding Inhibitor Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (11), 5113–5117.
- (164) Kita, A.; Kohayakawa, H.; Kinoshita, T.; Ochi, Y.; Nakamichi, K.; Kurumiya, S.; Furukawa, K.; Oka, M. Antianxiety and Antidepressant-like Effects of AC-5216, a Novel Mitochondrial Benzodiazepine Receptor Ligand. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142* (7), 1059–1072.
- (165) Wolf, L.; Bauer, A.; Melchner, D.; Hallof-Buestrich, H.; Stoertebecker, P.; Haen, E.; Kreutz, M.; Sarubin, N.; Milenkovic, V. M.; Wetzell, C. H.; Rupprecht, R.; Nothdurfter, C. Enhancing Neurosteroid Synthesis—Relationship to the Pharmacology of Translocator Protein (18 kDa) (TSPO) Ligands and Benzodiazepines. *Pharmacopsychiatry* **2015**, *48* (2), 72–77.
- (166) Davis, J. B.; Maher, P. Protein Kinase C Activation Inhibits Glutamate-Induced Cytotoxicity in a Neuronal Cell Line. *Brain Res.* **1994**, *652* (1), 169–173.
- (167) Harvey Lodish; Arnold Berk; Paul Matsudaira; Chris A. Kaiser; Monty Krieger; Matthew P. Scott; Lawrence Zipursky; James Darnell. *Molecular Cell Biology*, Fifth Edition edition.; W. H. Freeman: New York, 2003.
- (168) Tabner, B. J.; El-Agnaf, O. M. A.; Turnbull, S.; German, M. J.; Paleologou, K. E.; Hayashi, Y.; Cooper, L. J.; Fullwood, N. J.; Allsop, D. Hydrogen Peroxide Is Generated during the Very Early Stages of Aggregation of the Amyloid Peptides Implicated in Alzheimer Disease and Familial British Dementia. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (43), 35789–35792.
- (169) Fernández-Vizarrá, P.; Fernández, A. P.; Castro-Blanco, S.; Serrano, J.; Bentura, M. L.; Martínez-Murillo, R.; Martínez, A.; Rodrigo, J. Intra- and Extracellular Abeta and PHF in Clinically Evaluated Cases of Alzheimer's Disease. *Histol. Histopathol.* **2004**, *19* (3), 823–844.
- (170) Lustbader, J. W.; Cirilli, M.; Lin, C.; Xu, H. W.; Takuma, K.; Wang, N.; Caspersen, C.; Chen, X.; Pollak, S.; Chaney, M.; Trinchese, F.; Liu, S.; Gunn-Moore, F.; Lue, L.-F.; Walker, D. G.; Kuppusamy, P.; Zewier, Z. L.; Arancio, O.; Stern, D.; Yan, S. S.; Wu, H. Aβ Directly Links Aβ to Mitochondrial Toxicity in Alzheimer's Disease. *Science* **2004**, *304* (5669), 448–452.
- (171) Hirai, K.; Aliev, G.; Nunomura, A.; Fujioka, H.; Russell, R. L.; Atwood, C. S.; Johnson, A. B.; Kress, Y.; Vinters, H. V.; Tabaton, M.; Shimohama, S.; Cash, A. D.; Siedlak, S. L.; Harris, P. L. R.; Jones, P. K.; Petersen, R. B.; Perry, G.; Smith, M. A. Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **2001**, *21* (9), 3017–3023.
- (172) Eckert, A.; Keil, U.; Marques, C. A.; Bonert, A.; Frey, C.; Schüssel, K.; Müller, W. E. Mitochondrial Dysfunction, Apoptotic Cell Death, and Alzheimer's Disease. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66* (8), 1627–1634.
- (173) Leuner, K.; Hauptmann, S.; Abdel-Kader, R.; Scherping, I.; Keil, U.; Strosznajder, J. B.; Eckert, A.; Müller, W. E. Mitochondrial Dysfunction: The First Domino in Brain Aging and Alzheimer's Disease? *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9* (10), 1659–1676.
- (174) Rhein, V.; Eckert, A. Effects of Alzheimer's Amyloid-Beta and Tau Protein on Mitochondrial Function—role of Glucose Metabolism and Insulin Signalling. *Arch. Physiol. Biochem.* **2007**, *113* (3), 131–141.
- (175) Rhein, V.; Baysang, G.; Rao, S.; Meier, F.; Bonert, A.; Müller-Spahn, F.; Eckert, A. Amyloid-Beta Leads to Impaired Cellular Respiration, Energy Production and Mitochondrial Electron Chain Complex Activities in Human Neuroblastoma Cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2009**, *29* (6-7), 1063–1071.
- (176) Eckert, A.; Schmitt, K.; Götz, J. Mitochondrial Dysfunction - the Beginning of the End in Alzheimer's Disease? Separate and Synergistic Modes of Tau and Amyloid-β Toxicity. *Alzheimers Res. Ther.* **2011**, *3* (3), 15.

- (177) Lim, Y.-A.; Rhein, V.; Baysang, G.; Meier, F.; Poljak, A.; J. Raftery, M.; Guilhaus, M.; Ittner, L. M.; Eckert, A.; Götz, J. Aβ and Human Amylin Share a Common Toxicity Pathway via Mitochondrial Dysfunction. *PROTEOMICS* **2010**, *10* (8), 1621–1633.
- (178) Melcangi, R. C.; Panzica, G. C. Allopregnanolone: State of the Art. *Prog. Neurobiol.* **2014**, *113*, 1–5.
- (179) Grimm, A.; Schmitt, K.; Lang, U. E.; Mensah-Nyagan, A. G.; Eckert, A. Improvement of Neuronal Bioenergetics by Neurosteroids: Implications for Age-Related Neurodegenerative Disorders. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842* (12, Part A), 2427–2438.
- (180) Poyton, R. O.; Ball, K. A.; Castello, P. R. Mitochondrial Generation of Free Radicals and Hypoxic Signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* **2009**, *20* (7), 332–340.
- (181) Cui, H.; Kong, Y.; Zhang, H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *J. Signal Transduct.* **2011**, *2012*, e646354.
- (182) Andersen, J. K. Oxidative Stress in Neurodegeneration: Cause or Consequence? *Publ. Online 01 July 2004 Doi101038nrn1434* **2004**, *10*, S18–S25.
- (183) Zampieri, S.; Mellon, S. H.; Butters, T. D.; Nevyjel, M.; Covey, D. F.; Bembi, B.; Dardis, A. Oxidative Stress in NPC1 Deficient Cells: Protective Effect of Allopregnanolone. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13* (9b), 3786–3796.
- (184) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23* (1–3), 3–25.
- (185) Hitchcock, S. A.; Pennington, L. D. Structure–Brain Exposure Relationships. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (26), 7559–7583.
- (186) Lipinski, C. A. Chapter 22 - Compound Properties and Drug Quality. In *The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition)*; Wermuth, C. G., Ed.; Academic Press: New York, 2008; pp 481–490.
- (187) Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. Escape from Flatland: Increasing Saturation as an Approach to Improving Clinical Success. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (21), 6752–6756.
- (188) Ritchie, T. J.; Macdonald, S. J. F. The Impact of Aromatic Ring Count on Compound Developability – Are Too Many Aromatic Rings a Liability in Drug Design? *Drug Discov. Today* **2009**, *14* (21–22), 1011–1020.
- (189) Delaney, J. S. ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44* (3), 1000–1005.
- (190) Alho, H.; Bovolin, P.; Slobodyansky, E. Diazepam Binding Inhibitor (DBI) Processing: Immunohistochemical Studies in the Rat Brain. *Neurochem. Res.* **1990**, *15* (2), 209–216.
- (191) Nun, P.; Pérez, V.; Calmès, M.; Martinez, J.; Lamaty, F. Preparation of Chiral Amino Esters by Asymmetric Phase-Transfer Catalyzed Alkylations of Schiff Bases in a Ball Mill. *Chem. – Eur. J.* **2012**, *18* (12), 3773–3779.
- (192) Waser, M.; Gratzner, K.; Herchl, R.; Müller, N. Design, Synthesis, and Application of Tartaric Acid Derived N-Spiro Quaternary Ammonium Salts as Chiral Phase-Transfer Catalysts. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *10* (2), 251–254.
- (193) Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). Paludisme.
- (194) WHO | World Malaria Report 2014
http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/ (accessed Sep 9, 2015).

- (195) Pasvol, G. Protective Hemoglobinopathies and Plasmodium Falciparum Transmission. *Nat. Genet.* **2010**, *42* (4), 284–285.
- (196) Haldar, K.; Kamoun, S.; Hiller, N. L.; Bhattacharje, S.; van Ooij, C. Common Infection Strategies of Pathogenic Eukaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4* (12), 922–931.
- (197) Miller, L. H.; Baruch, D. I.; Marsh, K.; Doumbo, O. K. The Pathogenic Basis of Malaria. *Nature* **2002**, *415* (6872), 673–679.
- (198) Cooke, B. M.; Stuart, J.; Nash, G. B. The Cellular and Molecular Rheology of Malaria. *Biorheology* **2014**, *51* (2-3), 99–119.
- (199) Beteck, R. M.; Smit, F. J.; Haynes, R. K.; N'Da, D. D. Recent Progress in the Development of Anti-Malarial Quinolones. *Malar. J.* **2014**, *13* (1), 339.
- (200) Fan, J.; Rone, M. B.; Papadopoulos, V. Translocator Protein 2 Is Involved in Cholesterol Redistribution during Erythropoiesis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (44), 30484–30497.
- (201) Holm, T. M.; Braun, A.; Trigatti, B. L.; Brugnara, C.; Sakamoto, M.; Krieger, M.; Andrews, N. C. Failure of Red Blood Cell Maturation in Mice with Defects in the High-Density Lipoprotein Receptor SR-BI. *Blood* **2002**, *99* (5), 1817–1824.
- (202) Bouyer, G.; Cueff, A.; Egée, S.; Kmiecik, J.; Maksimova, Y.; Glogowska, E.; Gallagher, P. G.; Thomas, S. L. Y. Erythrocyte Peripheral Type Benzodiazepine Receptor/voltage-Dependent Anion Channels Are Upregulated by Plasmodium Falciparum. *Blood* **2011**, *118* (8), 2305–2312.
- (203) Dzierszynski, F.; Coppin, A.; Mortuaire, M.; Dewailly, E.; Slomianny, C.; Ameisen, J.-C.; DeBels, F.; Tomavo, S. Ligands of the Peripheral Benzodiazepine Receptor Are Potent Inhibitors of Plasmodium Falciparum and Toxoplasma Gondii In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (10), 3197–3207.
- (204) Ostuni, M. A.; Péranzi, G.; Ducroc, R. A.; Fasseu, M.; Vidic, B.; Dumont, J.; Papadopoulos, V.; Lacapere, J.-J. Distribution, Pharmacological Characterization and Function of the 18 kDa Translocator Protein in Rat Small Intestine. *Biol. Cell* **2009**, *101* (10), 573–586.
- (205) Sartorello, R.; Budu, A.; Bagnaresi, P.; Fernandes, C. A.; Sato, P. M.; Bueno, V. B.; Fontes, M. R.; Oliveira, P. L.; Paiva-Silva, G. O.; Alves, S. V.; Netto, L. E.; Catalani, L. H.; Garcia, C. R. In Vivo Uptake of a Haem Analogue Zn Protoporphyrin IX by the Human Malaria Parasite P. Falciparum-Infected Red Blood Cells. *Cell Biol. Int.* **2010**, *34* (8), 859–865.
- (206) Taketani, S.; Kohno, H.; Furukawa, T.; Tokunaga, R. Involvement of Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors in the Intracellular Transport of Heme and Porphyrins. *J. Biochem. (Tokyo)* **1995**, *117* (4), 875–880.
- (207) Parsons, W. H.; Patchett, A. A. United States Patent: 4692522 - Benzofused Lactams Useful as Cholecystokinin Antagonists. 4692522, September 8, 1987.
- (208) Parsons, W. H.; Davidson, J. L.; Taub, D.; Aster, S. D.; Thorsett, E. D.; Patchett, A. A.; Ulm, E. H.; Lamont, B. I. Benzolactams. A New Class of Converting Enzyme Inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *117* (1), 108–113.
- (209) Tamura, S. Y.; Goldman, E. A.; Bergum, P. W.; Semple, J. E. Novel Benzo-Fused Lactam Scaffolds as Factor Xa Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (17), 2573–2578.
- (210) Birch, A.; Morley, A. Chemical Compounds. WO03074513 (A2), September 12, 2003.

- (211) Birch, A.; Morley, A.; Stocker, A.; Whittamore, P. Heterocyclic Amide Derivatives as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. WO03074532 (A1), September 12, 2003.
- (212) Birch, A.; Kemmitt, P.; Martin, N.; Ward, R. Tetrahydroquinolones and Aza-Analogues Thereof for Use as Dpp-IV Inhibitors in the Treatment of Diabetes. WO2005123685 (A1), December 29, 2005.
- (213) Davis, A. L.; Chambers, W. H.; Kelley, D. H.; Fell, D. A.; Haynes, J. R.; Hulme, K. L.; Gage, L. D.; McCord, T. J. Synthesis and Antibacterial Activities of Some Chloro Analogs of 3-Amino-3,4-Dihydro-1-Hydroxycarbostyryl. *J. Med. Chem.* **1975**, *18* (7), 752–755.
- (214) Zhao, H.; Thurkauf, A.; Braun, J.; Brodbeck, R.; Kieltyka, A. Design, Synthesis, and Discovery of 3-Piperazinyl-3,4-Dihydro-2(1H)-Quinolinone Derivatives: A Novel Series of Mixed Dopamine D2/D4 Receptor Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (18), 2119–2122.
- (215) Albrecht, S.; Defoin, A.; Salomon, E.; Tarnus, C.; Wetterholm, A.; Haeggström, J. Z. Synthesis and Structure Activity Relationships of Novel Non-Peptidic Metallo-Aminopeptidase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (21), 7241–7257.
- (216) Watthey, J. W. H.; Stanton, J. L.; Desai, M.; Babiarz, J. E.; Finn, B. M. Synthesis and Biological Properties of (carboxyalkyl)amino-Substituted Bicyclic Lactam Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme. *J. Med. Chem.* **1985**, *28* (10), 1511–1516.
- (217) Hulin, B.; Lopaze, M. G. A Practical Synthesis of (R)- and (S)-3-Amino-3,4-Dihydro-1H-Quinolin-2-One. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, *15* (12), 1957–1958.
- (218) Birch, A. M.; Kenny, P. W.; Oikonomakos, N. G.; Otterbein, L.; Schofield, P.; Whittamore, P. R. O.; Whalley, D. P. Development of Potent, Orally Active 1-Substituted-3,4-Dihydro-2-Quinolone Glycogen Phosphorylase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (2), 394–399.
- (219) Herrero, M. T.; Tellitu, I.; Domínguez, E.; Hernández, S.; Moreno, I.; SanMartín, R. A General and Efficient PIFA Mediated Synthesis of Heterocycle-Fused Quinolinone Derivatives. *Tetrahedron* **2002**, *58* (42), 8581–8589.
- (220) Zhdankin, V. V.; Stang, P. J. Chemistry of Polyvalent Iodine. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (12), 5299–5358.
- (221) Du, Y.; Liu, R.; Linn, G.; Zhao, K. Synthesis of N-Substituted Indole Derivatives via PIFA-Mediated Intramolecular Cyclization. *Org. Lett.* **2006**, *8* (26), 5919–5922.
- (222) Surry, D. S.; Buchwald, S. L. Biaryl Phosphane Ligands in Palladium-Catalyzed Amination. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (34), 6338–6361.
- (223) Surry, D. S.; Buchwald, S. L. Dialkylbiaryl Phosphines in Pd-Catalyzed Amination: A User's Guide. *Chem. Sci.* **2010**, *2* (1), 27–50.
- (224) Hicks, J. D.; Hyde, A. M.; Cuezva, A. M.; Buchwald, S. L. Pd-Catalyzed N-Arylation of Secondary Acyclic Amides: Catalyst Development, Scope, and Computational Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (46), 16720–16734.
- (225) Hopkinson, M. N.; Richter, C.; Schedler, M.; Glorius, F. An Overview of N-Heterocyclic Carbenes. *Nature* **2014**, *510* (7506), 485–496.
- (226) Jin, Z.; Guo, S.-X.; Gu, X.-P.; Qiu, L.-L.; Song, H.-B.; Fang, J.-X. Highly Active, Well-Defined (Cyclopentadiene)(N-Heterocyclic Carbene)palladium Chloride Complexes for Room-Temperature Suzuki–Miyaura and Buchwald–Hartwig Cross-Coupling Reactions of Aryl Chlorides and Deboronation Homocoupling of Arylboronic Acids. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351* (10), 1575–1585.

- (227) Beletskaya, I. P.; Cheprakov, A. V. Palladacycles in Catalysis – a Critical Survey. *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689* (24), 4055–4082.
- (228) Solvent Polarity Table - Miller's Home <https://sites.google.com/site/miller00828/in/solvent-polarity-table> (accessed Aug 20, 2015).
- (229) Buitrago Santanilla, A.; Christensen, M.; Campeau, L.-C.; Davies, I. W.; Dreher, S. D. P2Et Phosphazene: A Mild, Functional Group Tolerant Base for Soluble, Room Temperature Pd-Catalyzed C–N, C–O, and C–C Cross-Coupling Reactions. *Org. Lett.* **2015**, *17* (13), 3370–3373.
- (230) Kaljurand, I.; Kütt, A.; Sooväli, L.; Rodima, T.; Mäemets, V.; Leito, I.; Koppel, I. A. Extension of the Self-Consistent Spectrophotometric Basicity Scale in Acetonitrile to a Full Span of 28 pKa Units: Unification of Different Basicity Scales. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (3), 1019–1028.
- (231) O'Donnell, M. J.; Delgado, F.; Hostettler, C.; Schwesinger, R. An Efficient Homogeneous Catalytic Enantioselective Synthesis of α -Amino Acid Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (48), 8775–8778.
- (232) Djuric, S.; Venit, J.; Magnus, P. Silicon in Synthesis: Stabase Adducts - a New Primary Amine Protecting Group: Alkylation of Ethyl Glycinate. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (19), 1787–1790.
- (233) Kelly, N. M.; Jensen, K. J. 2,4-Dimethoxybenzyl: An Amide Protecting Group for 2-Acetamido Glycosyl Donors. *J. Carbohydr. Chem.* **2001**, *20* (7-8), 537–548.
- (234) Angelina Flores-Parra, S. A. S.-R. New 1,3,5-Heterocyclohexanes: Dioxazines, Oxadiazines, Thiadiazines, Oxathiazines and Triazines and Their Amination, Transamination and Disproportionation Reactions. *Heterocycles* **1999**, *51* (9).
- (235) Toda, T.; Morimura, S.; Mori, E.; Horiuchi, H.; Murayama, K. Studies on Stable Free Radicals. VI. Synthesis of Substituted 4-Imidazolidinone-1-Oxyls. *Bull Chem Soc Jpn* **1971**, *44* (12), 3445–3450.
- (236) Bräse, S.; Kirchoff, J. H.; Köbberling, J. Palladium-Catalysed Reactions in Solid Phase Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2003**, *59* (7), 885–939.
- (237) Zalesskiy, S. S.; Ananikov, V. P. Pd2(dba)3 as a Precursor of Soluble Metal Complexes and Nanoparticles: Determination of Palladium Active Species for Catalysis and Synthesis. *Organometallics* **2012**, *31* (6), 2302–2309.
- (238) Han, W.; Liu, C.; Jin, Z.-L. In Situ Generation of Palladium Nanoparticles: A Simple and Highly Active Protocol for Oxygen-Promoted Ligand-Free Suzuki Coupling Reaction of Aryl Chlorides. *Org. Lett.* **2007**, *9* (20), 4005–4007.
- (239) Ueda, S.; Su, M.; Buchwald, S. L. Completely N1-Selective Palladium-Catalyzed Arylation of Unsymmetric Imidazoles: Application to the Synthesis of Nilotinib. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (1), 700–706.
- (240) Francis, S. H.; Turko, I. V.; Corbin, J. D. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Relating Structure and Function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2001**, *65*, 1–52.
- (241) Francis, S. H.; Blount, M. A.; Corbin, J. D. Mammalian Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Mechanisms and Physiological Functions. *Physiol. Rev.* **2011**, *91* (2), 651–690.
- (242) Soderling, S. H.; Beavo, J. A. Regulation of cAMP and cGMP Signaling: New Phosphodiesterases and New Functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12* (2), 174–179.
- (243) Dousa, T. P. Cyclic-3',5'-Nucleotide Phosphodiesterase Isozymes in Cell Biology and Pathophysiology of the Kidney. *Kidney Int.* **1999**, *55* (1), 29–62.

- (244) Stoclet, J.-C.; Keravis, T.; Komasa, N.; Lugnier, C. Section Review: Cardiovascular & Renal: Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases as Therapeutic Targets in Cardiovascular Diseases. *Expert Opin. Investig. Drugs* **1995**, *4* (11), 1081–1100.
- (245) Wang, L.; Chopp, M.; Szalad, A.; Liu, Z.; Bolz, M.; Álvarez, F. M.; Lu, M.; Zhang, L.; Cui, Y.; Zhang, R. L.; Zhang, Z. G. Phosphodiesterase-5 Is a Therapeutic Target for Peripheral Neuropathy in Diabetic Mice. *Neuroscience* **2011**, *193*, 399–410.
- (246) Watanabe, N.; Adachi, H.; Takase, Y.; Ozaki, H.; Matsukura, M.; Miyazaki, K.; Ishibashi, K.; Ishihara, H.; Kodama, K.; Nishino, M.; Kakiki, M.; Kabasawa, Y. 4-(3-Chloro-4-Methoxybenzyl)aminophthalazines: Synthesis and Inhibitory Activity toward Phosphodiesterase 5. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (13), 2523–2529.
- (247) Watanabe, N.; Kabasawa, Y.; Takase, Y.; Matsukura, M.; Miyazaki, K.; Ishihara, H.; Kodama, K.; Adachi, H. 4-Benzylamino-1-Chloro-6-Substituted Phthalazines: Synthesis and Inhibitory Activity toward Phosphodiesterase 5. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (18), 3367–3372.
- (248) Szilágyi, G.; Nagy, Z.; Balkay, L.; Boros, I.; Emri, M.; Lehel, S.; Márián, T.; Molnár, T.; Szakáll, S.; Trón, L.; Bereczki, D.; Csiba, L.; Fekete, I.; Kerényi, L.; Galuska, L.; Varga, J.; Bönöczk, P.; Vas, Á.; Gulyás, B. Effects of Vinpocetine on the Redistribution of Cerebral Blood Flow and Glucose Metabolism in Chronic Ischemic Stroke Patients: A PET Study. *J. Neurol. Sci.* **2005**, *229–230*, 275–284.
- (249) Vandecasteele, G.; Verde, I.; Rücker-Martin, C.; Donzeau-Gouge, P.; Fischmeister, R. Cyclic GMP Regulation of the L-Type Ca²⁺ Channel Current in Human Atrial Myocytes. *J. Physiol.* **2001**, *533* (2), 329–340.
- (250) Dickinson, N. T.; Jang, E. K.; Haslam, R. J. Activation of cGMP-Stimulated Phosphodiesterase by Nitroprusside Limits cAMP Accumulation in Human Platelets: Effects on Platelet Aggregation. *Biochem. J.* **1997**, *323* (2), 371–377.
- (251) Boess, F. G.; Hendrix, M.; van der Staay, F.-J.; Erb, C.; Schreiber, R.; van Staveren, W.; de Vente, J.; Prickaerts, J.; Blokland, A.; Koenig, G. Inhibition of Phosphodiesterase 2 Increases Neuronal cGMP, Synaptic Plasticity and Memory Performance. *Neuropharmacology* **2004**, *47* (7), 1081–1092.
- (252) Bender, A. T.; Beavo, J. A. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Regulation to Clinical Use. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58* (3), 488–520.
- (253) Conti, M.; Andersen, C. B.; Richard, F.; Mehats, C.; Chun, S.-Y.; Horner, K.; Jin, C.; Tsafiriri, A. Role of Cyclic Nucleotide Signaling in Oocyte Maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2002**, *187* (1–2), 153–159.
- (254) Masciarelli, S.; Horner, K.; Liu, C.; Park, S. H.; Hinckley, M.; Hockman, S.; Nedachi, T.; Jin, C.; Conti, M.; Manganiello, V. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 3A-Deficient Mice as a Model of Female Infertility. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114* (2), 196–205.
- (255) Maxwell, C. R.; Kanes, S. J.; Abel, T.; Siegel, S. J. Phosphodiesterase Inhibitors: A Novel Mechanism for Receptor-Independent Antipsychotic Medications. *Neuroscience* **2004**, *129* (1), 101–107.
- (256) Halene, T. B.; Siegel, S. J. PDE Inhibitors in Psychiatry – Future Options for Dementia, Depression and Schizophrenia? *Drug Discov. Today* **2007**, *12* (19–20), 870–878.
- (257) Smith, D. L.; Pozueta, J.; Gong, B.; Arancio, O.; Shelanski, M. Reversal of Long-Term Dendritic Spine Alterations in Alzheimer Disease Models. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (39), 16877–16882.
- (258) Dinter, D. H. Phosphodiesterase Type 4 Inhibitors. *BioDrugs* **2012**, *13* (2), 87–94.
- (259) Montana, J. G.; Dyke, H. J. Update on the Therapeutic Potential of PDE4 Inhibitors. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2002**, *11* (1), 1–13.

- (260) Lipworth, B. J. Phosphodiesterase-4 Inhibitors for Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Lancet Lond. Engl.* **2005**, *365* (9454), 167–175.
- (261) Ghofrani, H. A.; Osterloh, I. H.; Grimminger, F. Sildenafil: From Angina to Erectile Dysfunction to Pulmonary Hypertension and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (8), 689–702.
- (262) Lewis, G. D.; Semigran, M. J. Type 5 Phosphodiesterase Inhibition in Heart Failure and Pulmonary Hypertension. *Curr. Heart Fail. Rep.* **2004**, *1* (4), 183–189.
- (263) Franco, R. Enhancing Cognition before Clinical Symptoms of Dementia. *Front. Syst. Neurosci.* **2014**, *8*, 240.
- (264) García-Barroso, C.; Ricobaraza, A.; Pascual-Lucas, M.; Unceta, N.; Rico, A. J.; Goicolea, M. A.; Sallés, J.; Lanciego, J. L.; Oyarzabal, J.; Franco, R.; Cuadrado-Tejedor, M.; García-Osta, A. Tadalafil Crosses the Blood-Brain Barrier and Reverses Cognitive Dysfunction in a Mouse Model of AD. *Neuropharmacology* **2013**, *64*, 114–123.
- (265) Salomé, C. Construction de nouveaux hétérocycles par réaction de Buchwald, synthèses et propriétés pharmacologiques. Thèse de Doctorat, Université de Strasbourg, 2007.
- (266) Abarghaz, M.; Biondi, S.; Duranton, J.; Mondadori, C.; Wagner, P. Benzodiazepine Derivatives, Their Preparation and the Therapeutic Use Thereof. EP1749824 (A1), February 7, 2007.
- (267) Rogers-Evans, M.; Spurr, P.; Hennig, M. The Isolation and Use of a Benzodiazepine Iminochloride for the Efficient Construction of Flumazenil. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (11), 2425–2428.
- (268) Hellal, M. Phtalazinones et 2,3-benzodiazépinones dérivées de l'azélastine : Synthèses et activités anti-cytokine, Université de Strasbourg.
- (269) Bihel, F. J. J.; Justiniano, H.; Schmitt, M.; Hellal, M.; Ibrahim, M. A.; Lugnier, C.; Bourguignon, J.-J. New PDE4 Inhibitors Based on Pharmacophoric Similarity between Papaverine and Tofisopam. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (21), 6567–6572.
- (270) Rupard, J. H.; De Paulis, T.; Janowsky, A.; Smith, H. E. Sterically Hindered 5,11-Dicarbo Analogs of Clozapine as Potential Chiral Antipsychotic Agents. *J. Med. Chem.* **1989**, *32* (10), 2261–2268.
- (271) Damien, M. *Diagramme de Jablonski*; 2008.
- (272) Hovius, R.; Vallotton, P.; Wohland, T.; Vogel, H. Fluorescence Techniques: Shedding Light on Ligand–receptor Interactions. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21* (7), 266–273.
- (273) Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes. *Wikipédia*; 2014.
- (274) Bazin, H.; Préaudat, M.; Trinquet, E.; Mathis, G. Homogeneous Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Using Rare Earth Cryptates as a Tool for Probing Molecular Interactions in Biology. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2001**, *57* (11), 2197–2211.
- (275) Degorce, F.; Card, A.; Soh, S.; Trinquet, E.; Knapik, G. P.; Xie, B. HTRF: A Technology Tailored for Drug Discovery - a Review of Theoretical Aspects and Recent Applications. *Curr. Chem. Genomics* **2009**, *3*, 22–32.
- (276) Kapur, J.; Macdonald, R. L. Pharmacological Properties of Gamma-Aminobutyric acidA Receptors from Acutely Dissociated Rat Dentate Granule Cells. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50* (3), 458–466.
- (277) Crestani, F.; Martin, J. R.; Möhler, H.; Rudolph, U. Mechanism of Action of the Hypnotic Zolpidem in Vivo. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *131* (7), 1251–1254.

- (278) Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. The Use of Esters of N-Hydroxysuccinimide in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (9), 1839–1842.
- (279) Laufer, S. A.; Augustin, J.; Dannhardt, G.; Kiefer, W. (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-Yl)acetic Acids, a Novel Class of Potent Dual Inhibitors of Both Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (12), 1894–1897.
- (280) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154.
- (281) Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vágner, J.; Albericio, F.; Barany, G. Backbone Amide Linker (BAL) Strategy for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal-Modified and Cyclic Peptides^{1,2,3}. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (22), 5441–5452.

Conception, développement et synthèse de ligands du TSPO dans le but de traiter les maladies neurodégénératives

Résumé

Les neurostéroïdes sont des composés endogènes qui peuvent moduler la transmission synaptique et avoir un effet neuroprotecteur dans les maladies neurodégénératives. Les systèmes régulant leur biosynthèse ne sont pas connus mais la première étape de celle-ci peut être régulée par la protéine TSPO. Cette protéine mitochondriale facilite le transport du cholestérol vers l'intérieur de la mitochondrie pour y être métabolisé en prégnénolone. Ce stéroïde est le précurseur principal de la biosynthèse des neurostéroïdes et l'utilisation *in vitro* de ligands du TSPO permet d'augmenter sa sécrétion. Dans ce travail de thèse, nous avons ainsi cherché à développer de nouvelles familles de ligands solubles du TSPO augmentant la sécrétion de prégnénolone. Le développement de ces nouvelles familles a nécessité la réalisation d'une méthodologie de synthèse faisant intervenir une réaction de cyclisation pallado-catalysée de type Buchwald-Hartwig. Une étude de solubilité des composés synthétisés a été effectuée expérimentalement, leur activité a été évaluée par des méthodes fonctionnelles et leur effet neuroprotecteur a été testé sur un modèle cellulaire de la maladie d'Alzheimer.

Mots clés : TSPO, neurostéroïdes, neuroprotection, prégnénolone, alloprégnanolone, Alzheimer, solubilité, Buchwald-Hartwig, 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-ones,

Abstract

Neurosteroids are endogenous compounds which can alter the synaptic transmission and enhance neuroprotection in neurodegenerative diseases. The systems that regulates their biosynthesis are not described but its first step can be regulated by the TSPO. This mitochondrial protein facilitates the transport of cholesterol to the mitochondrial matrix to be metabolized in pregnenolone. This steroid is the precursor of neurosteroid biosynthesis and *in vitro* use of TSPO ligands induces its secretion. For this project, we looked forward to develop new families of soluble TSPO ligands that can increase pregnenolone production. The access to 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-ones required the establishment of a synthesis methodology of a palladium-catalyzed cyclization following Buchwald-Hartwig amination. A solubility study of synthesized compound was performed, their activity was established based on functional assays and their neuroprotective effect was evaluated on a cellular model of Alzheimer disease.

Keywords: TSPO, neurosteroids, neuroprotection, pregnenolone, allopregnanolone, Alzheimer, solubility, Buchwald-Hartwig, 3-amino-3,4-dihydroquinolin-2-ones, imidazo[1,2-c]quinazolin-2-ones