



HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation de nouveaux ligands de la protéine sigma-1 à visée neuroprotectrice

Marion Donnier-Maréchal

► **To cite this version:**

Marion Donnier-Maréchal. Conception, synthèse et évaluation de nouveaux ligands de la protéine sigma-1 à visée neuroprotectrice. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S046 . tel-01342562

HAL Id: tel-01342562

<https://theses.hal.science/tel-01342562>

Submitted on 11 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.

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE – DROIT ET SANTE
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

EA 4481 GRIIOT

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE

Spécialité : Science du médicament

Présentée et soutenue à huis clos

le 26 Septembre 2013

par

Marion DONNIER-MARECHAL

Ingénieur E.N.S.C.L.

**CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DE
NOUVEAUX LIGANDS DE LA PROTEINE
SIGMA-1 A VISEE NEUROPROTECTRICE**

CONFIDENTIEL

Membres du Jury

Directrice de thèse : **P. Melnyk**, Professeur, Université Lille 2

Co-directeur de thèse : **P. Carato**, Maître de conférences HDR, Université Lille 2

Rapporteurs : **J.-J. Bourguignon**, Directeur de recherche CNRS, Université de
Strasbourg

S. Routier, Professeur, Université d'Orléans

Examineur : **F. Fabis**, Professeur, Université de Caen

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE – DROIT ET SANTE

EA 4481, Groupe de Recherche Interdisciplinaire

Innovation et Optimisation Thérapeutique

Laboratoire de Chimie Thérapeutique

3 Rue du Professeur Laguesse, 59 000 Lille

THESE

Présentée et soutenue à huis clos

le 26 Septembre 2013

par

Marion DONNIER-MARECHAL

Ingénieur E.N.S.C.L.

**CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DE
NOUVEAUX LIGANDS DE LA PROTEINE
SIGMA-1 A VISEE NEUROPROTECTRICE**

Membres du Jury

Directrice de thèse : **P. Melnyk**, Professeur, Université Lille 2

Co-directeur de thèse : **P. Carato**, Maître de conférences HDR, Université Lille 2

Rapporteurs : **J-J. Bourguignon**, Directeur de recherche CNRS, Université de
Strasbourg

S. Routier, Professeur, Université d'Orléans

Examineur : **F. Fabis**, Professeur, Université de Caen

Note de confidentialité

Le présent manuscrit est classé confidentiel. Par conséquent, sa diffusion est limitée aux responsables de cette thèse et sa consultation est soumise à l'autorisation du laboratoire de « Chimie thérapeutique » du Professeur Patricia Melnyk (EA 4481, GRIIOT, Université de Lille).

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été effectués au sein du Groupe de Recherche Interdisciplinaire Innovation et Optimisation Thérapeutique (EA 4481 GRIIOT, Lille). Je tiens à remercier les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué au bon déroulement de ce travail de thèse de doctorat.

Mes premiers remerciements s'adressent au **Pr Patricia Melnyk**, ma directrice de thèse, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci de m'avoir proposé ce sujet passionnant et fait confiance pendant ces trois années. Je remercie également le **Dr Pascal Carato**, mon co-directeur de thèse pour m'avoir encadrée et guidée dans ces travaux. J'ai particulièrement apprécié les discussions scientifiques que nous avons eues tous les trois et qui m'ont permis d'avancer sur le sujet.

Je remercie sincèrement les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail. Je suis très reconnaissante envers le **Dr Jean-Jacques Bourguignon**, Directeur de recherche CNRS à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg et envers le **Pr Sylvain Routier**, Professeur à l'Institut de Chimie Organique et Analytique de l'Université d'Orléans d'avoir accepté le rôle de rapporteur et ainsi accordé un temps précieux à ce manuscrit. Mes remerciements s'adressent également au **Pr Frédéric Fabis**, Professeur au Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie de l'Université de Caen qui a accepté de juger ce travail et d'honorer de sa présence le jury de cette thèse.

J'exprime mes profonds remerciements au **Pr Patrick Vermersch** qui a collaboré à ce projet et avec qui les discussions sur la sclérose en plaques étaient toujours très instructives ; ainsi qu'au **Dr Bénédicte Oxombre-Vanteghem** et à **Marine Bellart** qui ont réalisé les tests *in-vivo* EAE. Merci à toutes les deux de m'avoir accueillie quelques jours à l'animalerie pour me faire découvrir le monde de la biologie. Bénédicte, merci également pour tes conseils avisés, ta gentillesse, ta disponibilité et ton soutien lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à exprimer ma sympathie aux différents laboratoires de la Faculté de Pharmacie de Lille sans que les différentes analyses n'auraient pu se faire. Je remercie le **Pr Nathalie Azaroual**, **Pierre Larzillière** et **Vincent Ultré** du laboratoire de RMN pour leur aide et leurs conseils avisés. Je remercie également les **Dr Christophe Furman** et **Dr Delphine Le Broc** de la plateforme de binding pour avoir réalisé les études de toxicité sur l'ensemble de mes composés ; le **Dr Emmanuelle Lipka** du laboratoire de chimie analytique pour les études cinétiques ; ainsi que le **Dr Nicolas Sergeant** et **Sabiha Eddarkaoui** de l'UMR 837-1 pour les évaluations de l'activité anti-Alzheimer.

De même, j'adresse mes remerciements à l'équipe de carbonylation (UCCS, Lille1) et tout particulièrement au **Pr Mathieu Sautier** pour m'avoir permis de séjourner quelques jours au sein de

son laboratoire à Lille 1, afin de résoudre des problèmes de synthèse. Merci pour l'accueil chaleureux, vos conseils et votre disponibilité.

Je voudrais remercier chaleureusement le **Dr Laurence Agouridas** pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa faculté d'écoute. Tes précieux conseils et ton esprit critique ont été indispensables dans l'aboutissement de ce travail et lors de la rédaction de ce manuscrit. Merci également d'avoir accepté ma présence lors de tes séances de travaux pratiques. Cette expérience, bien que courte, fut très enrichissante et comptait énormément pour moi.

J'adresse un remerciement très spécial à **Valeria Héloire Moas**, ma colocataire de bureau, de labo et de thèse, avec qui j'ai passé trois années excellentes. Plus qu'une collègue, c'est une amie que j'ai découverte. J'ai évidemment apprécié tous les moments partagés, nos vendredis sushi, nos mardis badminton et nos conversations interminables, qu'elles concernent la recherche, la vie lilloise ou nos goûts littéraires. Un grand merci pour tes encouragements, ton soutien (dans les moments de doute) et tes précieux conseils. Merci également à ton mari, **Nicolas**, pour son soutien et sa gentillesse. Soyez assurés de ma gratitude et de mon amitié sincère. Je serais bien évidemment à vos côtés quand votre tour viendra !

Bien entendu, j'associe à ces remerciements l'ensemble des membres de l'équipe de « Chimie Thé 2 » passés et présents : **Marion, Noémie, Polo, Laurence, Christophe, Valeria, Thi Huu et Guillaume** ; ainsi que les modélisateurs : **Nicolas, Amaury et Xavier**. Nous avons partagé de nombreux bons moments, des fous rires, des discussions sur tout et n'importe quoi et surtout de nombreuses grilles de mots croisés pendant les pauses du midi. Merci pour votre bonne humeur qui a égayé le laboratoire pendant ces 3 années.

Mes remerciements s'adressent également à **Allison Keating** (Master 1, Trinity College Dublin, IE), **Hollie McCarron** (Master 1, St Andrews University, GB), **Jiaqui He** dit « Vivi » (Master 1, Wuhan University, CN) que j'ai eu l'honneur d'encadrer au cours de ma thèse et qui ont contribué aux résultats présentés dans ce manuscrit.

Je tiens à remercier aussi l'ensemble des personnes que j'ai pu côtoyer au sein de l'université durant ces trois années de thèse. Il est toujours agréable de recevoir un sourire, un bonjour, un signe aimable. Merci notamment à la « Team RU » avec qui j'ai partagé de bons moments et de nombreux fous rires.

Bien sûr, ces trois années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans un grand nombre de personnes : amis, famille et autres rencontres, que je tiens également à remercier. Je risque d'en oublier et je m'en excuse par avance.

Tout d'abord, un grand merci à mes chers **prépaïens** qui m'ont exprimé leur soutien tout au long de ce travail. La liste est un peu longue mais j'ai une pensée toute particulière pour **Caro B**, qui de Nantes puis de Rennes, a partagé ces années de thèse, les doutes et les interrogations. Merci pour ton oreille attentive lorsque tout allait de travers... Je serais là pour te soutenir dans un an.

Autre lieu, autres personnes. Je remercie les grenoblois et surtout **Floriane et Florian** pour avoir toujours répondu présents lors de mes retours dans notre si belle région. Nos simples retrouvailles au spa ou autour d'un café avec toi « ma cocotte » et nos longues randonnées avec toi « mon p'tit préz », me permettaient de repartir dans le Nord ressourcée et prête à affronter le quotidien de thésarde.

Un grand merci également aux lillois et ex-lillois : **Manou et Jade, Ségo, Renaud**, amis ENSCLiens en général, pour tous les bons moments passés ensemble. Nous retiendrons parmi ceux là les différentes crémaillères à St Etienne ou nos week-ends à la montagne généralement arrosés de Pulco citron et de grenadine ! La Team Bassinus a encore de beaux jours devant elle.

Sans oublier **Baptiste, Sophie, Jenni et Nico** qui étaient présents au quotidien ces trois dernières années et sans qui cette Team Bassinus n'existerait pas. Merci pour tous les bons moments partagés avec vous. Sophie, nos week-ends parisiens (musée, théâtre, rugby, soirée...) font partie des très bons souvenirs de ces années de thèse. Baptiste, tu as été un soutien de tous les jours lors de mes deux premières années, tu m'as beaucoup manqué lors de cette dernière, reviens vite en France. Merci à Nico pour nous avoir si bien abreuvés lors de nos différentes soirées et à Jenni (et sa permanente bonne humeur) pour avoir fait de ces soirées des moments inoubliables. Ces trois dernières années sur Lille n'auraient définitivement pas été les mêmes sans vous.

Un dernier petit clin d'œil au crocodile de Peter Pan et à son réveil qui m'ont tenu compagnie lors de cette dernière année !!!

Enfin, je voudrais dédier ce manuscrit à **mes parents et mes frères** qui m'ont soutenue tout au long de mes études et de ce travail, et ce quelque soit mes choix même si le monde de la chimie reste obscur pour eux. Malgré mon éloignement depuis de (trop) nombreuses années, vous avez toujours été présents dans les moments difficiles et vous m'avez donné la force d'avancer et d'aboutir à la personne que je suis aujourd'hui. **MERCI...!!**

Merci à vous tous d'être toujours là...

« Vous êtes comme était mon renard. Ce n'était qu'un renard semblable à cent mille autres.
Mais j'en ai fait mon ami, et il est maintenant unique au monde. »

Le Petit Prince - Antoine de Saint Exupéry

« Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte. »

Louis Pasteur

Publications et communications

Ce travail a donné lieu aux brevets, publications et communications suivants :

Brevet :

Preuves de concept pour un traitement innovant par agonistes du récepteur sigma-1 dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), modèle animal de la sclérose en plaques (SEP), Patricia Melnyk, Patrick Vermersch, Pascal Carato, Bénédicte Oxombre-Vanteghem, Hélène Zéphir, Marion Donnier-Maréchal, Déclaration d'Invention SATT Nord de France, 15 Mars 2013.

Brevet en préparation

Publications :

Synthesis and pharmacological evaluation of bicyclic derivatives as potent and selective Sigma-1 receptor ligands, **Marion Donnier-Maréchal**, Pascal Carato, Delphine Le Broc, Christophe Furman and Patricia Melnyk, European Journal of Medicinal Chemistry (soumis, EJMC-D-13-01052)

Methodology to access to dihydrodipyridoimidazole, El Bousmaqui M., **Donnier-Maréchal M.**, Melnyk P., Carato P., Heterocycles, 2012, 85 (9), 2135-2145.

Communications orales :

Synthèse et validation de nouveaux ligands de la protéine Sigma-1 pour le traitement de la sclérose en plaques, Séminaire jeunes chercheurs SCF, Lille, 19 Octobre 2012.

Synthesis and validation of new sigma-1 receptor ligands as potential treatment of multiple sclerosis, 4^{ème} Journée scientifique du PRIM, Lille, 29 Juin 2012. Prix de la meilleure communication orale.

Validation de nouveaux ligands de la protéine Sigma-1 pour le traitement de la sclérose en plaques, Journées Scientifiques du Médicament (JSM), Grenoble, 14-15 Juin 2012. Prix de la meilleure communication orale.

Conception, synthèse et évaluation pharmacologique de nouveaux agonistes de la protéine sigma-1, 14^{èmes} Rencontres de Chimie Organique et Biologique (RECOB), Aussois, 18-22 Mars 2012.

Communications par affiches :

M. Donnier-Maréchal, P. Carato, D. Le Broc, C. Furman, P. Melnyk. *Development of potent and selective sigma-1 receptor ligands : new bicyclic derivatives*, 17th RSC / SCI Medicinal Chemistry Cambridge, Cambridge (United Kingdom), 8-11 Juin 2013, (Soumis).

M. Donnier-Maréchal, P. Carato, D. Le Broc, C. Furman, P. Melnyk. *Synthesis and pharmacological evaluation of bicyclic derivatives as potent and selective sigma-1 receptors ligands*, Journées Franco-belges de Pharmacochimie, Lille, 5-7 Juin 2013.

M. Donnier-Maréchal, P. Carato, P. Melnyk. *Sigma-1 receptors: novel bicyclic derivative ligands for the treatment of neurodegenerative diseases*, Journées Jeunes Chercheurs, Paris, 7-8 Février 2013.

M. Donnier-Maréchal, P. Carato, B. Vanteghem-Oxombre, P. Vermersch, P. Melnyk. *Sigma-1 receptor agonist as potential treatment of multiple sclerosis*, 2nd french-roumanian colloquium on medicinal chemistry, Iasi (Roumania), 3-5 Octobre 2012.

M. Donnier-Maréchal, P. Carato, B. Vanteghem-Oxombre, P. Vermersch, P. Melnyk. *Synthèse et évaluation pharmacologique de nouveaux ligands de la protéine sigma-1 pour le traitement de la sclérose en plaques*, Journée André Verbert, Colloque annuel des doctorants, Lille, 11 Septembre 2012.

M. El Bousmaqui, **M. Donnier-Maréchal**, P. Melnyk, P. Carato. *Methodology to access to dihydrodipyridoimidazole*. 3rd International Conference on Heterocyclic Chemistry, Jaipur (India), 10-13 Décembre 2011.

M. Donnier-Maréchal, U. Jacquemard, P. Carato, P. Melnyk. *Design of new selective sigma-1 ligands with various heterocyclic moieties*. 47^{èmes} Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutiques (RICT), Lyon, 6-8 Juillet 2011.

M. Donnier-Maréchal, U. Jacquemard, P. Carato, P. Melnyk. *Modulation of Tic-hydantoin scaffold for the design of selective sigma-1 ligands*. 25^{èmes} Journées Franco-belges de Pharmacochimie, Liège, 19-20 Mai 2011.

Table des matières

Note de confidentialité.....	3
Remerciements.....	4
Publications et communications.....	8
Table des matières.....	10
Table des illustrations.....	15
Liste des abréviations.....	20
INTRODUCTION GENERALE.....	22
CHAPITRE 1 : Des maladies neurodégénératives aux agonistes sigma-1 : quelles perspectives thérapeutiques ?	25
I. Les maladies neurodégénératives.....	26
1. Généralités.....	26
2. Mécanismes impliqués.....	26
2.1 Agrégats protéiques.....	27
2.2 Neuroinflammation.....	31
2.3 Stress oxydant.....	33
2.4 Autres mécanismes.....	36
3. Pathologies et traitements.....	37
3.1 La maladie d'Alzheimer.....	37
3.1.1 Epidémiologie.....	38
3.1.2 Aspects cliniques et diagnostic.....	38
3.1.3 Physiopathologie.....	39
3.1.4 Les traitements.....	43
3.2 La sclérose en plaques.....	45
3.2.1 Epidémiologie.....	45
3.2.2 Aspects cliniques et diagnostic.....	46
3.2.3 Physiopathologie.....	48
3.2.4 Traitements.....	51
II. La protéine sigma.....	56
1. Historique.....	56
2. Sous-type et structure.....	57
2.1 La protéine σ_1	57

2.2	La protéine σ_2	60
3.	Distribution anatomique	60
3.1	Localisation centrale.....	60
3.2	Localisation périphérique	61
3.3	Localisation cellulaire	61
4.	Mode de transduction	61
5.	Ligands endogènes	64
III.	Perspectives thérapeutiques.....	66
1.	Les troubles psychiatriques.....	67
1.1	La schizophrénie.....	67
1.2	La dépression.....	68
2.	La dépendance aux drogues.....	69
3.	Le cancer.....	70
4.	La douleur.....	71
5.	Les troubles neurologiques.....	72
5.1	L'ischémie.....	72
5.2	L'épilepsie.....	73
5.3	L'apprentissage et la mémoire	73
6.	Les maladies neurodégénératives	74
6.1	La maladie d'Alzheimer	75
6.2	La sclérose en plaques.....	76
	BIBLIOGRAPHIE	78
CHAPITRE 2 :	Conception de ligands sigma-1.....	90
1.	Pharmacophores et ligands synthétiques	91
1.1	Pharmacophore de Gilligan.....	91
1.2	Pharmacophore de Glennon et Ablordeppey.....	93
1.3	Pharmacophore 3D.....	94
2.	Les dérivés Tic-hydantoïnes.....	95
2.1	Elaboration d'une structure contrainte	95
2.2	Optimisation par application du modèle de Glennon et Ablordeppey	96
2.3	Relations structure-activité des dérivés Tic-hydantoïnes	98
2.4	Evaluations pharmacologiques.....	99
3.	But du projet	100
	BIBLIOGRAPHIE	102

CHAPITRE 3 : Synthèses de ligands sigma-1 : résultats et discussion	103
1. Famille des dérivés bicycliques	104
1.1 Synthèses des bicycles.....	104
1.2 Synthèse des dérivés de la benzylméthylamine.....	108
1.3 Synthèse des dérivés de l'isoindoline.....	113
1.4 Synthèse des dérivés de la phényléthylamine	115
1.5 Etudes des propriétés biologiques	116
1.5.1 Affinité et sélectivité.....	116
1.5.2 Cytotoxicité.....	119
2. Famille des dérivés tricycliques.....	121
2.1 Synthèse des tricycles.....	121
2.2 Synthèse des dérivés de la benzylméthylamine.....	123
2.3 Synthèse des dérivés de l'isoindoline et de la phényléthylamine.....	127
2.4 Synthèse des dérivés de la pyrrolidine	128
2.5 Etude des propriétés biologiques.....	129
2.5.1 Affinité et sélectivité.....	129
2.5.2 Cytotoxicité.....	131
3. Famille des dérivés monocycliques	135
3.1 Stratégies de synthèse.....	135
3.2 Etude de la stratégie A.....	136
3.3 Etude de la stratégie B.....	138
3.4 Autres modulations.....	139
3.5 Etude des propriétés biologiques.....	142
3.4.1 Affinité et sélectivité.....	142
3.4.2 Cytotoxicité.....	143
4. Conclusion.....	145
BIBLIOGRAPHIE	147
CHAPITRE 4 : Evaluations pharmacologiques	149
1. Activité anti-Alzheimer	150
1.1 Principe de l'étude.....	150
1.2 Résultats et discussion.....	151
2. ADME : études des propriétés physico-chimiques.....	154
2.1 Propriétés en solution aqueuse	154
2.2 Propriétés d'absorption intestinale	155
2.3 Métabolisme	156
3. Etude comportementale : agoniste ou antagoniste ?.....	159

3.1	Test d'alternance spontanée	159
3.2	Test d'évitement passif.....	160
3.3	Plan de l'étude	160
3.4	Résultats et discussion.....	161
4.	Sclérose en plaques.....	163
4.1	Modèle EAE.....	164
4.2	Preuve de concept.....	165
4.3	Plan de l'étude	167
4.4	Résultats et discussion.....	168
BIBLIOGRAPHIE		172
CONCLUSION GENERALE.....		173
PARTIE EXPERIMENTALE.....		177
Abbreviations.....		178
I. Chemical synthesis.....		179
1.	Material and instrumentation.....	179
2.	General procedure.....	179
2.1	Procedure A.....	180
2.2	Procedure B	180
2.3	Procedure C	180
2.4	Procedure D.....	180
2.5	Procedure E	181
2.6	Procedure F	181
3.	Synthesis of bicyclic derivatives	181
3.1	Heterocycles	181
3.2	Benzylmethylamine derivatives	186
3.3	Isoindoline derivatives	196
3.4	Phenylethylamine derivatives.....	201
4.	Synthesis of tricyclic derivatives	203
4.1	Heterocycles	203
4.2	Benzylmethylamine derivatives	205
4.3	Isoindoline derivatives	213
4.4	Phenylethylamine derivatives.....	217
4.5	Pyrrolidine derivatives	221
5.	Synthesis of monocyclic derivatives	223
5.1	Compounds from strategy A	223

5.2 Compounds from strategy B.....	231
5.3 Other modulations	234
II. Pharmacological evaluations	238
1. Binding assay to σ receptors.....	238
2. Cell culture and cytotoxicity assay	238
3. Anti-Alzheimer activity	239
3.1 Cell culture and transfection for testing activity on A β 1–40 and A β 1–42 secretion.....	239
3.2 Quantification of APP-CTF and AICD	239
4. ADME	240
4.1 Aqueous solubility.....	240
4.2 Partition coefficient	240
4.3 Plasma protein binding.....	240
4.4 A-B permeability	241
4.5 Metabolic stability	242
4.6 Kinetic of metabolism.....	242
5. Behavioral tests.....	247
5.1 Experimental design	247
5.2 Animals	248
5.3 Spontaneous alternation performances.....	248
5.4 Step-through passive avoidance test.....	249
6. Multiple sclerosis: EAE model.....	249
6.1 Animals	249
6.2 EAE induction and treatment	249
6.3 Clinical scoring of EAE	250
6.4 Histology	250
BIBLIOGRAPHIE	251

Table des illustrations

Chapitre 1: Des maladies neurodégénératives aux agonistes sigma-1 : quelles perspectives thérapeutiques ?

Figure 1 : Mécanismes impliqués dans la mort neuronale.	27
Figure 2 : Mécanisme d'accumulation des protéines anormales dans les cellules nerveuses.	29
Figure 3 : Agrégats protéiques dans les différentes maladies neurodégénératives.	30
Figure 4 : Mécanisme de l'inflammation associé à la dégénérescence neuronale.	32
Figure 5 : Les différentes espèces réactives de l'oxygène et leur mode de production	34
Figure 6 : Systèmes enzymatiques antioxydants.	35
Figure 7 : Prévalence par âge de la maladie d'Alzheimer à travers les continents et les pays.	38
Figure 8 : Implication de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer.	40
Figure 9 : Les différentes voies de clivage de la protéine APP.	41
Figure 10 : Modes d'interaction possibles entre A β et Tau.	42
Figure 11 : La tacrine : 1 ^{er} inhibiteur de cholinestérase.	43
Figure 12 : Inhibiteurs de cholinestérase actuellement utilisés dans le traitement de la MA.	44
Figure 13 : La mémantine (Axura [®]), seul représentant des antiglutamates	44
Figure 14 : Prévalence de la sclérose en plaques à travers le monde (pour 100 000 habitants).	46
Figure 15 : Les atteintes de la sclérose en plaques.	47
Figure 16 : Evolution possible de la sclérose en plaques.	48
Figure 17 : Attaque immunitaire de la gaine de myéline.	49
Figure 18 : Mécanismes physiopathologiques de la SEP.	50
Figure 19 : Stratégies thérapeutiques utilisées dans la SEP.	51
Figure 20 : Arsenal thérapeutique utilisé dans le traitement des différents symptômes de la SEP.	52
Figure 21 : Anti-inflammatoire stéroïdien utilisé dans le traitement des poussées.	53
Figure 22 : Immunosuppresseurs utilisés dans les formes actives de la SEP.	54
Figure 23 : Site de liaison du ligand SKF 10,047.	56
Figure 24 : Ligands sélectifs des récepteurs σ_1	57
Figure 25 : Structure primaire de la protéine σ_1	58
Figure 26 : Modèles structuraux proposés pour la protéine σ_1	59
Figure 27 : Modèle structural et site de liaison de la protéine σ_1	59
Figure 28 : Micrographies au microscope optique du récepteur σ_1 immunomarcué dans le striatum (A) et le septum (B).	61
Figure 29 : Régulation de l'activité chaperonne par les ligands de la protéine σ_1	62
Figure 30 : Activité chaperonne de la protéine σ_1	63

Figure 31 : Les principaux agonistes et antagonistes σ_1 de types stéroïdes.	64
Figure 32 : Rôle et potentiel thérapeutique de la protéine σ_1	66
Figure 33 : Potentiel agents antipsychotiques possédant des affinités σ_1	68
Figure 34 : Ligands σ_1 possédant des propriétés antidépressives.....	69
Figure 35 : Agonistes σ_1 possédant des propriétés anticancéreuses.	70
Figure 36 : E-52862, antagoniste σ_1 évalué en essais clinique de phase II dans le traitement de la douleur.....	72
Figure 37 : Agonistes σ_1 possédant des propriétés anti-ischémiques.	73
Figure 38 : SA-4503, ligand sélectif σ_1 possédant des propriétés anti-amnésiques.....	74
Figure 39 : Donépézil, agoniste σ_1 utilisé dans le traitement de la MA.	76
Figure 40 : Anavex 2-73, agoniste σ_1 en essais clinique de phase II dans le traitement de la MA.	76
Figure 41 : Ligands σ_1 évalués dans des modèles <i>in vitro</i> pour le traitement de la SEP.....	77
Tableau 1 : Maladies neurodégénératives associées aux protéines impliquées	28

Chapitre 2: Conception de ligands sigma-1

Figure 42 : Ligands sélectifs du site de liaison σ_1	92
Figure 43 : Pharmacophore d'après Gilligan <i>et al.</i>	92
Figure 44 : Modèle pharmacophorique d'après Glennon et Ablordeppey.	93
Figure 45 : Validation du modèle pharmacophorique 3D	94
Figure 46 : Elaboration de la structure contrainte des Tic-hydantoïnes.	95
Figure 47 : Dérivé Tic-hydantoïne A_1 : ligand sélectif de la protéine σ_1	96
Figure 48 : Optimisation du composé A_1 d'après le modèle de Glennon et Ablordeppey.....	96
Figure 49 : Relations structure-activité autour du composé A_5	98
Figure 50 : Identification des métabolites du composé A_5	99
Figure 51 : Pharmacomodulations autour du chef de file.....	100

Tableau 2 : Affinité (IC_{50}), cytotoxicité (CC_{50}) et index de sélectivité (IS) des ligands σ_1 de première génération.	97
--	----

Chapitre 3: Synthèses de ligands sigma-1: résultats et discussion

Figure 52 : Famille des dérivés bicycliques.	104
Figure 53 : Synthèses des benzoxazolinone et benzothiazolinone bromées en position 6.	105
Figure 54 : Synthèse de la 5-bromobenzothiazolinone 9.	105
Figure 55 : Synthèse de la 6-bromobenzothiazinone 12.	105
Figure 56 : Synthèse de la 6-bromobenzoxazinone 16.....	106

Figure 57 : Synthèse de la benzoxazolinone 18 par carbonylation catalytique.....	106
Figure 58 : Synthèse de la 5-bromobenzoxazolinone 20 par carbonylation catalytique.....	107
Figure 59 : Mécanisme réactionnel de carbonylation catalytique au Sélénium.	107
Figure 60 : Synthèse de la 5-bromobenzoxazolinone 20.....	108
Figure 61 : Synthèse de la 1-méthylbenzimidazolinone 25.....	108
Figure 62 : Synthèse des composés finaux bicycliques avec la chaîne <i>N</i> -benzyl- <i>N</i> -méthylpropylamine.....	109
Figure 63 : Mécanisme de formation des deux isomères de position du composé 40.	110
Figure 64 : Synthèse du dérivé benzimidazole 41.....	111
Figure 65 : Analyses RMN (¹ H et NOESY) réalisées sur le mélange 42.....	111
Figure 66 : Spectre RMN ¹ H de la matière première et données théoriques.....	112
Figure 67 : Synthèse des dérivés de la benzimidazolinone 44 et 45.	112
Figure 68 : Deuxième stratégie de synthèse pour le dérivé benzimidazolinone 44	113
Figure 69 : Synthèse des composés finaux bicycliques avec la chaîne propylisoindoline.....	114
Figure 70 : Synthèse des composés finaux bicycliques avec la chaîne <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -phényléthylpropylamine.....	115
Figure 71 : Relations structure-activité de la famille des dérivés bicycliques.	118
Figure 72 : Famille des dérivés tricycliques : deux modes de liaison.....	121
Figure 73 : Synthèse des dérivés tricycliques 66 et 67.....	122
Figure 74 : Synthèse de la 1-phényl-β-carboline 69.....	122
Figure 75 : Synthèse de la γ-carboline 72.	123
Figure 76 : Synthèse de la 1,2,3,4-tétrahydrobenzofuro[3,2- <i>c</i>]pyridine 76.	123
Figure 77 : Synthèse des composés finaux tricycliques avec la chaîne <i>N</i> -benzyl- <i>N</i> -méthylpropylamine.....	124
Figure 78 : Etude HPLC des conditions expérimentales de la substitution nucléophile dans différents milieux.....	125
Figure 79 : Synthèse du dérivé 88 : substitution nucléophile sur l'atome d'azote indolique de la γ-carboline.....	126
Figure 80 : Synthèse des dérivés phénothiazine et phénoxazine.....	126
Figure 81 : Synthèse des composés finaux tricycliques avec les chaînes propylisoindoline (91 à 96) et <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -phényléthylpropylamine (97 à 102).	127
Figure 82 : Synthèse des composés finaux tricycliques avec la chaîne propylpyrrolidine.	129
Figure 83 : Relations structure-activité de la famille des dérivés tricycliques.....	131
Figure 84 : Famille des dérivés monocycliques.....	135
Figure 85 : Schéma rétro-synthétique des stratégies A et B.....	136
Figure 86 : Synthèses de la <i>N</i> -benzyl- <i>N</i> -méthylpropane-1,3-diamine dihydrochloride 113.....	137
Figure 87 : Synthèse du <i>N</i> -[3-(<i>N</i> -benzyl- <i>N</i> -méthylamino)propyl]-4-chlorobenzamide 115.....	137

Figure 88 : Synthèse des dérivés du benzamide 122 à 127 par amidification.....	138
Figure 89 : Synthèse des dérivés chlorobenzamide avec une chaîne latérale cyclique.....	138
Figure 90 : Synthèse des dérivés rétro-amides 141 et 142.	139
Figure 91 : Synthèse du dérivé sulfonamide 144.	140
Figure 92 : Synthèse du composé di-méthylé : formation de l'ammonium quaternaire 145.	140
Figure 93 : Seconde stratégie de synthèse du composé di-méthylé 147.	140
Figure 94 : Synthèse du dérivé chlorobenzamide avec la chaîne propylisoindoline.....	141
Tableau 3 : Conditions expérimentales et rendements de synthèses des composés finaux bicycliques avec la chaîne <i>N</i> -benzyl- <i>N</i> -méthylpropylamine.	109
Tableau 4 : Conditions expérimentales et rendements de synthèses des composés finaux bicycliques avec la chaîne propylisoindoline.	114
Tableau 5 : Conditions expérimentales et rendements de synthèses des composés finaux bicycliques avec la chaîne <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -phényléthylpropylamine.....	116
Tableau 6 : Constantes d'affinité, de sélectivité et IC ₅₀ (SY5Y) pour les dérivés bicycliques.	120
Tableau 7 : Conditions expérimentales et rendements de synthèses des composés finaux tricycliques avec la chaîne <i>N</i> -benzyl- <i>N</i> -méthylpropylamine.	124
Tableau 8 : Conditions expérimentales et rendements de synthèses des composés finaux tricycliques avec les chaînes propylisoindoline (91 à 96) et <i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -phényléthylpropylamine (97 à 102).....	127
Tableau 9 : Rendements de synthèse pour les dérivés tricycliques avec la chaîne propyl pyrrolidine.	129
Tableau 10 : Constante d'affinité σ_1 et IC ₅₀ (SY5Y) pour les dérivés tricycliques.....	133
Tableau 11 : Constante d'affinité σ_1 et IC ₅₀ (SY5Y) pour les dérivés monocycliques.	145
Tableau 12 : Propriétés biologiques des meilleurs composés (A ₅ , 38, 79, 80 et 115).	146

Chapitre 4: Evaluations pharmacologiques

Figure 95 : Représentation de différentes voies de clivage de l'APP.	151
Figure 96 : Chloroquine : composé de référence utilisé dans l'évaluation de l'activité anti-Alzheimer.	151
Figure 97 : Impact du composé Tic-hydantoïne A ₅ sur la production de fragments CTF α , AICD, A β ₄₀ et A β ₄₂	152
Figure 98 : Impact des composés 38, 79, 80 et 115 sur la production de fragments CTF α , AICD, A β ₄₀ et A β ₄₂	153
Figure 99 : Cinétique de métabolisation du composé 115.	158
Figure 100 : Labyrinthe en forme de Y utilisé pour le test d'alternance spontanée.....	160
Figure 101 : Boîte à deux compartiments utilisée pour le test d'évitement passif.....	160

Figure 102 : Déroulement de l'étude comportementale.....	161
Figure 103 : Effets des composés 38, 79 et 115 sur les déficits d'apprentissage induit par la dizocilpine : test d'alternance spontanée.....	161
Figure 104 : Effets des composés 38, 79 et 115 sur les déficits d'apprentissage induit par la dizocilpine : test d'évitement passif.....	162
Figure 105 : Validation des effets anti-amnésiques du composé 115 par l'action de l'antagoniste de référence NE-100.....	163
Figure 106 : Réduction de l'EAE chez la souris par administration du composé A ₅	165
Figure 107 : Réduction de l'incidence de l'EAE chez la souris par administration du composé A ₅	166
Figure 108 : Réduction de l'infiltration cellulaire et de la démyélinisation chez la souris EAE par administration du composé A ₅	167
Figure 109 : Déroulement de l'étude EAE.....	168
Figure 110 : Réduction de l'EAE chez la souris par administration du composé 115.....	169
Figure 111 : Incidence de l'EAE chez la souris après administration du composé 115.....	170
Tableau 13 : Etude des propriétés en solution aqueuse.....	155
Tableau 14 : Etude des propriétés d'absorption intestinale.....	156
Tableau 15 : Etude de la stabilité métabolique.....	157
Tableau 16 : Propriétés de métabolisation du composé 115 chez l'homme et chez la souris.....	158
Tableau 17 : Effets du composé A ₅ sur le développement de l'EAE.....	166
Tableau 18 : Effets du composé 115 sur le développement de l'EAE.....	170

Liste des abréviations

Certaines dénominations sont données sous leurs formes anglo-saxonnes.

Aβ	Beta-Amyloïde
AICD	APP IntraCellular Domain
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
APP	Amyloïde Protein Precursor
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BPT	Bordetella Pertussic Toxine
CFA	Adjuvant Complet de Freund
CI	Clairance
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentant l' Antigène
CPP	Conditionnement Préférentiel de Place
DMF	Diméthylformamide
DNF	Dégénérescence NeuroFibrillaire
EAE	Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène (<i>ROS en anglais</i>)
GA	Acétate de Glatiramère
GSH	Glutathion forme réduite
GSSH	Glutathion forme oxydée
H&E	Hemalum and eosin
Hsp	Heat Shock Protein
IC₅₀	Concentration d'inhibition à 50%
IFN	Interférons
<i>i.p.</i>	Intra-péritonéale
IP₃	Inositol triphosphate
IS	Index de sélectivité : ratio IC ₅₀ (SY5Y) / K _i (σ_1)
K_i	Constante d'inhibition
k_{m_{étab}}	Constante de métabolisation
LFB	Luxol Fast Blue
LT	Lymphocyte T
MA	Maladie d'Alzheimer
MAM	Mitochondrion-Associated ER Membrane

MBP	Myelin Basic Protein
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
MP	Maladie de Parkinson
MNDs	Maladies neurodégénératives
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
OACM	Occlusion de l' Artère Cérébrale Moyenne
PCP	Phencyclidine
P_{HPLC}	Pureté HPLC
PLP	Protéine protéolipidique
PS	Plaques Séniles
Quant	Quantitatif
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RE	Réticulum Endoplasmique
RR-MS	Forme rémittente (<i>Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis</i>)
RSA	Relations Structure-Activité
SBDL	Sterol Binding Domain-Like
SEP	Sclérose En Plaques
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SNC	Système Nerveux Central
SOD	SuperOxyde Dismutase
SP-MS	Forme secondairement progressive (<i>Secondary Progressive Multiple sclerosis</i>)
t_{1/2}	Temps de demi-vie

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies neurodégénératives (MNDs) sont les troubles neurologiques les plus fréquents chez l'homme et affectent des millions de personnes à travers le monde. Bien que les caractéristiques cliniques varient en fonction des maladies, de nombreux mécanismes à l'origine de la mort neuronale semblent communs aux différentes MNDs. En effet, depuis quelques années, un intérêt tout particulier est porté sur des phénomènes inflammatoires, d'accumulation de protéines anormales ou encore de stress oxydant présents dans un grand nombre de MNDs telles que la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques ou encore la maladie de Parkinson. Pourtant, en dépit des avancées majeures dans la compréhension de ces processus pathologiques, aucun traitement curatif ou qui puisse stopper l'évolution des maladies n'existe à l'heure actuelle.

Avec l'évolution démographique de la société et le vieillissement de la population observés dans les pays développés, l'ampleur des MNDs ne cessera d'augmenter au cours des prochaines décennies. En effet, le nombre de personnes touchées par ces troubles neurologiques augmente de manière inévitable avec l'accroissement de l'espérance de vie. Ces maladies contribuent de façon considérable au handicap et à l'altération de la qualité de vie des malades et de leur entourage. La maladie d'Alzheimer, suivie par la maladie de Parkinson et la sclérose en plaques sont les maladies neurodégénératives les plus répandues. Bien qu'affectant un nombre plus restreint d'individus, la maladie de Charcot et la chorée de Huntington n'en reste pas moins dévastatrices.

Aujourd'hui avec plus de 35,6 millions de cas pour la maladie d'Alzheimer et 2,5 millions de cas pour la sclérose en plaques à travers le monde, ces maladies représentent un enjeu majeur de santé publique.

Les récepteurs σ_1 correspondent à une classe unique de récepteurs transmembranaires du réticulum endoplasmique. Exprimés dans le système nerveux central et plus particulièrement dans les neurones et les oligodendrocytes, ces récepteurs sont connus pour être impliqués dans la régulation de nombreux neurotransmetteurs. Initialement considérée comme une protéine énigmatique, la protéine σ_1 est maintenant reconnue comme une protéine chaperonne dont l'activité est régulée par des ligands. Depuis sa découverte, elle a été impliquée dans diverses pathologies et notamment dans des troubles neurologiques. Ainsi, les ligands σ_1 présenteraient des effets dans plusieurs domaines thérapeutiques tels que les troubles mnésiques, l'addiction aux drogues, l'épilepsie, l'anxiété, la sclérose en plaques ou encore la douleur. Certains ligands σ_1 ont montré des propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices élevées. Plusieurs composés ont fait l'objet d'études cliniques mais aucun ligand sélectif de ces récepteurs n'a jusqu'ici été commercialisé.

Par conséquent, il existe un intérêt particulier à valider de nouveaux ligands des récepteurs σ_1 afin de développer de nouvelles thérapeutiques pour les maladies neurodégénératives, notamment pour la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques. Le projet de thèse qui m'a été proposé s'inscrit donc

dans ce contexte. Il a pour objectif de concevoir, de synthétiser et d'évaluer de nouveaux ligands de la protéine σ_1 pour une utilisation en neuroprotection.

Le premier chapitre de ce manuscrit, divisé en trois parties, résumera les données bibliographiques concernant les MNDs et la protéine σ_1 . Dans un premier temps, il traitera des différents mécanismes impliqués dans la mort neuronale et apportera une description des deux pathologies d'intérêt : la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques. Les deux autres parties traiteront de la protéine σ_1 et de son rôle en tant que cible thérapeutique.

Le reste de ce manuscrit présentera les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse. Après avoir fait un état de l'art sur la conception de ligands σ_1 dans le chapitre 2, la synthèse et les évaluations pharmacologiques des composés prometteurs seront exposées dans les chapitres 3 et 4.

CHAPITRE 1 :
Des maladies neurodégénératives aux agonistes sigma-1 :
quelles perspectives thérapeutiques ?

I. Les maladies neurodégénératives

1. Généralités

Les maladies neurodégénératives (MNDs) constituent un groupe de pathologies qui affectent le fonctionnement du cerveau et plus généralement le système nerveux de façon progressive au cours de leur évolution. Elles sont caractérisées par une mort prématurée des cellules nerveuses spécifiques.¹ On distingue les maladies touchant le système nerveux central (SNC) de celles atteignant le système nerveux périphérique, voire le système nerveux autonome. Ainsi, en fonction des structures cérébrales atteintes, les troubles peuvent affecter le langage, la perception, la cognition, la motricité et la mémoire. Parmi ces maladies, on trouve entre autre la maladie d'Alzheimer (MA), l'épilepsie, la maladie de Parkinson (MP), la sclérose latérale amyotrophique (SLA) plus couramment appelée maladie de Charcot, la sclérose en plaques (SEP) et la Chorée de Huntington.

Pour certaines de ces maladies, des facteurs génétiques ont été mis en cause (formes héréditaires), mais la plupart surviennent de manière isolée (formes sporadiques), ce qui n'exclut pas l'implication de facteurs génétiques. Leurs étiologies et leurs mécanismes physiopathologiques sont très variables et très certainement plurifactoriels allant de l'anomalie génétique aux facteurs environnementaux. Des facteurs de vulnérabilité individuels seraient également impliqués.² De plus, l'âge serait un facteur capital. Même si certaines de ces maladies surviennent quelquefois au cours du développement chez l'enfant ou le jeune adulte comme l'épilepsie et la SEP, la majorité des cas se rencontre après 65 ans. En effet, les MNDs touchent environ 5% de la population à partir de 65 ans et au moins 30 % des personnes âgées de plus de 85 ans.³

Enfin, ces maladies contribuent de façon considérable au handicap et à l'altération de la qualité de vie des malades et de leur entourage. Dans la plupart des cas, il n'existe pas de prévention, ni de traitement curatif ou qui puisse stopper l'évolution de la maladie.

2. Mécanismes impliqués

Les mécanismes impliqués dans la mort neuronale chez les patients atteints de MNDs sont complexes, multiples et encore imparfaitement connus. Ils peuvent être différents et multiples pour une même maladie. Toutefois, depuis quelques années, de nombreuses études pointent vers quelques éléments clairement identifiés comme susceptibles d'intervenir, à un niveau ou un autre, comme acteurs de la cascade d'évènements aboutissant à la mort neuronale.⁴ En effet, un certain nombre de mécanismes communs ont émergé dans diverses maladies neurodégénératives telles que la SEP, la MP

¹ M. B. Graeber *et al.*, *Brain Pathol.*, **2002**, 12, 385-390

² D. B. Teplow, *Molecular biology of neurodegenerative diseases*, Elsevier, **2012**

³ V. Ibanez, *Med. Nucl.*, **2005**, 29, 213-219

⁴ O. Hardiman, *Neurodegenerative disorders: a clinical guide*, Springer London Ltd, **2011**

ou la MA. Ces mécanismes impliquent l'accumulation intra et/ou extra cellulaire de protéines anormales, la participation de phénomènes inflammatoires ou encore la production de radicaux libres cyto et neurotoxiques. Tous ces processus forment un cercle vicieux et sont capables d'induire la mort neuronale chez des patients atteints de MNDs (Figure 1). En effet, les protéines anormales sont généralement éliminées par les protéasomes. Une diminution de l'activité des protéasomes par présence de stress oxydant entraîne une accumulation de protéines altérées. Cette accumulation sera alors à l'origine d'une réponse inflammatoire et de la production de nouvelles espèces oxydantes. Ces espèces oxydantes vont à leur tour induire une réponse inflammatoire et diminuer l'activité des protéasomes... A chaque étape du processus, de sérieux dommages sont infligés aux cellules neuronales.

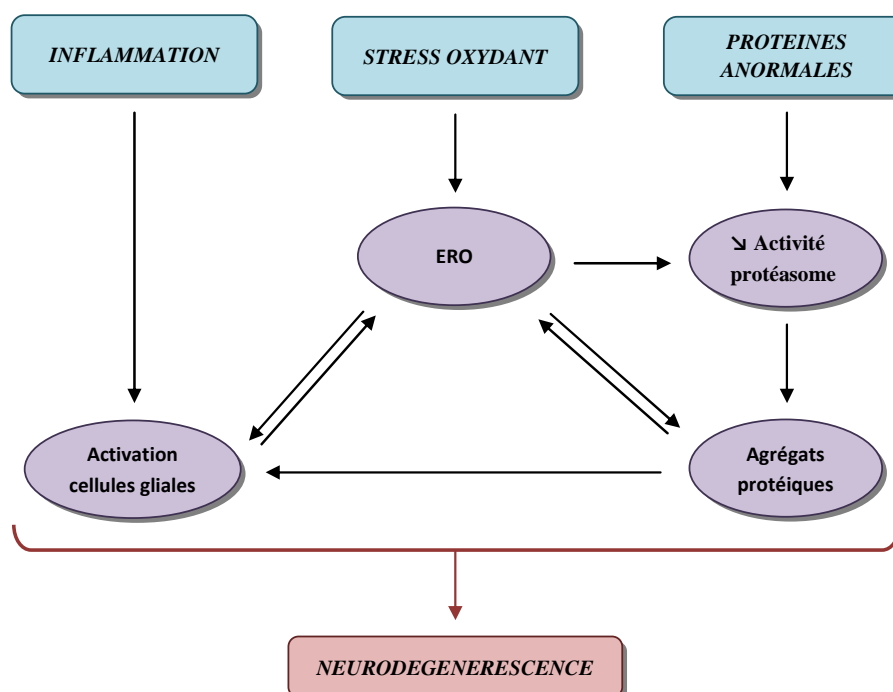


Figure 1 : Mécanismes impliqués dans la mort neuronale.

2.1 Agrégats protéiques

Une des caractéristiques communes aux différentes MNDs est l'existence dans le système nerveux d'agrégats fibrillaires de protéines « mal repliées », constituant des dépôts amyloïdes (ou plaques amyloïdes) dans les cellules nerveuses ou dans les espaces extracellulaires. Alors que les protéines impliquées diffèrent par leur structure et leur fonction, les structures des agrégats sont très similaires, avec une conformation en feuillets β qui leur confère un caractère d'insolubilité.⁵ Pour chaque pathologie, une ou plusieurs protéines peuvent être impliquées (Tableau 1).

⁵ C. M. Dobson, *Nature*, 2003, 426, 884-890

Tableau 1 : Maladies neurodégénératives associées aux protéines impliquées.⁴

MNDs	Protéines impliquées	Lieu de dépôt
Maladie d'Alzheimer	A β	Extracellulaire (plaques amyloïdes)
	Tau	Intracellulaire (filaments hélicoïdaux appariés)
Maladie de Parkinson	α -sinucléine	Intracellulaire (corps de Lewy)
Maladie de Charcot	Ubiquitine TDP43	Inclusions cytoplasmiques
Maladie de Huntington	Huntingtine	Noyau et inclusions cytoplasmiques

Le mécanisme par lequel la production de protéines aux structures altérées entraîne la maladie est de plus en plus caractérisé et implique non seulement une perte de fonctions physiologiques vitales mais aussi l'acquisition de propriétés toxiques. Ces protéines anormales sont produites par un processus de repliement incorrect qui conduit à la formation d'une protéine possédant une conformation différente de celle de la protéine native.⁶ Ce mauvais repliement des protéines peut avoir lieu pour plusieurs raisons telles que :

- Une mutation dans la séquence du gène conduisant à une protéine incapable d'adopter la conformation de la protéine native ;
- Des erreurs sur le processus de transcription conduisant à la production de protéines modifiées qui ne peuvent pas se plier correctement ;
- Des modifications structurelles produites par des facteurs environnementaux.

Ces protéines anormales possèdent plus de propension à s'agréger et sont donc graduellement converties en oligomères puis en fibrilles insolubles par un mécanisme auto-catalytique. Des études ont montré que ces polymères filamenteux possédaient une structure en feuillets β stabilisée par la présence de liaisons hydrogène entre les chaînes peptidiques (Figure 2).⁵ La mise en place de modèle d'agrégation *in vitro* a permis de mettre en évidence une concentration critique à partir de laquelle le phénomène d'agrégation débute.⁷ Les interactions défavorables entre les monomères déterminent une phase lente, appelée phase de latence au cours de laquelle les oligomères sont formés. Dans une seconde phase, ces oligomères vont jouer le rôle de germes et permettre ainsi la croissance rapide des polymères jusqu'à l'obtention des fibrilles insolubles.^{8,9}

En général, les agrégats protéiques ne s'accumulent pas dans un système nerveux sain et non stressé. En effet, les cellules ont mis en place un système sophistiqué de contrôle-qualité qui les

⁶ I. Moreno-Gonzalez *et al.*, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **2011**, 22, 482-487

⁷ C. Soto *et al.*, *Arch. Neurol.*, **2008**, 65, 184-189

⁸ C. Soto *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, **2006**, 31, 150-155

⁹ J. T. Jarrett *et al.*, *Cell*, **1993**, 73, 1055-1058

protège contre l'accumulation des protéines aberrantes (Figure 2).¹⁰ Des chaperons moléculaires tels que les « heat shock protein » (Hsp) permettent d'aider au bon repliement des polypeptides ayant une structure altérée.¹¹ Quand les chaperons moléculaires sont dans l'incapacité de réparer la structure aberrante, les protéines sont taguées *via* l'addition de chaînes polyubiquitinés afin d'être dégradées par les protéasomes. Enfin, les protéines anormales sont également prises en charge par le système phagosome-lysosome qui permet leur clairance et prévient ainsi leur agrégation.

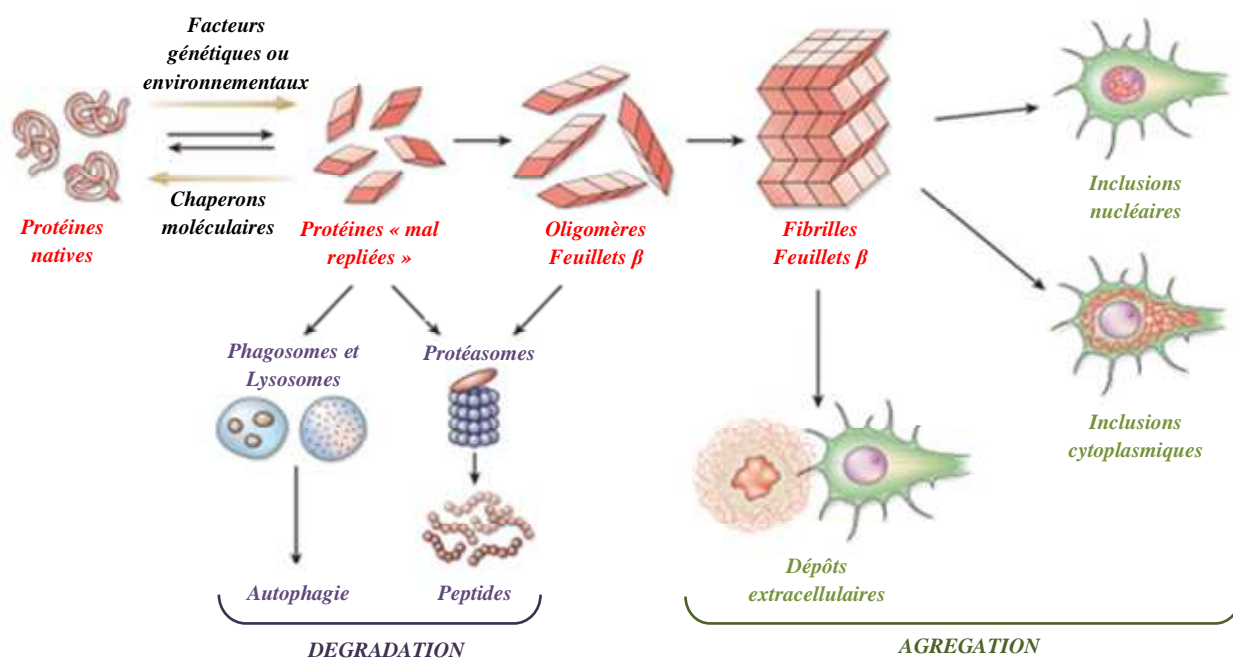


Figure 2 : Mécanisme d'accumulation des protéines anormales dans les cellules nerveuses.^{12, 13}

Toutefois, la capacité des cellules à activer le système de contrôle-qualité des protéines est fortement réduite avec l'âge. En effet, des études ont montré une diminution de l'activité protéasome et de l'efficacité des chaperons moléculaires dans des cellules âgées.¹⁴ Ainsi, les cellules peuvent avoir des difficultés à maintenir la conformation des protéines natives et à éliminer les protéines altérées. Or, si l'efficacité de ces mécanismes de protection est diminuée, la probabilité de déclencher la maladie est alors augmentée. Dans des conditions pathologiques, les différents systèmes de surveillance sont dépassés, ce qui aboutit à l'accroissement de la concentration des protéines anormales et par conséquent à une accumulation plus importante que chez des sujets sains.

Les protéines altérées présentes chez des patients atteints de MNDs, existent sous forme d'un ensemble hétérogène de polymères de tailles différentes qui sont habituellement classés en grandes

¹⁰ T. Nakamura *et al.*, *Apoptosis*, **2009**, 14, 455-468

¹¹ F. U. Hartl *et al.*, *Science*, **2002**, 295, 1852-1858

¹² L. M. Shaw *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2007**, 6, 295-303

¹³ M. S. Forman *et al.*, *Nat. Med.*, **2004**, 10, 1055-1063

¹⁴ A. Naeem *et al.*, *Cell Biochem. Biophys.*, **2011**, 61, 237-250

catégories dont les oligomères, les protofibrilles et les fibrilles.^{15,16} Les oligomères sont de petits assemblages de protéines altérées qui sont présents dans la fraction soluble de tampon extrait de tissus et comprennent des structures de taille allant de dimères à 24-mères.^{16, 17} Des résultats provenant de plusieurs études indépendantes de différentes protéines semblent indiquer les oligomères comme les espèces les plus toxiques dans le mécanisme d'agrégation.¹⁵⁻¹⁷ En effet, des oligomères synthétiques mais également naturels sont capables d'induire l'apoptose dans des cultures cellulaires à des concentrations très faibles^{18,19} et de nuire à la plasticité synaptique et à la mémoire chez l'animal.^{20,21} Les protofibrilles également toxiques sont des agrégats plus grands (d = 4-11 nm, L < 200 nm) dont la taille augmente en fonction du temps et de la concentration en protéines altérées. Enfin les fibrilles possèdent des structures longues et non ramifiées d'environ 10 nm de diamètre et plusieurs µm de longueur.²² Les fibrilles sont aussi capables d'induire une toxicité dans des cultures cellulaires mais à des concentrations beaucoup plus élevées que les oligomères et les protofibrilles.¹⁵

Enfin, le lieu de dépôt des agrégats protéiques varie en fonction des maladies (Figure 3). Il peut s'agir soit de dépôt intracellulaire comme les corps de Lewy dans la MP soit de dépôt extracellulaire comme les plaques séniles dans la MA. Les dépôts intracellulaires peuvent également être de deux types : cytoplasmiques ou nucléaires. Dans tous les cas, ces agrégats protéiques sont impliqués dans le phénomène de dégénérescence neuronale.

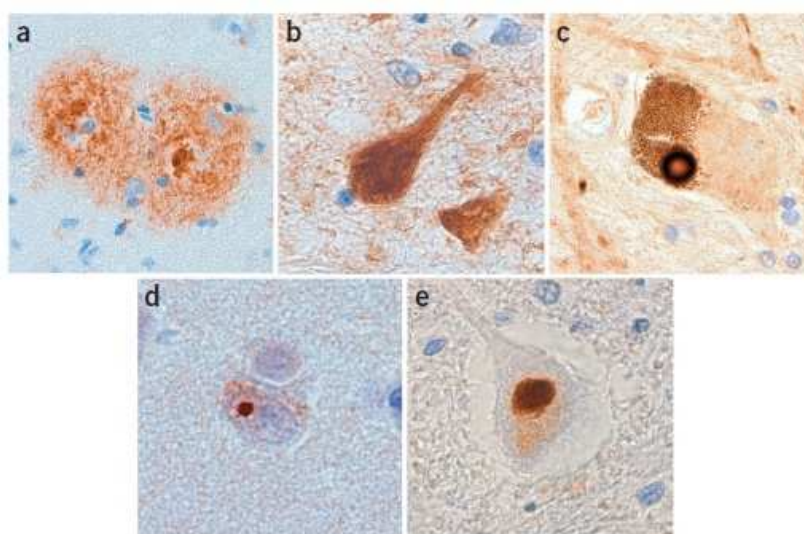


Figure 3 : Agrégats protéiques dans les différentes maladies neurodégénératives. (a) Plaques séniles extracellulaires dans la MA. (b) Dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires dans la MA. (c) Corps de Lewy dans la MP. (d) Inclusion nucléaire de polyglutamine dans la maladie de Huntington. (e) Inclusion cytoplasmique d'ubiquitine dans la SLA.¹³

¹⁵ B. Caughey *et al.*, *Annu. Rev. Neurosci.*, **2003**, 31, 267-298

¹⁶ C. G. Glabe, *Neurobiol. aging*, **2006**, 27, 570-575

¹⁷ D. M. Walsh *et al.*, *J. Neurochem.*, **2007**, 101, 1172-1184

¹⁸ A. Demuro *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 17294-17300

¹⁹ M. Bucciantini *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 31374-31382

²⁰ J. P. Cleary *et al.*, *Nat. Neurosci.*, **2005**, 8, 79-84

²¹ G. M. Shankar *et al.*, *Nat. Med.*, **2008**, 14, 837-842

²² R. Nelson *et al.*, *Nature*, **2005**, 435, 773-778

2.2 Neuroinflammation

La neuroinflammation est une forme particulière d'inflammation touchant le système nerveux central, cerveau et moelle épinière, ainsi que le système nerveux périphérique. Il s'agit d'un mécanisme de défense ayant pour but de protéger le système nerveux contre les infections et les lésions. Dans la plupart des cas, elle constitue un processus bénéfique qui cesse une fois la menace éliminée et l'homéostasie restaurée.²³ Cependant, il a été démontré que ce processus pouvait être à l'origine d'un dysfonctionnement ou d'une perte neuronale chez des patients atteints de MNDs.²⁴

D'un point de vue immunitaire, le cerveau est traditionnellement considéré comme un organe privilégié en raison de sa séparation avec le système sanguin périphérique. Cette séparation est possible grâce à la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), une structure membranaire capable de restreindre le passage des cellules et de nombreuses substances du sang vers le cerveau.²⁵ Toutefois, un grand nombre de MNDs sont caractérisées non seulement par une inflammation locale provenant des cellules gliales résidant au niveau du cerveau, mais aussi par une infiltration de leucocytes périphériques.²⁶ Bien que l'infiltration de cellules immunitaires périphériques puisse être toxique pour les neurones²⁷, l'infiltration de leucocytes n'est pas toujours responsable d'une neurotoxicité^{28,29} indiquant donc un rôle important des cellules gliales dans la réponse inflammatoire associée à la neurodégénérescence.

La neuroinflammation est caractérisée principalement par l'activation des cellules gliales et plus particulièrement des microglies. Ces dernières constituent les composants principaux de la réponse immunitaire intrinsèque dans le SNC. Elles représentent environ 15 % de l'ensemble des cellules résidant dans le cerveau et correspondent à un type cellulaire unique se différenciant des autres cellules gliales et des neurones par leur morphologie.³⁰ Dans des conditions physiologiques normales, les microglies sont présentes dans un état de repos (structure ramifiée) qui est associé à la production de facteurs neurotrophiques et anti-inflammatoires.³¹ Sensibles aux plus petites perturbations, elles s'activent facilement en présence de pathogènes (débris, agrégats protéiques...) ou de lésions tissulaires. Une fois activée, les microglies montrent une série de changements que ce soit dans leur structure, leur nombre (augmentation de la prolifération) et leur fonction (phagocytose et production de molécules bioactives). Ainsi activées elles sont capables de produire et sécréter une variété de médiateurs inflammatoires tels que des cytokines, des chemokines, des radicaux libres et des protéases.^{23,26} Ces médiateurs inflammatoires peuvent non seulement moduler l'action immunitaire et

²³ C. K. Glass *et al.*, *Cell*, **2010**, 140, 918-934

²⁴ S. Amor *et al.*, *Immunology*, **2010**, 129, 154-169

²⁵ M. J. Carson *et al.*, *Immunol. Rev.*, **2006**, 213, 48-65

²⁶ M. L. Block *et al.*, *Progress Neurobiol.*, **2005**, 76, 77-98

²⁷ S. Freude *et al.*, *J. Virol.*, **2002**, 76, 12223-12232

²⁸ K. Boztug *et al.*, *J. Immunol.*, **2002**, 169, 1505-1515

²⁹ M. J. Trifilo *et al.*, *J. Neurovirol.*, **2003**, 9, 315-324

³⁰ G. W. Kreutzberg, *Trends Neurosc.*, **1996**, 19, 312-318

³¹ W. J. Streit, *Glia*, **2002**, 40, 133-139

initier la réparation tissulaire mais aussi agir sur les neurones en altérant leur fonction.³² En effet, si cette réponse microgliale est non contrôlée ou prolongée, ces agents inflammatoires contribuent à l'élaboration d'un cycle neurotoxique auto-entretenu qui implique l'activation de plus de microglies, la sécrétion de plus de médiateurs inflammatoires et par conséquent la perte de neurones environnants (Figure 4). En raison de leur incapacité à se diviser et à récupérer d'une blessure, les neurones sont extrêmement vulnérables aux processus immunitaires et inflammatoires.

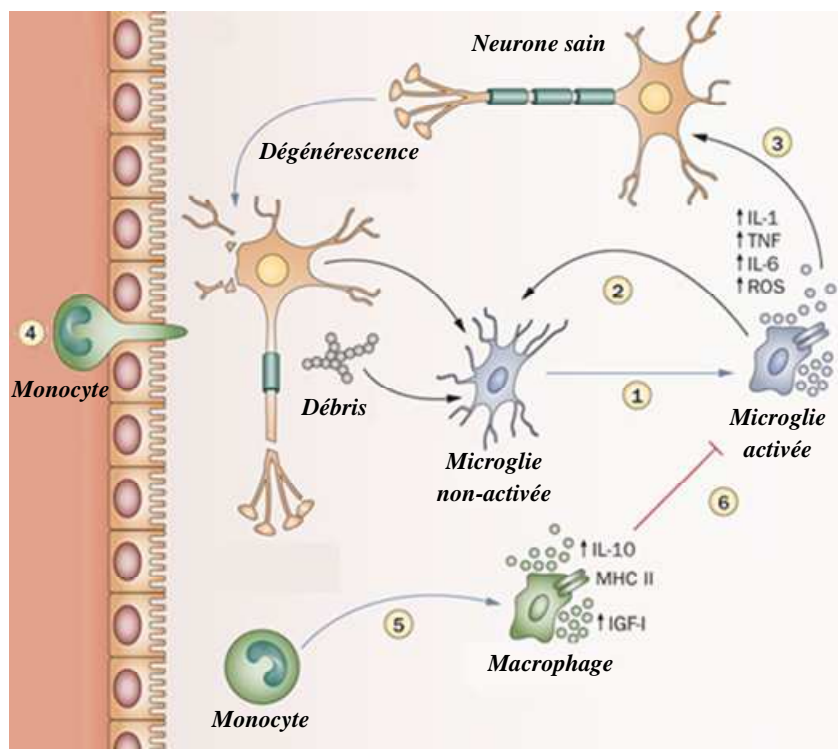


Figure 4 : Mécanisme de l'inflammation associée à la dégénérescence neuronale.³³ Les flèches noires mettent en évidence les relations entre cellules tandis que les flèches bleues indiquent les conversions cellulaires. 1) Activation de la microglie en présence de débris ou agrégats protéiques. 2) Phagocytose des débris et sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1, TNF α , IL-6) et des espèces réactives de l'oxygène (ROS). 3) Perte de neurones environnants lors d'une réponse non contrôlée. 4) Infiltration de monocyte afin de contrôler la réaction inflammatoire locale. 5) Différenciation des monocytes en macrophages qui vont englober les débris et sécréter des facteurs de croissance et des cytokines anti-inflammatoires. 6) Désactivation des microglies.

Dans des conditions physiologiques normales, cette réponse microgliale est contrôlée par de nombreux mécanismes de contact entre les neurones et les cellules gliales tels que la voie CD200R-CD200 ou encore l'activité électrique neuronale.³⁴ La présence de certains neurotransmetteurs et interleukines permet également de désactiver les microglies et de stopper la réaction inflammatoire.³⁵ En effet, lorsqu'il devient essentiel de contrôler l'inflammation locale, l'assistance du système immunitaire systémique est réclamée (Figure 4). Des monocytes infiltrent alors la BHE et se

³² H.-M. Gao *et al.*, *Trends Immunol.*, **2008**, 29, 357-365

³³ M. Schwartz *et al.*, *Nat. Rev. Neurol.*, **2010**, 6, 405-410

³⁴ R. M. Ransohoff *et al.*, *Nature*, **2010**, 468, 253-262

³⁵ R. Wei *et al.*, *J. Neuroimmuno.*, **1999**, 95, 8-18

différencient localement en macrophages. Ces derniers vont permettre non seulement l'élimination des débris ou agrégats protéiques responsables de la réaction inflammatoire mais également la désactivation des cellules gliales par sécrétion de cytokine anti-inflammatoire (IL-10).³³

Malgré la mise en place de ces mécanismes de régulation, il a été démontré qu'une réponse inflammatoire aberrante jouait un rôle important dans de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la MA ou la MP. Cette fonction destructive des microglies activées semble résulter d'une sénescence microgliale.³⁶ En effet, le vieillissement des cellules gliales entraîne des anomalies dans la fonction mais aussi un défaut de réponse inflammatoire. La première caractéristique identifiée de cette sénescence microgliale est l'altération morphologique décrite comme dystrophie.³⁷ Les microglies dystrophiques possèdent des anomalies dans leur structure telles qu'une absence de ramification, une atrophie ou encore une fragmentation.³⁸ Ces différents changements seraient à l'origine de modifications fonctionnelles des cellules gliales et par conséquent à l'origine d'une réponse inflammatoire aberrante.³⁹ De plus, de nombreuses études ont montré que ces modifications fonctionnelles seraient également dues à des facteurs extrinsèques tels que des neurotransmetteurs, un stress oxydant, des hormones ou encore des facteurs pathologiques présents dans le microenvironnement des microglies.³⁶ Parmi ces facteurs pathologiques, les agrégats protéiques ont largement été impliqués puisqu'ils semblent accélérer la sénescence microgliale.

Ainsi, en d'autres mots, la sénescence microgliale couplée à des facteurs extrinsèques serait responsable des altérations fonctionnelles et de la réponse dérégulée des microglies et par conséquent entraînerait la perte neuronale chez des patients atteints de MNDs.

2.3 Stress oxydant

Les besoins en oxygène des différents tissus dépendent de leurs besoins métaboliques. Les neurones et les astrocytes, les deux types cellulaires majeurs du système nerveux central, sont largement responsables de la consommation massive du cerveau en oxygène et en glucose. En effet, le cerveau humain ne représente que 2% du poids total du corps et est pourtant responsable de plus de 20% de la consommation globale en oxygène.⁴⁰

L'oxygène est un élément essentiel pour la vie en général et pour l'exercice des fonctions de tout organisme eucaryote en particulier. Son rôle dans la survie est étroitement lié à son potentiel rédox qui fait de cet élément un excellent agent oxydant capable d'accepter facilement des électrons provenant de substrats réduits. Mais ces propriétés sont également responsables de dommages oxydatifs aboutissant à une neurotoxicité. En effet, les formes partiellement réduites de l'oxygène sont

³⁶ X. G. Luo *et al.*, *Mol. Neurodegener.*, **2010**, 5, 12-20

³⁷ W. J. Streit, *Trends Neurosc.*, **2006**, 29, 506-510

³⁸ W. J. Streit *et al.*, *Glia*, **2004**, 45, 208-212

³⁹ A. Sierra *et al.*, *Glia*, **2007**, 55, 412-424

⁴⁰ B. Halliwell, *J. Neurochem.*, **2006**, 97, 1634-1658

hautement réactives puisque les radicaux libres sont des espèces très instables qui acceptent ou donnent facilement des électrons.⁴⁰ Il existe de nombreuses variétés d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont l'ion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (HO°) ou encore l'oxyde nitrique (NO°) et l'ion peroxynitrite ($ONOO^-$) (Figure 5).⁴¹ Toutes ces espèces actives sont capables d'interagir avec les composants cellulaires tels que les protéines, les lipides et l'ADN. Ces interactions peuvent être à l'origine de nombreux changements dans les fonctions des cellules et ainsi provoquer la mort cellulaire.⁴²

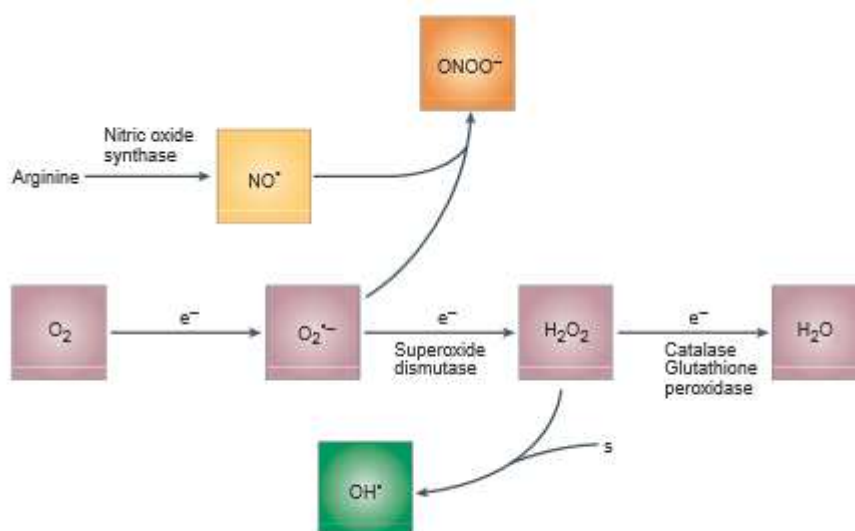


Figure 5 : Les différentes espèces réactives de l'oxygène et leur mode de production.⁴¹

Il existe de nombreuses voies par lesquelles un organisme peut être exposé aux effets des espèces réactives de l'oxygène. Les radicaux libres sont produits par de multiples processus chimiques que ce soit au sein même de l'organisme ou à l'extérieur. En effet, dans des tissus sains, la principale source de radicaux libres est la mitochondrie. Cette organelle est responsable de 90% de la consommation cellulaire en oxygène et le métabolisme de ce dernier est à l'origine des ERO. Les enzymes peuvent également générer des espèces réactives au cours de leurs cycles catalytiques. Enfin, des facteurs environnementaux dont la pollution de l'air comme l'ozone, la fumée de cigarette, les pesticides, les solvants, les hydrocarbures aromatiques sont également des sources d'ERO.⁴³ Ces agents polluants sont soit constitués de radicaux libres, soient transformés en espèces réactives grâce au métabolisme cellulaire et au processus de détoxification. Des études ont montré que la pollution à l'ozone causait d'importants dégâts sur la santé humaine.⁴⁴ Ce gaz permet de produire des ERO dans l'organisme,

⁴¹ J. K. Andersen, *Nat. Rev. Neurosci.*, **2004**, 8, 18-25

⁴² W. Dröge, *Physiol. Rev.*, **2002**, 82, 47-95

⁴³ S. Rivas-Arancibia *et al.*, Chapter 3: Oxidative stress and neurodégénérative disease. In *Neurodegenerative diseases - Process, Prevention, Protection and Monitoring*, **2011**

⁴⁴ D. I. Cretu *et al.*, *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **2010**, 51, 701-706

causant ainsi une augmentation d'espèces oxydantes et par conséquent un stress oxydant qui contribue au développement des maladies neurodégénératives.^{43,45}

En présence de ces différentes espèces, l'organisme a développé des mécanismes afin de se protéger. Les antioxydants sont des substances biologiques capables d'entrer en compétition avec les substrats oxydables (protéines, ADN, lipides...) permettant ainsi d'inhiber l'oxydation et d'éliminer les ERO.⁴⁶ Les systèmes antioxydants peuvent être divisés en deux catégories : les enzymatiques et les non enzymatiques.⁴⁷ Parmi les systèmes enzymatiques, la superoxyde dismutase (SOD) va convertir l'ion superoxyde $O_2^{\circ-}$ en oxygène et en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ce dernier est pris en charge par les catalases ou la glutathion peroxydase pour être transformé en eau (Figure 6).⁴⁸ Les systèmes non enzymatiques sont composés essentiellement de vitamines A, E et C, de protéines et d'acides aminés, des agents réducteurs capables de donner un électron pour oxyder des espèces tels que les radicaux libres et ainsi inhiber leur potentiel destructeur. Ces systèmes sont beaucoup moins réactifs que les systèmes enzymatiques mais sont présents en plus grandes concentrations.

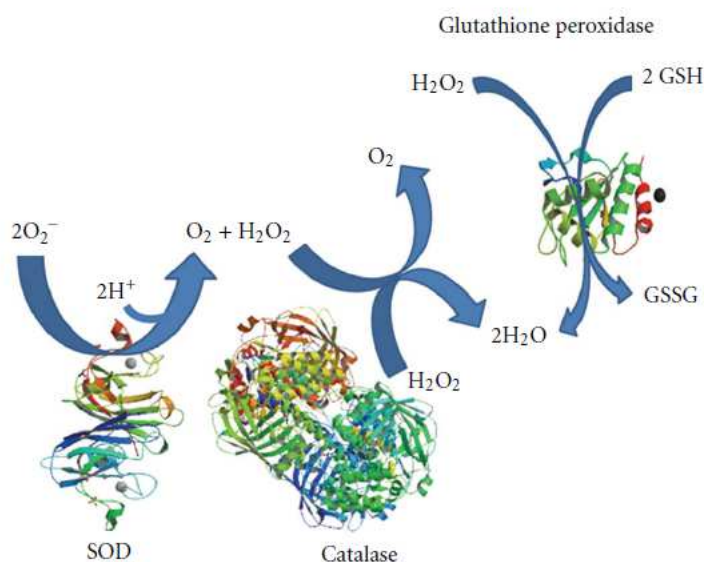


Figure 6 : Systèmes enzymatiques antioxydants.⁴⁸

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre la production d'ERO et le niveau d'antioxydants présent dans l'organisme.⁴⁹ Ce déséquilibre est caractérisé par une concentration importante d'espèces réactives de l'oxygène qui peut être causé par une production excessive d'espèces oxydantes ou au contraire par un déficit en système antioxydant. Un taux de stress oxydant trop important peut être à l'origine de dommages cellulaires irréversibles comme des nécroses ou des

⁴⁵ D. Schwela, *Rev. Environ. Health*, **2000**, 15, 13-42

⁴⁶ B. Halliwell *et al.*, *Lancet*, **1984**, 323, 1396-1397

⁴⁷ A. Somogyi *et al.*, *Physiol. Meas.*, **2007**, 28, 41-55

⁴⁸ A. Melo *et al.*, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2011**, 2011, 1-14

⁴⁹ S. Gandhi *et al.*, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2012**, 2012, 1-11

déficits en ATP et allant même dans certain cas jusqu'à provoquer l'apoptose des cellules.⁵⁰ Or le système nerveux central est très vulnérable aux dommages oxydatifs. En effet, bien que le cerveau ait un grand besoin d'oxygène, il est relativement déficient en systèmes enzymatiques permettant la métabolisation des ERO.⁵¹ Bien au contraire, il est enrichi en acides gras polyinsaturés (constituants membranaires des neurones) qui s'oxydent facilement en présence de radicaux libres.⁵² De plus, la présence de la BHE permettant la protection du cerveau, empêche les systèmes non enzymatiques comme la vitamine E de pénétrer. Ces deux facteurs réunis font des cellules neuronales, des cibles susceptibles d'être endommagées plus facilement par les ERO que toutes autres cellules de l'organisme. Enfin, des études ont montré qu'une exposition aigue ou prolongée à des espèces oxydantes provoque des altérations dans la plasticité neuronale qui se manifestent par un déficit dans le processus d'apprentissage, de mémoire et dans l'activité motrice.⁵³ Une exposition à des doses faibles mais sur une longue période entraîne également une dégénérescence neuronale progressive.⁵⁴

Avec l'âge, le stress oxydant au niveau du cerveau augmente et les cellules neuronales pourraient être particulièrement endommagées. Par ailleurs, les capacités cellulaires à répondre aux dommages oxydatifs infligés aux protéines diminuent également avec l'âge, aboutissant ainsi à une augmentation de l'accumulation de protéines altérées.⁴¹ L'association de ces deux phénomènes dans des conditions pathologiques, entraînerait une neurodégénérescence.

Finalement, même si le stress oxydant a été impliqué dans les différentes maladies neurodégénératives telles que la MA, la MP et SLA depuis de nombreuses années, il n'a pas encore établi s'il s'agissait de l'élément déclencheur des pathologies ou seulement d'une conséquence.

2.4 Autres mécanismes

Bien que l'ensemble des mécanismes décrits précédemment soit largement impliqués dans la cascade d'événements aboutissant à la mort neuronale, ce ne sont cependant pas les seuls. En effet, depuis quelques années, un intérêt croissant a été observé pour des mécanismes de second ordre impliquant notamment la mitochondrie et le réticulum endoplasmique.

En tant qu'organelle indispensable à la survie des cellules par son implication dans l'apport en énergie, dans la modulation de l'homéostasie du calcium et des radicaux libres, et dans l'apoptose, la mitochondrie joue un rôle essentiel dans les cellules eucaryotes y compris les neurones. Ainsi, le système nerveux central dépend de l'efficacité des fonctions mitochondriales. Il n'est donc pas surprenant qu'un défaut de ces fonctions soit impliqué dans le processus de neurodégénérescence.⁵⁵ De plus, le vieillissement physiologique ainsi que les maladies liées à l'âge sont de plus en plus souvent

⁵⁰ M. F. Beal, *An. Neurol.*, **2005**, 58, 495-505

⁵¹ A. Nunomura *et al.*, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2006**, 2006, 1-6

⁵² G. Perry *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.*, **2002**, 33, 1475-1479

⁵³ C. Dorado-Martinez *et al.*, *Int. J. Neurosci.*, **2001**, 108, 149-161

⁵⁴ N. Pereyra-Muñoz *et al.*, *J. Chem. Neuroanat.*, **2006**, 31, 114-123

⁵⁵ A. Federico *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, **2012**, 322, 254-262

associés à une diminution d'efficacité des mitochondries.⁵⁶ Les dysfonctionnements majeurs impliqués dans les MNDs comprennent les mutations de l'ADN mitochondrial, une faible production d'ATP, l'altération de l'homéostasie calcique, un stress oxydant important et un défaut dans la perméabilité membranaire de cette organelle. L'ensemble de ces anomalies est impliqué dans l'apoptose des cellules.⁵⁷

Le réticulum endoplasmique (RE) orchestre les différents processus par lesquels les protéines sont synthétisées, correctement repliées, modifiées et transportées vers leur destination finale.⁵⁸ Des perturbations dans la fonction ou une perte d'intégrité du RE entraînent un stress de celui-ci qui contribue à la mort neuronale.⁵⁹ De nombreux facteurs peuvent conduire à un dysfonctionnement du RE tels que l'âge, des anomalies génétiques ou encore dans des conditions pathologiques, l'accumulation d'agrégats protéiques et des perturbations de l'homéostasie calcique.^{59,60} Même si les mécanismes sont encore imparfaitement connus, il est de plus en plus admis qu'un stress du réticulum endoplasmique soit impliqué dans les processus pathologiques des différentes MNDs.

3. Pathologies et traitements

Même si les processus pathologiques sont de plus en plus caractérisés, il n'existe aucun traitement curatif ou qui puisse stopper l'évolution des MNDs. La maladie d'Alzheimer, suivie par la maladie de Parkinson et la sclérose en plaques sont les maladies neurodégénératives les plus répandues. Bien qu'affectant un nombre plus restreint d'individus, la maladie de Charcot et la chorée de Huntington n'en restent pas moins dévastatrices. Dans ce projet, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la MA et à la SEP, deux MNDs qui représentent en enjeu majeur de santé publique.

3.1 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) a été décrite pour la première fois en 1906 par Aloïs Alzheimer.⁶¹ Ce neuro-pathologiste allemand avait reporté le cas d'une femme de 51 ans présentant un délire de jalousie suivi d'une désintégration des fonctions intellectuelles.⁶² Ce n'est que quelques années plus tard que l'appellation « maladie d'Alzheimer » a été donnée à un type de démence survenant chez un sujet relativement jeune.⁶³

Aujourd'hui, selon une définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, la démence se caractérise par une altération progressive de la mémoire et des autres capacités cognitives, apparue

⁵⁶ M. Karbowski *et al.*, *Act. Neuropathol.*, **2012**, 123, 157-171

⁵⁷ H. Du *et al.*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2010**, 42, 560-572

⁵⁸ W. Paschen *et al.*, *J. Neurochem.*, **2001**, 79, 719-725

⁵⁹ D. Lindholm *et al.*, *Cell Death Differ.*, **2006**, 13, 385-392

⁶⁰ R. V. Rao *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2004**, 16, 653-662

⁶¹ M.-F. Chesselet, *Molecular mechanism of neurodegenerative disease*, Humana Press, **2001**

⁶² K. Maurer *et al.*, *Lancet*, **1997**, 349, 1546-1549

⁶³ J. Touchon *et al.*, *La maladie d'Alzheimer*, Elsevier Masson, **2004**

depuis au moins six mois et suffisamment marquée pour handicaper les activités de la vie quotidienne.^{63,64} Il existe différents types de démences caractérisés par des symptômes et des anomalies cérébrales bien distincts.

3.1.1 Epidémiologie

En 2010, le nombre de personnes atteintes de démences était estimé à 35,6 millions dans le monde. Il est prévu que ce chiffre double tous les 20 ans, passant à 65,7 millions en 2030 et à 115,4 millions d'ici 2050. La MA est la forme la plus répandue de démence avec environ 25 millions de personnes atteintes.⁶⁵

La prévalence de la maladie à l'échelle mondiale a été estimée à 4,7% pour les personnes âgées de plus de 60 ans et l'incidence est chiffrée à 19,4‰ personnes en Europe.^{65,66} De plus, l'affection touche plus de femmes que d'hommes puisqu'au-delà de 75 ans, les proportions sont de 13,2% pour les hommes contre 20,5% pour les femmes.

Enfin, une disparité géographique est observée avec des taux légèrement moins élevés dans les pays en développement qu'en Europe ou en Amérique du Nord. Une inversion de cette tendance est prévue au cours des 30 prochaines années. En effet, il est estimé qu'en 2050, plus de sept personnes sur dix souffrant de la MA ou de maladie apparentée vivront dans des pays en développement.⁶⁵

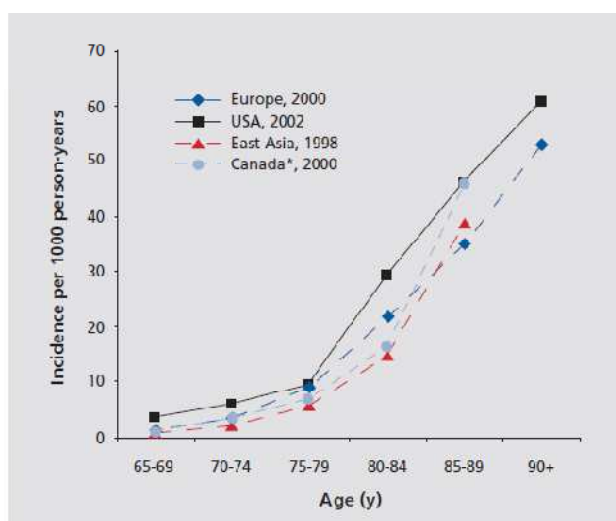


Figure 7 : Prévalence par âge de la maladie d'Alzheimer à travers les continents et les pays.⁶⁶

3.1.2 Aspects cliniques et diagnostic

La maladie d'Alzheimer n'est diagnostiquée en France que chez 50% des personnes atteintes. Elle débute d'une manière générale par des troubles de la mémoire et des difficultés d'apprentissage puis évolue vers des problèmes d'équilibre et de la marche. Cette évolution s'accompagne fréquemment de

⁶⁴ Alzheimer's Disease Research, American Health Assistance Foundation. <http://www.ahaf.org>

⁶⁵ *World Alzheimer Report 2010*; 2010.

⁶⁶ C. Qiu *et al.*, *Dialogues Clin. Neurosci.*, 2009, 11, 111-128

complications non cognitives comme des symptômes psychologiques et comportementaux. Ainsi, le désordre clinique observé chez les patients est variable mais se caractérise, toutefois, par 3 phases aboutissant généralement au décès. La progression de la maladie étant lente, il est souvent difficile de reconnaître la transition d'une phase à l'autre.^{67,68}

La **phase initiale** révèle des troubles mnésiques souvent imputés au vieillissement et donc rarement remarqués par l'entourage. Différentes études ont montré qu'il pouvait exister un délai de 3 ans en moyenne entre l'apparition des premiers symptômes et le moment du diagnostic.⁶⁹ Ces troubles de la mémoire sont accompagnés d'ordinaire par des problèmes de communication comme trouver le mot juste ou suivre une conversation, et par des légers problèmes de coordination.

Au cours de la **phase intermédiaire**, on constate une aggravation des pertes de mémoire et une détérioration plus importante des capacités mentales et physiques. Le patient n'est plus capable de reconnaître les membres de son entourage (amis et famille). Il en oublie progressivement son passé et perd l'orientation dans le temps et l'espace. A cela s'ajoute l'apparition d'états dépressifs, anxieux et des sautes d'humeur. Les capacités physiques sont également amoindries ce qui conduit peu à peu à une perte d'autonomie.

Enfin, dans la **phase avancée**, le malade n'est plus en mesure de se souvenir, de communiquer, ou de prendre soin de lui. Il a perdu toute autonomie. L'évolution irrémédiable de la maladie le conduit vers un état grabataire. Par ailleurs, sa fragilité l'expose à de nombreuses infections. Cette phase se termine par le décès de la personne suite à des complications secondaires (infections ou pneumonie).

3.1.3 Physiopathologie

L'étude du processus pathologique de la maladie montre qu'elle résulte de mécanismes complexes. L'affection est caractérisée par la présence de deux lésions principales dans le cerveau : les dégénérescences neurofibrillaires neuronales (DNF) contenant une protéine Tau anormalement phosphorylée et les plaques séniles extracellulaires (PS) comprenant des agrégats de peptide β -amyloïde.⁶³ Les neurones touchés se situent principalement dans l'hippocampe et le néocortex, deux zones impliquées dans le processus d'apprentissage et de mémoire. A ces anomalies s'associent une baisse de la densité synaptique et une perte neuronale conduisant à des déficits biochimiques.

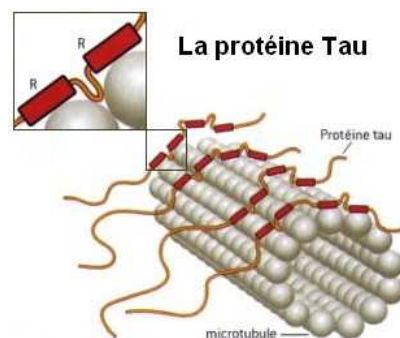
La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) correspond à une accumulation intraneuronale de fibrilles de protéine Tau hyperphosphorylée. Cette protéine anormalement phosphorylée ne peut plus assurer son rôle physiologique de polymérisation/dépolymérisation et de stabilisation des microtubules.

⁶⁷ M. Soto *et al.*, *La Presse Médicale*, **2007**, 36, 1491-1499

⁶⁸ D. Knopman *et al.*, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **2000**, 48, 300-304

⁶⁹ S. Freds *et al.*, *J. Gerontol.*, **1992**, 47, 177-182

Les microtubules sont des filaments du cytosquelette constitués de plusieurs protofilaments de tubuline. Ils servent à transporter l'ensemble des nutriments et autres éléments essentiels à la survie des neurones. La protéine Tau interagit avec les microtubules *via* des domaines de liaisons spécifiques afin d'assurer l'assemblage et la stabilité des filaments.⁷⁰ L'interaction protéine Tau/tubuline est régulée par le stade de phosphorylation de Tau.



En effet, la protéine Tau est une phosphoprotéine qui contient normalement 1-3 moles de phosphates par mole de protéine. Suivant les sites et le nombre de phosphorylation, les microtubules se stabilisent ou au contraire dépolymérisent assurant ainsi un équilibre dynamique.⁷¹ Dans des conditions pathologiques, cet équilibre est affecté par la présence sur la protéine de 3 à 4 fois plus de groupements phosphates. Ce phénomène peut être attribué soit à l'activité accrue des kinases assurant la phosphorylation, soit à la diminution de celle des phosphatases, qui ont l'effet inverse.^{70,72} Les protéines anormalement phosphorylées ne se lient plus aux microtubules mais s'agrègent entre elles. Ce phénomène perturbe fortement le transport axonal et conduit à la mort neuronale (Figure 8).

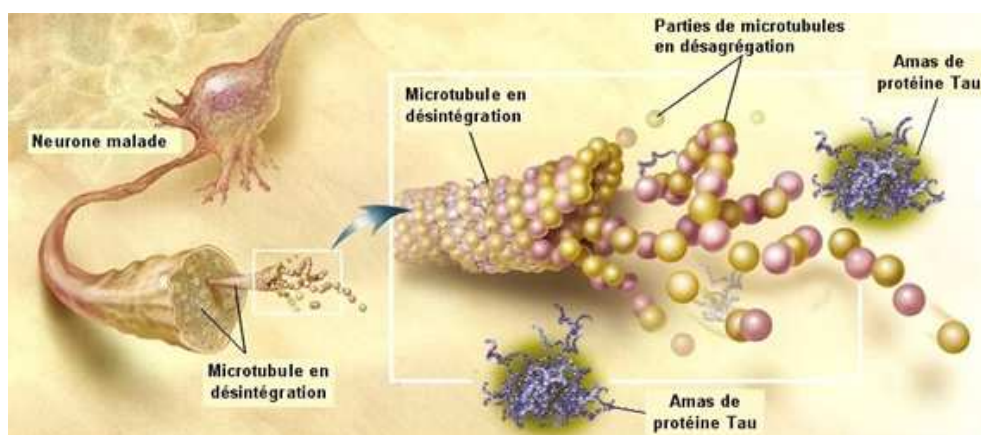


Figure 8 : Implication de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer.

Les plaques séniles (PS) résultent de l'agrégation extracellulaire de peptides A β , un métabolite de l'APP. L'Amyloïd Protein Precursor ou APP est une protéine transmembranaire de 695 à 770 acides aminés, localisée principalement au niveau de la synapse des neurones.⁷³ Ses fonctions au sein du système nerveux ne sont pas encore bien connues. Toutefois, il a été établi qu'elle intervenait dans la

⁷⁰ B. L. Goode *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, **1997**, 8, 353-365

⁷¹ L. Buée *et al.*, *Psychol. neuropsychiatr. Vieil.*, **2006**, 4, 1-12

⁷² M. Takeda *et al.*, *Molecular neurobiology of Alzheimer disease and related disorder*, Karger Publishers, **2004**

⁷³ D. Dawbarn *et al.*, *Neurobiology of Alzheimer's Disease*, Oxford University Press, **2007**

croissance et la survie des cellules neuronales, ainsi que dans la plasticité neuronale et la réparation des synapses après lésions.^{74,75}

L'APP peut être métabolisée selon deux voies grâce à l'intervention de sécrétases (Figure 9). La première voie, non amyloïdogénique, résulte de l'action de la α -sécrétase et libère un peptide aux propriétés neurotrophiques : le sAPP α . La seconde voie, amyloïdogénique, est responsable de la libération du peptide A β après l'intervention des β - (BACE) puis γ -sécrétases. La γ -sécrétase conditionne la nature du peptide A β constitué alors de 38 à 43 acides aminés.^{75,76,77} Il existe deux formes prédominantes de ce peptide correspondant à des résidus de 40 ou de 42 acides aminés (A β ₄₀/A β ₄₂). Le peptide A β ₄₂ est beaucoup plus hydrophobe, et possède donc plus de propension à s'agréger que la forme A β ₄₀.

Par nature, la voie amyloïdogénique n'est pas pathogène mais c'est son dérèglement qui conduit à la pathologie. Ce dérèglement peut se traduire par une surproduction du peptide A β ₄₂ ou une modification des proportions A β ₄₀/ A β ₄₂. Dans des conditions normales, la forme A β ₄₀ représente une proportion importante (supérieure à 90%) de l'A β total produit par les cellules, alors que la forme A β ₄₂ ne représente qu'une fraction mineure (moins de 5%).⁷⁸ Dans tous les cas, ce dérèglement serait responsable de l'agrégation du peptide qui constitue les plaques séniles.

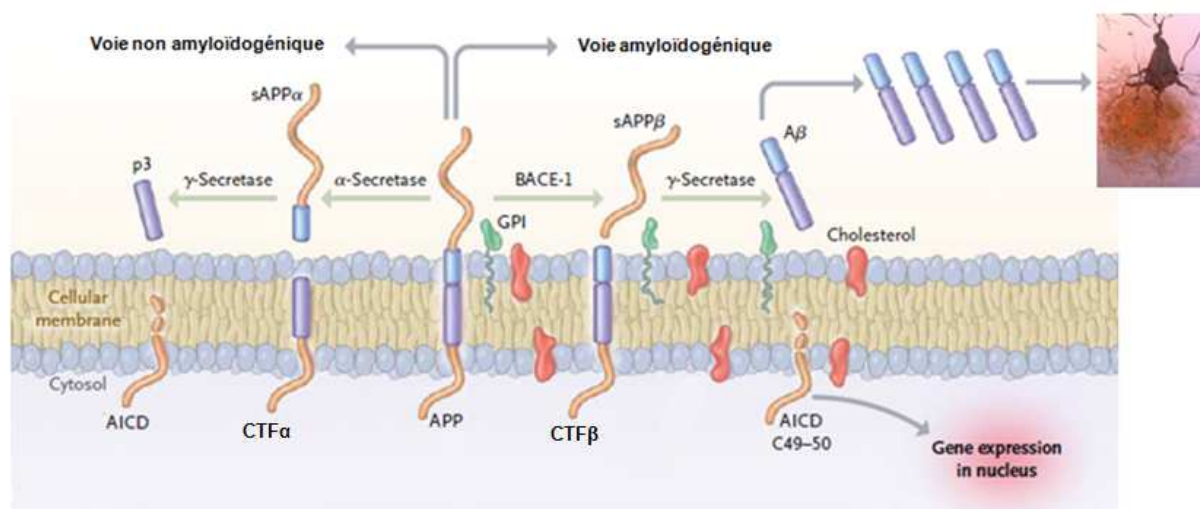


Figure 9 : Les différentes voies de clivage de la protéine APP.⁷⁹

Il semblerait que la partie postsynaptique des synapses soit la cible principale des plaques séniles. Plusieurs récepteurs postsynaptiques seraient alors impliqués et parmi eux le récepteur au glutamate NMDA. L'excitotoxicité qui en résulterait, c'est-à-dire l'hyperexcitation des récepteurs NMDA, serait

⁷⁴ F. Checler, *J. Neurochem.*, **1995**, 65, 1431-1444

⁷⁵ S. S. Sisodia *et al.*, *FASEB J.*, **1995**, 9, 366-370

⁷⁶ F. Checler *et al.*, *Méd. Sci.*, **2002**, 18, 717-724

⁷⁷ D. Burdick *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 546-546

⁷⁸ S. Gandy, *J. Clin. Invest.*, **2005**, 115, 1121-1129

⁷⁹ H. W. Querfurth *et al.*, *New Eng. J. Med.*, **2010**, 362, 329-344

à l'origine de la mort neuronale.⁸⁰ Enfin, les PS envahissent notamment les aires corticales associatives. Ce sont sans doute ces atteintes qui conditionnent l'apparition des premiers symptômes, en général des plaintes mnésiques.

Bien que le peptide A β et la protéine Tau aient été largement étudiés individuellement en ce qui concerne surtout leur mode de toxicité, ce n'est que très récemment que leurs possibles interactions et les effets de synergie dans la maladie d'Alzheimer ont été mis en évidence (Figure 10).⁸⁰

Tout d'abord, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* montrent que le peptide A β induit la pathologie Tau. Ainsi, la formation de peptide A β chez des souris transgéniques APP conduit à une hyperphosphorylation de la protéine Tau tandis que des souris transgéniques Tau ne manifestent aucune pathologie A β .⁸¹ De plus, une immunisation contre le peptide A β chez des souris triples transgéniques qui présentent à la fois des plaques séniles et une dégénérescence neurofibrillaire, entraîne aussi bien une réduction des dépôts amyloïdes extracellulaires qu'une diminution du taux de protéine Tau hyper-phosphorylée.⁸²

Il a ensuite été démontré que la protéine Tau amplifiait la toxicité du peptide A β . En effet, des études ont montré que les neurones déficients en protéines Tau sont protégés de la toxicité induite par le peptide A β .⁸³ Par conséquent, la toxicité neuronale du peptide dépendrait de façon critique de la présence de la protéine Tau.

Enfin, il existerait une synergie de leurs effets toxiques. La protéine Tau et le peptide A β agiraient chacun sur des organites différents ce qui amplifierait leurs effets toxiques. Par exemple, au niveau mitochondrial, le peptide A β atteint préférentiellement le complexe IV de la chaîne respiratoire tandis que la protéine Tau bloque le complexe I. Cela conduirait à une détérioration amplifiée des fonctions mitochondriales.⁸⁴

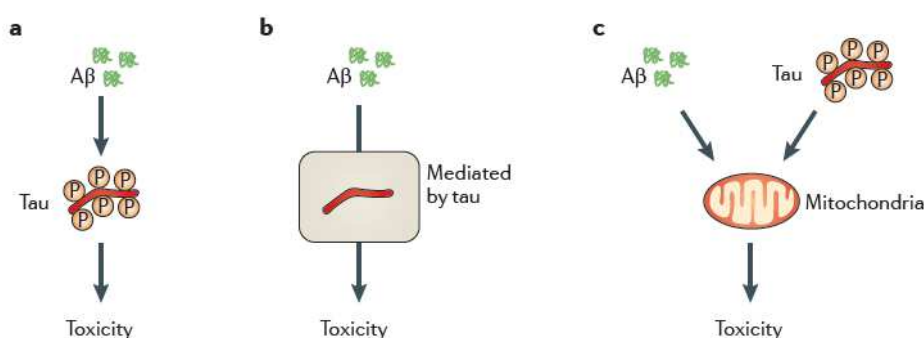


Figure 10 : Modes d'interaction possibles entre A β et Tau. **a)** A β entraîne l'hyper-phosphorylation de la protéine Tau. **b)** Tau amplifie la toxicité de A β . **c)** A β et Tau agissent en synergie.

⁸⁰ L. M. Ittner *et al.*, *Nature Rev. Neurosci.*, **2010**, 12, 67-72

⁸¹ J. Gotz *et al.*, *Mol. Psy.*, **2004**, 9, 664-683

⁸² S. Oddo *et al.*, *Neuron.*, **2004**, 43, 321-332

⁸³ M. Rapoport *et al.*, *Proceedings Nat. Acad. Sci.*, **2002**, 99, 6364-6369

⁸⁴ V. Rhein *et al.*, *Proceedings Nat. Acad. Sci.*, **2009**, 106, 20057-20062

Pour finir, en parallèle de l'apparition des PS et de DNF, on peut observer d'autres modifications cérébrales comme l'altération des microvaisseaux et une concentration importante de cellules gliales et microgliales qui participent à la réaction inflammatoire présente autour des plaques séniles. Il a également été montré que les lésions cérébrales de la MA s'accompagnaient de perturbations des différents systèmes de neurotransmission. En effet, l'altération de la neurotransmission cholinergique constitue la principale voie impliquée dans la physiopathologie des troubles cognitifs et non cognitifs de la maladie. L'hypothèse cholinergique résulte de l'observation d'une diminution d'acétylcholine dans les tissus cérébraux de patients atteints de MA. Cette diminution serait corrélée à un déclin cognitif et à certains désordres non cognitifs existant chez les malades.⁸⁵

3.1.4 Les traitements

Bien qu'il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la maladie ou qui puisse stopper son évolution, certains médicaments sont prescrits pour atténuer les pertes de mémoire ainsi que les problèmes de raisonnement et de langage. Toutefois, les traitements ne sont pas efficaces sur l'ensemble des patients et surtout leurs effets ne durent qu'un certain temps. Ainsi, il existe une nécessité certaine de trouver de nouveaux traitements.

La mise en place de **traitements médicamenteux** contre la MA remonte à une vingtaine d'années. La première molécule, la tacrine (Figure 11) a été mise sur le marché en 1994. Bien qu'ayant prouvé son efficacité en tant qu'inhibiteur de cholinestérase, elle n'est plus commercialisée depuis 2004 en raison de sa toxicité avérée pour le foie.

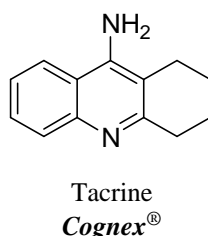


Figure 11 : La tacrine : 1^{er} inhibiteur de cholinestérase.

Depuis, des médicaments de deuxième génération ont été développés. Il existe actuellement quatre molécules sur le marché appartenant à deux familles différentes : les anticholinestérasiques et les antiglutamates. Toutes sont utilisées dans les traitements symptomatiques de la maladie.

Les anticholinestérasiques sont indiqués dans les formes légères à modérément sévères.⁸⁶ Ils permettent d'augmenter le taux d'acétylcholine dans le cerveau, neurotransmetteur qui joue un rôle dans le processus de mémoire et d'apprentissage. Ils ont ainsi prouvé leur efficacité dans les domaines

⁸⁵ P. T. Francis *et al.*, *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, **1999**, 66, 137-147

⁸⁶ C. M. VanDenBerg *et al.*, *Drugs & Aging*, **2000**, 16, 123-138

de la cognition. Cette famille regroupe trois molécules différentes mais de même efficacité : le donépézil, la galantamine et la rivastigmine (Figure 12).^{87,88,89} Ils présentent toutefois des effets indésirables fréquents au niveau digestif (nausées, perte d'appétit, diarrhée).

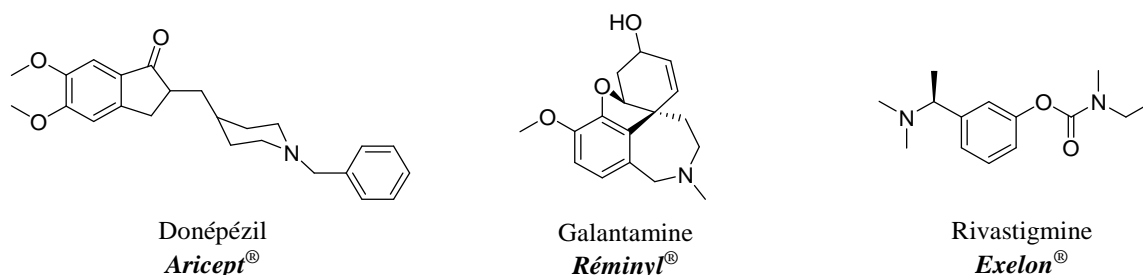


Figure 12 : Inhibiteurs de cholinestérase actuellement utilisés dans le traitement de la MA.

La classe thérapeutique des antiglutamates ne contient à ce jour qu'une seule molécule : la mémantine (Figure 13). Cet antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA est indiqué chez les patients plus avancés, des stades modérément sévères à sévères de la maladie.⁹⁰ Elle permet de moduler l'affinité des récepteurs NMDA envers le glutamate, molécule responsable d'une excitation toxique du système nerveux. Ainsi, elle contribue au ralentissement des pertes de fonctions cognitives allant parfois jusqu'à les améliorer chez certains patients. La mémantine est par ailleurs bien tolérée par les malades.

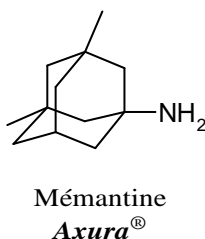


Figure 13 : La mémantine (Axura®), seul représentant des antiglutamates

D'autre part, la MA peut s'accompagner de troubles psycho-comportementaux comme des manifestations dépressives, d'anxiété, des troubles du sommeil. Ces symptômes varient en fonction des individus mais s'aggravent au cours de la maladie. Lorsque les troubles du comportement persistent malgré la prise d'anticholinestérasiques, des médicaments stabilisateurs de l'humeur comme les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine peuvent être utilisés.⁹¹ Les benzodiazépines sont utilisées dans le traitement de l'anxiété, de l'agitation, des troubles du sommeil et de la déambulation nocturne. Dans les cas extrêmes, c'est-à-dire quand les troubles du comportement s'accompagnent de

⁸⁷ S. L. Rogers *et al.*, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **2000**, 10, 195-203

⁸⁸ J. Marcusson *et al.*, *Alzheimers Dis. Assoc. Disord.*, **2003**, 17 86-91

⁸⁹ M. Rösler *et al.*, *BMJ*, **1999**, 318, 633-640

⁹⁰ C. G. Parsons *et al.*, *Neuropharmacol.*, **1999**, 38, 735-767

⁹¹ C. G. Lyketsos *et al.*, *Am. J. Psychiatry*, **2000**, 157, 1686-1689

symptômes psychotiques (délires, hallucinations), les neuroleptiques à faibles doses en cure de courte durée peuvent s'avérer nécessaire.⁹²

Enfin, le traitement de la MA ne repose pas seulement sur les médicaments. La prise en charge des malades passe aussi par les **traitements non médicamenteux**.⁹³ Ces derniers ont pour but de retarder l'institutionnalisation des patients. Ils consistent en un soutien psychologique de l'entourage et une aide au malade. En effet, établir et maintenir une communication avec le patient et avec son entourage est l'un des points clés du traitement. Les équipes médicales et l'entourage du malade doivent s'efforcer non seulement de maintenir son autonomie et ses liens sociaux mais aussi d'optimiser ses capacités mnésiques résiduelles.

La thérapeutique non médicamenteuse fait ainsi recourt aux différents programmes de rééducation et de réhabilitation cognitive qui ont pour objectif de retarder au maximum la perte d'autonomie. Ces programmes sont composés essentiellement d'ateliers mémoire, de thérapeutiques par évocation du passé et de rééducations de l'orientation.

3.2 La sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est connue depuis le début du XIX siècle.⁹⁴ Toutefois, il faudra attendre 1868 et le docteur Jean-Martin Charcot pour avoir une description précise et claire des lésions observées dans la pathologie.⁹⁵ Cent cinquante ans plus tard, et malgré d'innombrables recherches, cette maladie neurodégénérative soulève encore de nombreuses questions quant à son origine et à son traitement.

3.2.1 Epidémiologie

En 2008, le nombre de personnes atteintes de SEP était estimé à 1,3 millions dans le monde.⁹⁶ Aujourd'hui, en considérant les pays ne délivrant pas d'informations sur cette pathologie et le nombre de patients non diagnostiqués par faute de moyens financiers ou technologiques, ce chiffre est estimé à 2,5 millions. En France, on recense 80 000 malades et 4000 nouveaux cas sont déclarés chaque année.⁹⁷

La prévalence de la maladie à l'échelle mondiale a été estimée à 30 pour 100 000 personnes avec une disparité Nord/Sud (Figure 14). En effet, dans l'hémisphère Sud, les cas de SEP sont beaucoup plus rares voire inexistants comparés à certains pays de l'hémisphère Nord tels que les pays scandinaves, le Royaume-Unis ou l'Ecosse. Le même phénomène a été observé en France avec une

⁹² F. Lebert *et al.*, *Rev. Neurol.*, **2003**, 159, 825-830

⁹³ Recommandations professionnelles. " Diagnostic et prise en charge de la maladie d'Alzheimer et des maladies apparentées." . www.has-sante.fr

⁹⁴ W. F. Hickey, *J. Neuroimmuno.*, **1999**, 98, 37-44

⁹⁵ J.-M. Charcot, *Gaz. Hop. De Paris*, **1868**, 41, 554-566

⁹⁶ *Atlas: Multiple sclerosis resources in the world 2008*.

⁹⁷ Association Française des Scléroses en Plaques. <http://nafsep.org/> (2013)

plus grande fréquence de la maladie dans les régions Nord et Est. De plus il est montré que des individus de morphotype caucasien sont plus susceptibles de développer la maladie que ceux de morphotype africain ou asiatique.⁹⁶

Enfin, la sclérose en plaques est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes avec un ratio moyen de 2 : 1. Elle apparaît typiquement entre 20 et 40 ans, avec un âge moyen de survenue se situant autour de 29 ans. Dans 3% des cas, la maladie peut se déclarer pendant l'enfance. Par ailleurs, il existe également des formes tardives qui peuvent débuter après 40 ans.

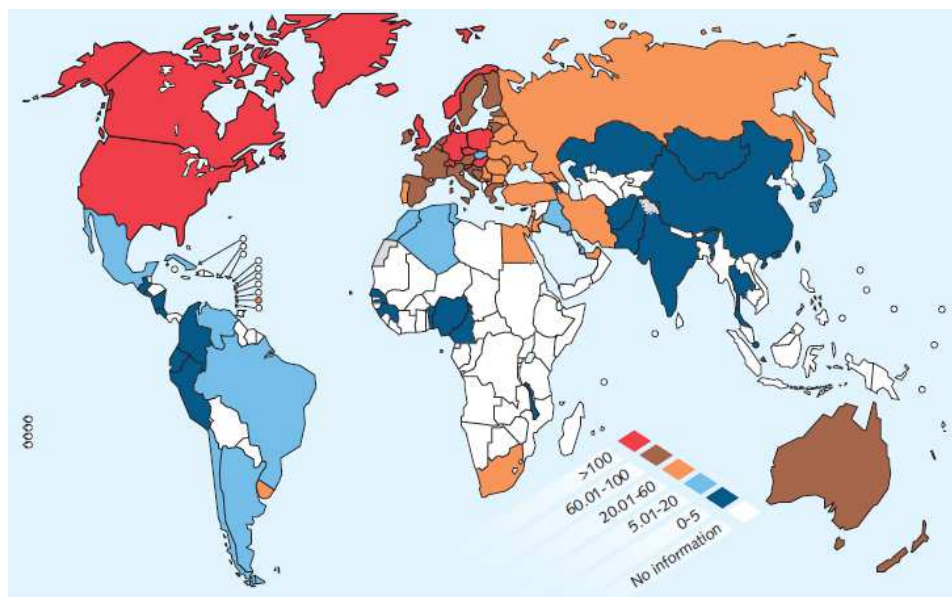


Figure 14 : Prévalence de la sclérose en plaques à travers le monde (pour 100 000 habitants).⁹⁶

3.2.2 Aspects cliniques et diagnostic

La SEP se caractérise par une grande diversité de symptômes et signes cliniques qui peuvent varier considérablement d'un patient à l'autre. Ces signes cliniques surviennent le plus souvent sans facteur déclenchant, et s'installent en quelques heures voire quelques jours pour diminuer progressivement en quelques semaines. S'ils durent au moins 24 heures et surviennent en l'absence de fièvre ou d'effort physique, ils constituent alors ce qu'on appelle une poussée.⁹⁷

La variabilité des symptômes dépend de la zone du système nerveux central où une plaque s'est formée.⁹⁸ Une lésion au niveau des nerfs optiques peut entraîner des troubles visuels alors qu'une lésion au niveau de la moelle épinière peut aussi bien induire des troubles sensitifs que des troubles moteurs (Figure 15). Dans un tiers des cas, les troubles visuels sont révélateurs de la maladie. Ils s'expriment par une baisse de l'acuité visuelle accompagnée de douleurs. Les troubles moteurs sont généralement fréquents au début de la maladie et correspondent le plus souvent à une faiblesse musculaire. Enfin, les troubles sensitifs correspondent très souvent à des engourdissements ou à des

⁹⁸ J. C. Ouallet *et al.*, *Neurol.*, **2004**, 1, 415-457

douleurs. Ces signes neurologiques s'accompagnent fréquemment de signes généraux, notamment une fatigue importante qui peut être invalidante.

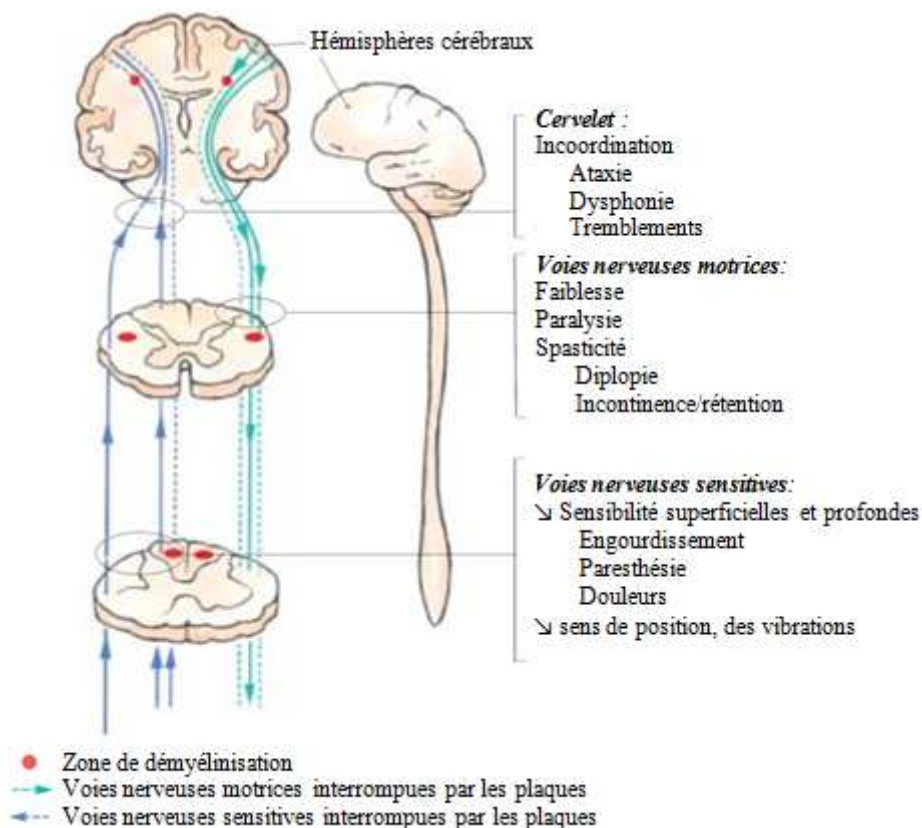


Figure 15 : Les atteintes de la sclérose en plaques.

La diversité des symptômes observés dans la maladie rend le diagnostic difficile. Actuellement, il peut prendre plusieurs mois et est établi si seulement deux éléments sont réunis : la dissémination spatiale et la dissémination temporelle. En d'autres mots, le diagnostic est posé seulement si plusieurs zones du SNC sont atteintes et si les poussées se sont succédées au fil du temps. Ce diagnostic repose sur une série de critères dont des critères cliniques (les signes de la maladie), des éléments fournis par un IRM et parfois des éléments biologiques (ponctions lombaires).⁹⁹

Enfin, l'évolution de la SEP est très variable d'un individu à un autre. Il est donc impossible de prédire au début de la maladie la fréquence et le degré de récupération après chacune des poussées. Il faut attendre plusieurs mois, parfois de nombreuses années avant de pouvoir apprécier la forme évolutive. C'est la succession dans le temps des phénomènes de poussées qui définit les différentes formes cliniques de la maladie appelées rémittente ou progressive (Figure 16). Dans 85% des cas, le début de la SEP se fait sous forme rémittente (RR-MS) avec le plus souvent récupération totale de l'état neurologique. Après quelques années, la phase rémittente se transforme en phase chronique progressive. On parle alors de la forme secondairement progressive (SP-MS). Enfin, dans 15% des cas

⁹⁹ Multiple Sclerosis International Federation (MSIF). <http://www.msif.org/> (2013)

et surtout quand le début de la maladie se déclare après 40 ans, les premiers symptômes s'installent de façon progressive sans poussée. Il s'agit alors d'une forme d'emblée progressive sans phénomène de poussée.

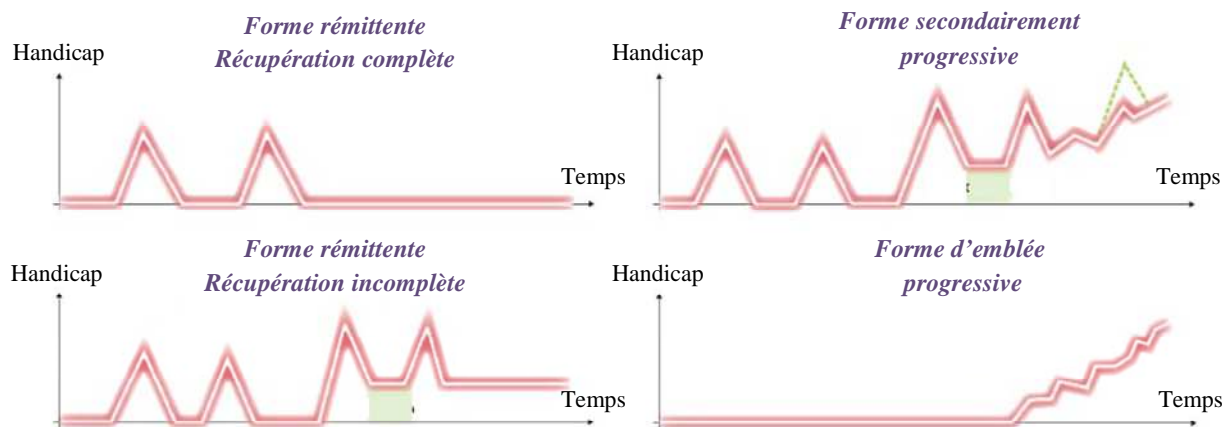


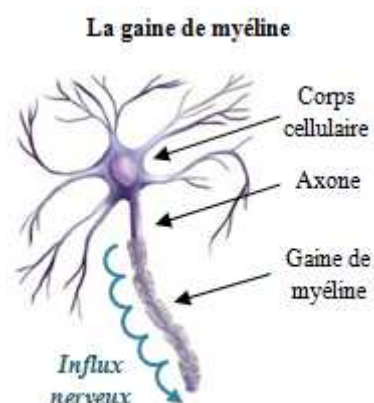
Figure 16 : Evolution possible de la sclérose en plaques.

3.2.3 Physiopathologie

La SEP est définie comme une maladie auto-immune et hétérogène qui affecte à la fois le cerveau et la moelle épinière. Elle est caractérisée par des lésions multiples démyélinisantes au niveau de la substance blanche et dont l'évolution ultime est la déperdition axonale et neuronale.⁹⁸

La gaine de myéline est la principale cible du processus pathologique de la SEP. Sa destruction à différents endroits du SNC, l'empêche d'assurer ses rôles physiologiques de conduction de l'influx nerveux et de protection de l'axone.¹⁰⁰

Le système nerveux est le centre d'intégration et de traitement des données. Il remplit trois fonctions liées à la réception, au transport et à l'intégration de l'information par l'intermédiaire d'influx nerveux. Les neurones constitués d'un corps cellulaire et d'un prolongement axonal sont responsables de la création et du transport de cet influx nerveux.¹⁰¹ Afin de faciliter et de maximiser la communication entre les neurones, les axones sont entourés d'une gaine de myéline, une lipoprotéine peu conductrice produite par les oligodendrocytes. Cette gaine est interrompue à des intervalles réguliers (les nœuds de Ranvier) ce qui permet une conduction rapide de l'influx le long de la fibre nerveuse *via* un phénomène « saltatoire » (l'influx saute d'un nœud de Ranvier à un



¹⁰⁰ B. Garbay *et al.*, *Progress Neurobiol.*, **2000**, 61, 267-304

¹⁰¹ N. Baumann *et al.*, *Physiol. Rev.*, **2001**, 81, 871-927

autre).^{102,103} La destruction de la segmentation de l'axone empêche cette conduction saltatoire ce qui a pour résultat de ralentir voire même d'interrompre la conduction nerveuse. Les différents symptômes de la maladie apparaissent alors.

Le système immunitaire joue un rôle important dans la destruction de la gaine de myéline. En effet, l'origine auto-immune de la maladie met en jeu les lymphocytes T ciblant des antigènes de la myéline tels que la MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) ou la MBP (Myelin Basic Protein). Il est généralement admis que la SEP débute par une infiltration de lymphocytes activés au niveau de la BHE induisant ainsi une réponse inflammatoire dans le SNC (Figure 17).¹⁰⁴ Ce phénomène inflammatoire conjugué à une augmentation de la perméabilité de la BHE est observé au stade précoce de la démyélinisation chez des personnes atteintes de SEP.

Les lymphocytes T auto-réactifs ainsi infiltrés, reconnaissent *via* leur récepteur TCR l'antigène myélinique présenté par la molécule du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) exprimée à la surface des CPA (Cellules Présentant l'Antigène) telles que les microglies et les macrophages. Il en résulte la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (IL-23, IFN- γ , TNF, OPN) et l'activation des macrophages qui attaquent alors la myéline.¹⁰⁵

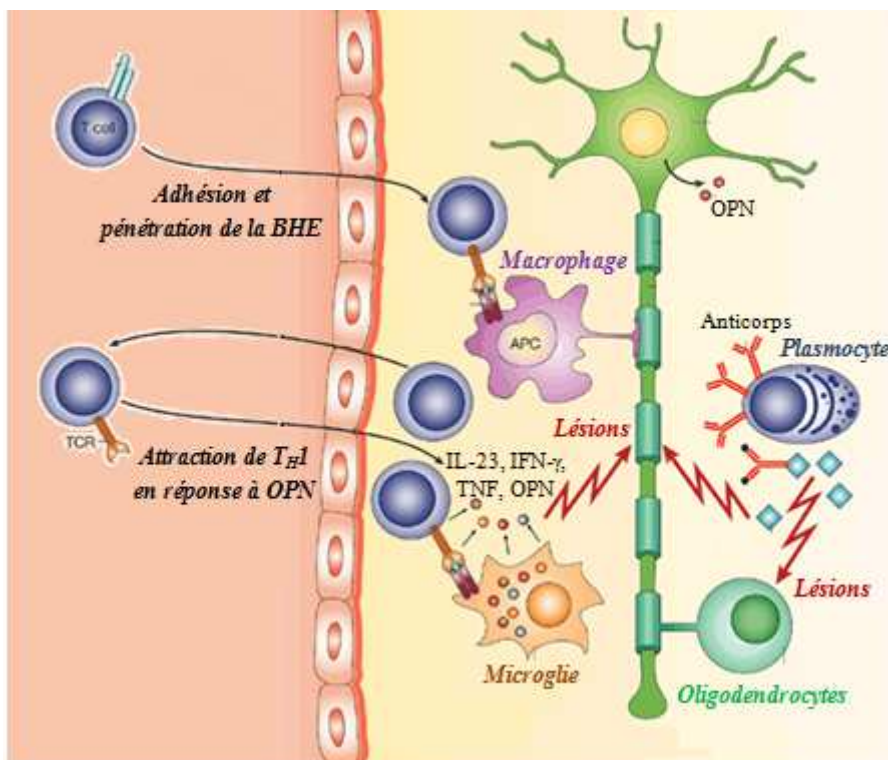


Figure 17 : Attaque immunitaire de la gaine de myéline.¹⁰⁴

¹⁰² G. R. W. Moore *et al.*, *Diagn. Histopathol.*, **2011**, 17, 225-231

¹⁰³ B. D. Trapp *et al.*, Structure of myelinated axon. In *Myelin biology and disorders*, **2004**

¹⁰⁴ L. Steinman *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.*, **2003**, 3, 483-492

¹⁰⁵ D. Chabas, *Rev. Neurol.*, **2005**, 162, 162-173

D'autre part, les lymphocytes B activés se différencient en plasmocytes qui sécrètent des anticorps spécifiques (IgG). Ces anticorps se fixent sur les protéines exprimées à la surface des oligodendrocytes et des neurones et induisent ainsi la phagocytose par les macrophages.¹⁰⁶

La question du ou des antigène(s) spécifique(s) de cette réponse immune n'a pas encore trouvé de réponse même s'il est clairement admis qu'une expression excessive de certains antigènes du soi serait impliquée dans l'activation des lymphocytes T. Historiquement, les protéines myéliniques telles que la MOG ou la MBP étaient considérées comme les cibles uniques du processus pathologique de la maladie. Cependant, des études récentes ont montré que d'autres composants du SNC, comme la cristalline αB ¹⁰⁷ ou la neurofascine¹⁰⁸ pouvaient également être des cibles. Les lésions débuteraient par des foyers locaux d'inflammation dans le SNC, qui donneraient naissance par la suite à des plaques de démyélinisation progressant à travers la substance blanche.¹⁰⁹

L'évolution de la maladie se fait généralement par poussées séparées par des périodes de rémissions. Ces dernières sont le reflet d'un mécanisme au cours duquel la gaine de myéline est reformée et la conduction saltatoire restaurée : ce phénomène est appelé remyélinisation (Figure 18).¹¹⁰ Il se traduit par l'apparition de plaques « inactives ou cicatricielles » en opposition aux plaques actives lieu de démyélinisation. Enfin, la démyélinisation peut également s'aggraver conduisant à une perturbation et un ralentissement de la conduction de l'influx nerveux. Au fil de temps, une atteinte et une destruction de l'axone peuvent se produire expliquant les séquelles après les poussées.

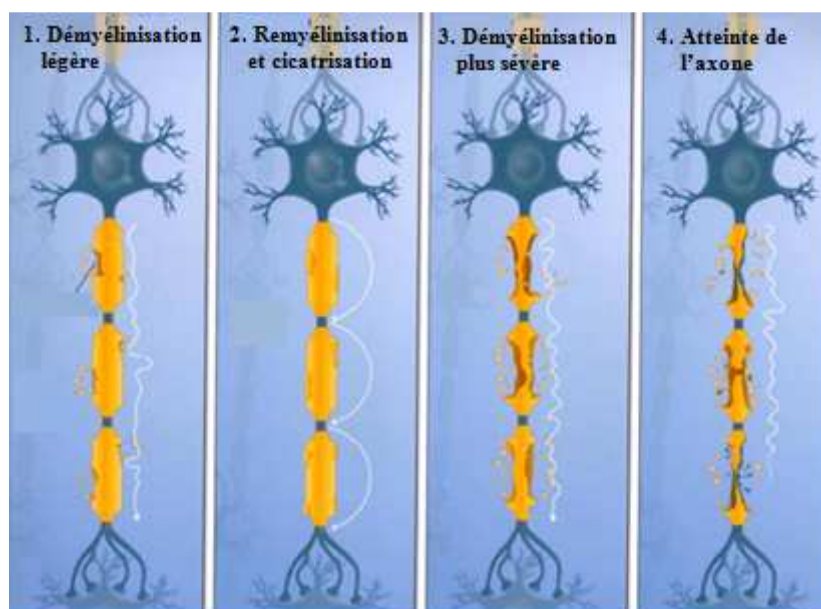


Figure 18 : Mécanismes physiopathologiques de la SEP.

¹⁰⁶ B. Hemmer *et al.*, *Nat. Clin. Pract. Neuro.*, **2006**, 2, 201-211

¹⁰⁷ S. S. Ousman *et al.*, *Nature*, **2007**, 448, 474-479

¹⁰⁸ E. K. Mathey *et al.*, *J. Exp. Med.*, **2007**, 204, 2363-2372

¹⁰⁹ A. Kutzelnigg *et al.*, *Brain*, **2005**, 128, 2705-2712

¹¹⁰ R. J. M. Franklin *et al.*, *Nat. Rev. Neurosci.*, **2008**, 9, 839-855

3.2.4 Traitements

Avant 1995, aucune molécule n'avait reçu d'accréditation pour le traitement de la SEP.¹¹¹ L'autorisation de mise sur le marché (AMM) de la première molécule eut un impact significatif sur le patient et sa qualité de vie.

Actuellement, il n'existe toujours pas de traitement capable de stopper la maladie. Le handicap est précoce et la moitié de la maladie se déroule dans un état de dépendance. Traiter un malade atteint de SEP signifie lui apporter des soins pour améliorer sa situation et ralentir la progression du processus pathologique. Une stratégie thérapeutique en quatre axes composée à la fois de mesures médicamenteuses et non médicamenteuses a ainsi été développée (Figure 19).

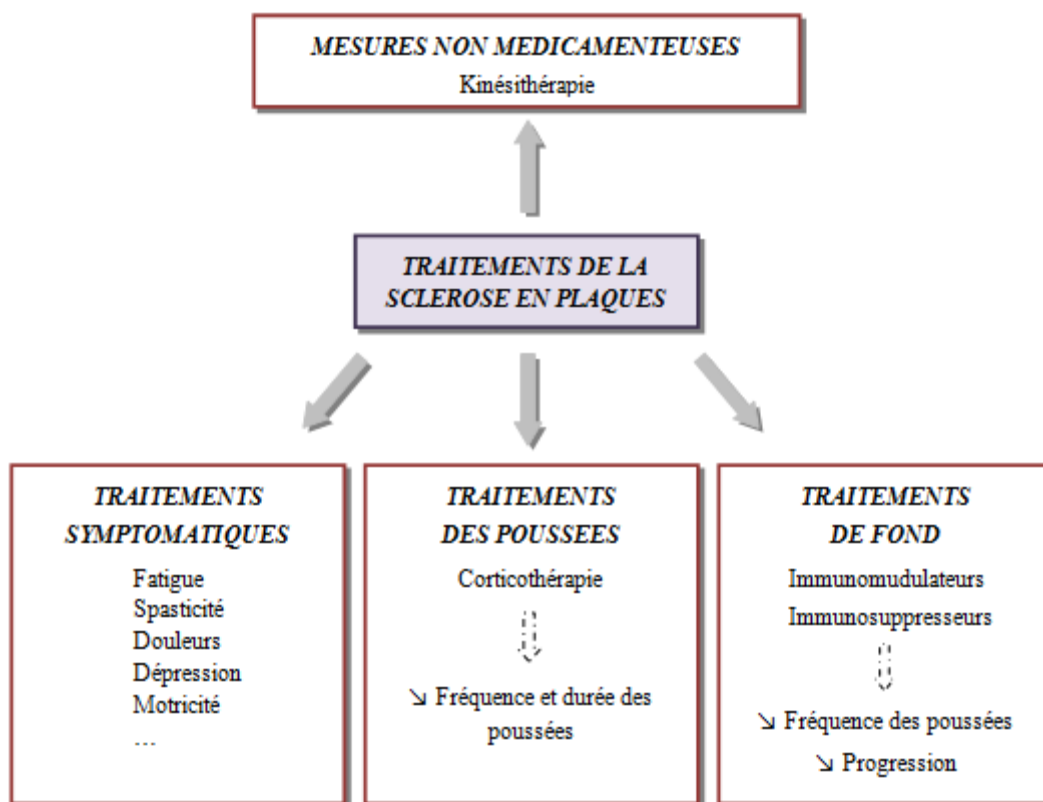


Figure 19 : Stratégies thérapeutiques utilisées dans la SEP.

Parmi les **mesures médicamenteuses**, il faut distinguer le traitement des symptômes contribuant au handicap, le traitement des poussées permettant de diminuer leur fréquence et leur durée, et le traitement de fond visant à ralentir la progression de la maladie.

La fatigue, la spasticité, les douleurs musculaires, les tremblements sont autant de symptômes qui participent au handicap d'une personne atteinte de SEP.¹¹² Une spasticité importante peut entraîner une incapacité motrice et être responsable de douleurs et de perte d'autonomie. Elle est généralement traitée par des médicaments antispastiques dont le baclofène (Lioréal®) et le dantrolène (Dantrium®).

¹¹¹ A. Compston *et al.*, *Lancet*, **2008**, 372, 1502-1517

¹¹² Sclérose en plaques: évaluations et recommandations 2001. www.has-sante.fr

Ils doivent être prescrits progressivement afin de ne pas aggraver le handicap par une baisse de tonus. Le diazépam (Valium®) peut également être indiqué mais plus en tant que sédatif.¹¹³ La fatigue est un symptôme très fréquent que ce soit pendant mais aussi entre les poussées. En dehors des poussées, la fatigue chronique sera traitée en première intention par l'amantadine (Mantadix®). Plusieurs études ont montré un bénéfice net chez les patients atteints de SEP, mais les effets secondaires sont fréquents et importants.¹¹⁴ La 3,4-diaminopyridine, un bloqueur des canaux potassiques, sera prescrite en deuxième intention uniquement en milieu hospitalier. Enfin, pour les tremblements et les mouvements anormaux de nombreux traitements ont été proposés. La majorité est utilisée hors AMM pour la SEP dont le clonazépam (Rivotril®), l'isoniazide à très haute dose et le propranolol (β -bloquant).¹¹²

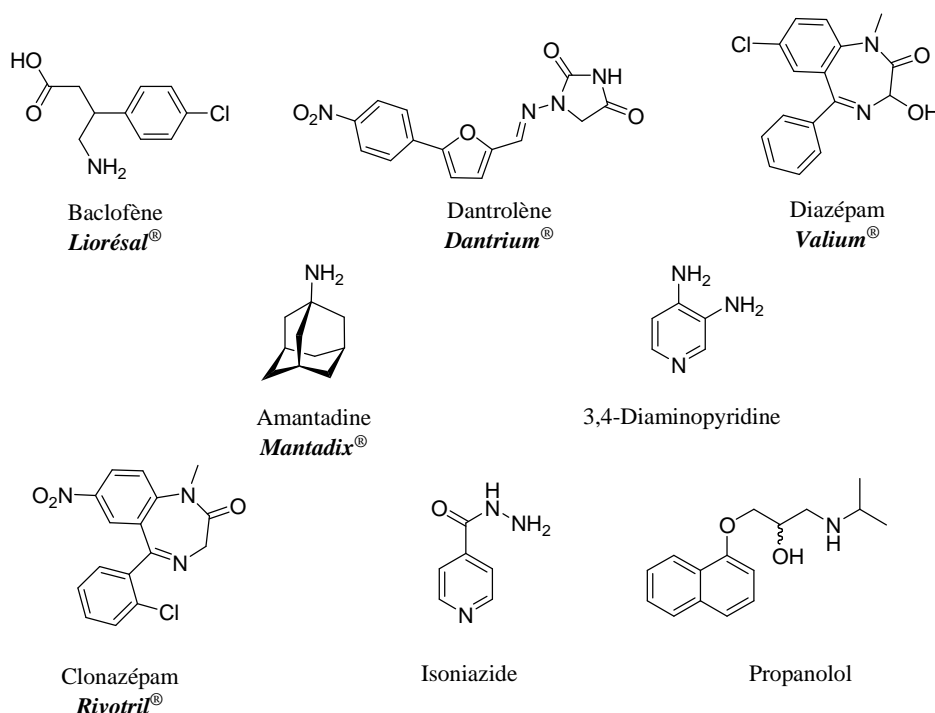
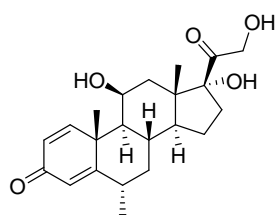


Figure 20 : Arsenal thérapeutique utilisé dans le traitement des différents symptômes de la SEP.

Comme les poussées correspondent à des périodes d'inflammation aigüe, leur traitement est fondé essentiellement sur une thérapeutique anti-inflammatoire et plus particulièrement sur les corticoïdes. De fortes doses sont administrées par voie intraveineuse pendant quelques jours en milieu hospitalier. En général, il s'agit de méthylprednisolone (Solumédrol®) à raison de 1g par jour pendant trois à cinq jours (Figure 21).¹¹² Cette corticothérapie va permettre de combattre l'inflammation et de raccourcir la durée des poussées. Elle n'a toutefois aucune action sur la prévention de nouvelles poussées ni sur l'évolution de la maladie.

¹¹³ M. Kita, Treatment of spasticity. In *Multiple sclerosis therapeutics*, 1999

¹¹⁴ L. B. Krupp, Treatment of fatigue. In *Multiple sclerosis therapeutics*, 1999



Méthylprednisolone
Solumédrol®

Figure 21 : Anti-inflammatoire stéroïdien utilisé dans le traitement des poussées.

Enfin, les traitements de fond visent à contrôler le processus pathologique en agissant soit sur différentes étapes de la réponse immunitaire, soit en la diminuant. Contrairement au traitement des poussées, ils vont être prescrits en continu de façon à diminuer la fréquence des phénomènes inflammatoires et à ralentir la progression de la SEP. Actuellement, six agents appartenant à deux familles différentes, les immunomodulateurs et les immunosuppresseurs, sont utilisés dans les formes RR-MS et SP-MS de la maladie.¹¹⁵

Les immunomodulateurs sont les traitements de fond apparus en premier sur le marché. Ils visent essentiellement à réduire les poussées en agissant sur certaines étapes de la réponse immunitaire.¹¹⁶ Cette famille est composée des interférons et de l'acétate de glatiramère. Les interférons (IFN) sont des cytokines naturellement présentes dans notre organisme. Ils sont classés suivant leur activité pro- ou anti-inflammatoire. L'INF- β , le plus étudié dans le cas de la sclérose en plaques, possède une activité anti-inflammatoire. Il est responsable d'une variété d'effets immunologiques dont l'inhibition de l'activation des lymphocytes T, une modulation des cytokines pro-et anti-inflammatoires et une diminution de la migration des lymphocytes T.^{117,118} Il existe sous 3 formulations différentes : l'INF β -1b à injecter sous-cutané (Bétaféron®), l'INF β -1a à injecter soit en intramusculaire (Avonex®) soit en sous-cutané (Rebif®). Même si les interférons ont prouvé leur efficacité dans les formes RR-MS en diminuant de 30% la fréquence des poussées, celle-ci est beaucoup moins évidente dans les formes SP-MS. L'acétate de glatiramère (GA) (Copaxone®), est un polypeptide synthétique constitué aléatoirement de quatre acides aminés (alanine, lysine, glutamate, tyrosine) présents dans la protéine basique de la myéline (MBP). Il va agir sur la différenciation des lymphocytes T en favorisant un profil T Helper 2 (Th2) anti-inflammatoire.¹¹⁹ D'autre part, conçu pour mimer la MBP, l'acétate de glatiramère va entrer en compétition avec celle-ci pour la fixation au CMH à la surface des CPA. Cette compétition a pour conséquence d'empêcher l'activation des lymphocytes auto-réactifs spécifiques de la MPB.¹²⁰ Il est ainsi indiqué pour réduire la fréquence des poussées. Toutefois, il est réservé aux

¹¹⁵ F. Luessi *et al.*, *Expert Rev. Neurother.*, **2012**, 12, 1061-1077

¹¹⁶ L. J. Barten *et al.*, *Drug. Des. Devel. Ther.*, **2010**, 4, 343-66

¹¹⁷ V. W. Yong, *Neurol.*, **2002**, 59, 802-808

¹¹⁸ B. C. Kieser *et al.*, *Exp. Neurol.*, **2007**, 203, 1-4

¹¹⁹ R. Arnon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101, 14593-14598

¹²⁰ B. Gran *et al.*, *Neurol.*, **2000**, 55, 1704-1714

patients présentant une inefficacité ou une intolérance majeure à l'INF- β .¹¹² Il s'administre par voie sous-cutanée avec une nécessité d'alterner les sites d'injection pour éviter les réactions locales.

Les immunosuppresseurs sont des traitements plus agressifs qui sont réservés aux formes les plus graves avec des poussées très fréquentes en quelques mois et laissant des séquelles. Ils vont agir directement sur les cellules immunitaires entraînant ainsi une modification ou une suppression de la réponse immune. Cette famille regroupe quatre composés : la mitoxantrone, le cyclophosphamide, le natalizumab et le fingolimod (Figure 22).

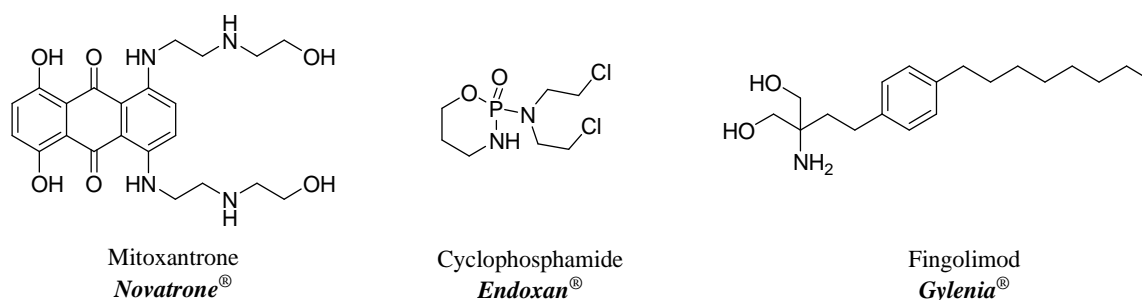


Figure 22 : Immunosuppresseurs utilisés dans les formes actives de la SEP.

La mitoxantrone (Novatrone®) est un dérivé de l'anthracycline qui s'insère dans l'ADN par des liaisons hydrogènes, ce qui a pour conséquences de conduire à des repliements et à des cassures de l'ADN. Elle est capable d'inhiber la maturation des cellules dendritiques et la prolifération des lymphocytes activés en induisant un mécanisme d'apoptose.¹²¹ La mitoxantrone permet de diminuer significativement le nombre de poussées, le niveau de handicap résiduel et le nombre de lésions.¹²² Toutefois, son utilisation est limitée par sa toxicité, notamment cardiaque et hématologique. Le cyclophosphamide (Endoxan®), un agent alkylant et cytostatique, va agir comme la mitoxantrone, sur la multiplication et la fonction des lymphocytes T. Il permet non seulement de freiner significativement la progression de la maladie mais aussi dans certains cas de récupérer partiellement des derniers déficits apparus. Prescrit à des doses importantes, il est toutefois responsable d'un grand nombre d'effets secondaires tels que des troubles digestifs, des infections urinaires et des problèmes hématologiques.⁹⁸ Le natalizumab (Tysabri®) fait parti de ces nouveaux traitements utilisés dans la SEP qui ont une action très spécifique. Il s'agit d'un anticorps monoclonal recombinant humanisé dirigé contre une intégrine ($\alpha 4\beta 1$) présente à la surface des lymphocytes.¹²³ Par inhibition sélective de la reconnaissance entre l'intégrine et ses ligands, des molécules d'adhésion, le natalizumab va bloquer la migration des lymphocytes du sang périphérique vers le SNC *via* la BHE.¹²⁴ Ce traitement, indiqué dans les formes très actives de SEP, semble être relativement bien toléré puisque chez la majorité des

¹²¹ O. Ncuhaus *et al.*, *J. Neuroimmuno.*, **2005**, 168, 128-137

¹²² H. P. Hartung *et al.*, *Lancet*, **2002**, 360, 2018-2025

¹²³ P. S. Rommer *et al.*, *J. Neurol.*, **2008**, 255, 28-35

¹²⁴ O. Stüve *et al.*, *J. Neurol.*, **2008**, 255, 58-65

patients peu d'effets indésirables sont observés. A ce jour, il s'agit d'un des traitements de fond les plus puissants qui permet de réduire significativement la fréquence des poussées et de ralentir de façon importante la progression de la maladie. Enfin, le fingolimod (Gylenia®) est le plus récent des immunosuppresseurs et le plus innovant de par sa voie d'administration *per os*.¹²⁵ Il s'agit d'un agoniste du récepteur à la sphingosine-1-phosphate (S1P) exprimé à la surface des lymphocytes. Le récepteur S1P permet en interagissant avec la sphingosine-1-phosphate, la sortie des lymphocytes activés des tissus lymphoïdes secondaires.¹²⁶ Une interaction entre le fingolimod et ce récepteur va permettre de bloquer les lymphocytes dans les tissus lymphoïdes et prévenir ainsi toute réaction délétère au niveau du SNC. Même si son efficacité a été démontrée au cours des différentes phases du processus de validation, un traitement par le fingolimod s'accompagne de nombreux effets indésirables notamment cardiaques.¹²⁷

Pour finir, le traitement de la SEP ne repose pas uniquement sur l'ensemble de ces thérapeutiques médicamenteuses. La prise en charge des malades passe également par une **rééducation neurologique**.⁹⁸ Cette rééducation doit être pluridisciplinaire et centrée sur la qualité de vie des patients. Elle va permettre non seulement de préserver l'indépendance de la marche et des activités quotidiennes le plus longtemps possibles mais également de prévenir et traiter certaines complications telles que la spasticité qui apparaissent au cours de la maladie. Enfin, une aide psychosociale et une prise en charge par ergothérapie permettra aux malades de s'adapter à leur environnement tout au long de l'évolution de leur handicap.¹²⁸

¹²⁵ V. Brinkmann *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2010**, 9, 883-897

¹²⁶ J. G. Cyster, *Annu. Rev. Immunol.*, **2005**, 23, 127-159

¹²⁷ C. Gasperini *et al.*, *Ther. Clin. Risk Manag.*, **2013**, 9, 73-82

¹²⁸ J. A. Freeman *et al.*, *Ann. Neurol.*, **1997**, 42, 236-244

II. La protéine sigma

1. Historique

La protéine sigma (σ) a été décrite pour la première fois par Martin *et al*¹²⁹ en 1976. La dénomination σ provient de la première lettre « s » de SKF-10,047, un ligand non sélectif du site. En effet, suite à une étude des effets psychomimétiques induits par la *N*-allylnormétazocine (SKF-10,047) chez le chien, les récepteurs sigma ont été présentés comme une sous classe des récepteurs opioïdes. Un mélange racémique composé à la fois de l'isoforme (-) et de l'isoforme (+) du SKF-10,047 utilisé au cours de cette étude sera à l'origine de cette confusion. Il sera montré, par la suite, que le (-)-SKF-10,047 agit sur les récepteurs opioïdes μ et κ , contrairement à l'isomère (+) qui agit sur un site différent avec une très forte affinité (Figure 23).¹³⁰ De plus, le fait que ni les effets *in vivo*, ni les effets *in vitro* des ligands σ ne soient bloqués par des antagonistes opiacés classiques¹³¹, a laissé le doute quant à la vraie nature du site de liaison σ .

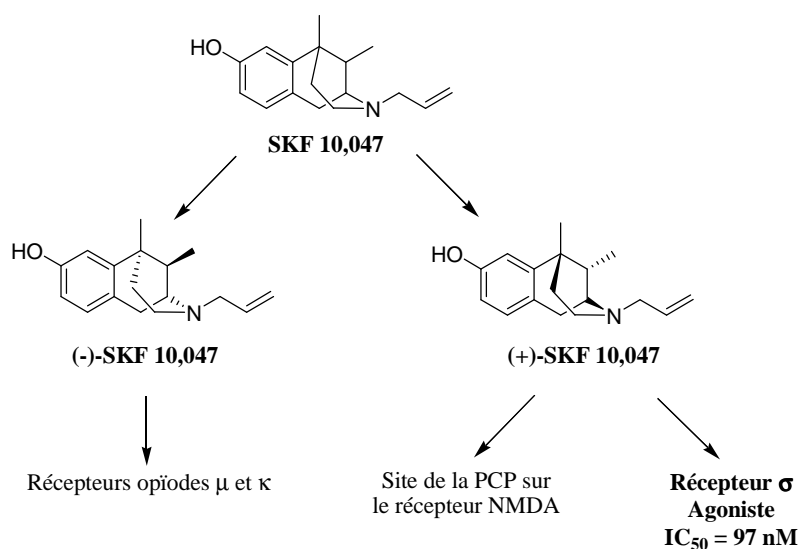


Figure 23 : Site de liaison du ligand SKF 10,047.

En 1984, le site σ est identifié comme étant le site de liaison pour la phencyclidine (PCP) associé aux récepteurs au glutamate de type NMDA¹³², ce qui sera démenti par la suite. Quelques années plus tard, les sites de liaison σ sont finalement reclassés comme n'étant ni des récepteurs opioïdes ni des sites de la PCP, mais des sites de liaison bien distincts.¹³³

¹²⁹ W. R. Martin *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1976**, 197, 517-532

¹³⁰ K. T. Brady *et al.*, *Science*, **1982**, 215, 178-180

¹³¹ D. B. Vaupel, *Eur. J. Pharmacol.*, **1983**, 92, 269-274

¹³² S. R. Zukin *et al.*, *Brain Res.*, **1984**, 233, 597-602

¹³³ R. Quirion *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.*, **1992**, 13, 85-86

2. Sous-type et structure

Les différentes études biochimiques et pharmacologiques réalisées sur les récepteurs sigma ont montré l'existence de deux sous types communément appelés σ_1 et σ_2 .¹³⁴ Ces sous types diffèrent par leur distribution tissulaire, leur localisation cellulaire et leur poids moléculaire mais aussi par leur sélectivité vis-à-vis des ligands. En effet, σ_1 possède une forte affinité et une stéréosélectivité envers les isoformes (+) de la pentazocine, de la cyclozocine et du SKF-10,047 (Figure 24) alors que σ_2 présente une plus forte affinité pour les isoformes (-) de ces mêmes molécules.¹³⁵

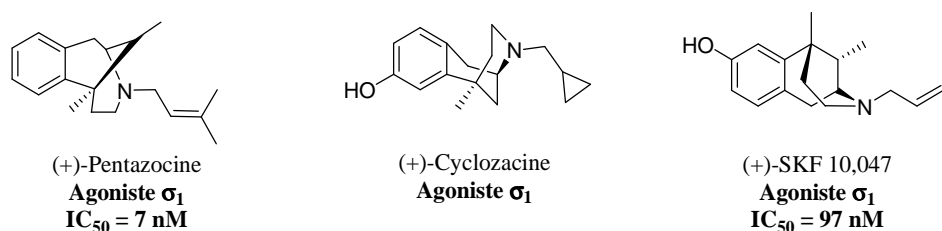


Figure 24 : Ligands sélectifs des récepteurs σ_1 .

2.1 La protéine σ_1

La protéine σ_1 correspond à la protéine la plus caractérisée de la famille. En effet, elle a été clonée à de nombreuses reprises à partir de différents tissus dont le foie de cochon d'inde¹³⁶, des cellules nerveuses humaines¹³⁷, le cerveau de rat¹³⁸ et de souris¹³⁹.

Il s'agit d'une protéine de 223 acides aminés, soit 25kDa (Figure 25) qui ne présente aucune homologie de structure avec les récepteurs opioïdes ni aucune autre protéine de mammifères.¹⁴⁰ Elle possède, toutefois, de fortes homologies de séquences inter-tissus et inter-espèces avec plus de 90% d'identité entre les différentes protéines σ_1 de mammifères. De plus, la protéine σ_1 partage 30,3% d'identité et 66,4% d'homologie avec la stérol-isomérase C8-C7.¹³⁶ Une importante partie (75%) des acides aminés du domaine hydrophobe situé au centre de la protéine σ_1 est identique à la séquence du site de liaison des stérols de la stérol-isomérase C8-C7. Cependant, la protéine σ_1 ne possède pas d'activité enzymatique de stérol-isomérase et sa structure est totalement différente de celle de l'enzyme de mammifère.¹⁴¹

¹³⁴ S. B. Hellewell *et al.*, *Brain Res.*, **1990**, 527, 244-253

¹³⁵ S. B. Hellewell *et al.*, *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmac. Sect.*, **1994**, 268, 9-18

¹³⁶ M. Hanner *et al.*, *Proceedings Nat. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 8072-8072

¹³⁷ P. D. Prasad *et al.*, *J. Neurochem.*, **1998**, 70, 443-451

¹³⁸ P. Seth *et al.*, *J. Neurochem.*, **1998**, 70, 922-931

¹³⁹ Y. X. Pan *et al.*, *J. Neurochem.*, **1998**, 70, 2279-2285

¹⁴⁰ J. Mei *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **2001**, 62, 349-355

¹⁴¹ T. Hayashi *et al.*, *Life Sci.*, **2005**, 77, 1612-1624

	TM I	
rSigma ₁ R	MPWAVGRRWAWITLFLTI VA VLIQAVLWLVLTQSFVVFQREIEIAQLARQYA (50)	
mSigma ₁ R	MPWAAGRRWAWITLILLTIIAVLIQA AW LWLVLTQNFVFSREIEIAQLARQYA (50)	
gpSigma ₁ R	MQWAVGRRWLWVALFLAAVAVLTQIVVWLWLVLTQNFVVFQREIEIAQLARQYA (50)	
hSigma ₁ R	MQWAVGRRWAWAALLLAVAAVLTQIVVWLWLVLTQSFVVFQREIEIAQLARQYA (50)	
	TM II	
rSigma ₁ R	GLDHELAFSRLIVELRRLHPGHVLPDEELQ VVFNAGGWMGAMCLLHASL (100)	
mSigma ₁ R	GLDHELAFSRLIVELRRLHPGHVLPDEELQ VVFNAGGWMGAMCILHASL (100)	
gpSigma ₁ R	GLDHELAFSKLIVELRRLHPVHVLPDEELQ VVFNAGGWMGAMCLLHASL (100)	
hSigma ₁ R	GLDHELAFSRLIVELRRLHPGHVLPDEELQ VVFNAGGWMGAMCLLHASL (100)	
rSigma ₁ R	SEYVLLFGTALG SHGHSGRYWAEISDTIISGTFHQWREGTTKSEVYYPGE (150)	
mSigma ₁ R	SEYVLLFGTALGSHGHSGRYWAEISDTIISGTFHQWKEGTTKSEVFPGE (150)	
gpSigma ₁ R	SEYVLLFGTALGSPRHSGRYWAEISDTIISGTFHQWREGTTKSEVFPGE (150)	
hSigma ₁ R	SEYVLLFGTALGSRGHSGRYWAEISDTIISGTFHQWREGTTKSEVFPGE (150)	
rSigma ₁ R	TVVHGPGEATAVWNGPNTWMVEYGRGVI PSTLAFALSDTIFSTQDFLTLF (200)	
mSigma ₁ R	TVVHGPGEATALEWNGPNTWMVEYGRGVI PSTLFFALADTFSTQDYLTFL (200)	
gpSigma ₁ R	TVVHGPGEATAVWNGPNTWMVEYGRGVI PSTLGFALADTVFSTQDFLTLF (200)	
hSigma ₁ R	TVVHGPGEATAVWNGPNTWMVEYGRGVI PSTLAFALADTVFSTQDFLTLF (200)	
rSigma ₁ R	YTLRAYARGLRLELT TYLFGQDP (223)	
mSigma ₁ R	YTLRAYARGLRLELT TYLFGQDS 93.3% identity (223)	
gpSigma ₁ R	YTLRVYARALQLELT TYLFGQDP 93.7% identity (223)	
hSigma ₁ R	YTLRVYARGLRLELT TYLFGQDP 96.0% identity (223)	

Figure 25 : Structure primaire de la protéine σ_1 .¹⁴⁰ La séquence d'acides aminés de la protéine σ_1 chez le rat (rS1R) est présentée en alignement avec celle du murin (mS1R), du cochon d'inde (gpS1R) et de l'homme (hS1R). TM I et TM II représentent les séquences possibles des domaines transmembranaires.

La structure tertiaire de la protéine n'a pas encore été élucidée et plusieurs modèles ont déjà été décrits. Dans un premier temps, Mei *et al*¹⁴⁰ ont proposé une structure ne comportant qu'un seul domaine transmembranaire. Cependant en 2002, des études comparant l'homologie entre ce domaine transmembranaire potentiel et les segments de domaines transmembranaires connus ont donné des résultats différents. Effectivement, cette étude suggère la présence de 2 domaines transmembranaires avec une boucle extracellulaire d'environ 50 acides aminés et une extrémité C-terminale intracellulaire d'environ 125 acides aminés. D'après ce modèle l'extrémité N-terminale est très courte et serait localisée du coté intracellulaire.¹⁴² Ces deux modèles proposés pour la protéine σ_1 (Figure 26) suggèrent une structure tertiaire différente de la structure des récepteurs couplés aux protéines G qui comportent sept domaines transmembranaires.

¹⁴² E. Aydar *et al.*, *Neuron.*, **2002**, 34, 399-410

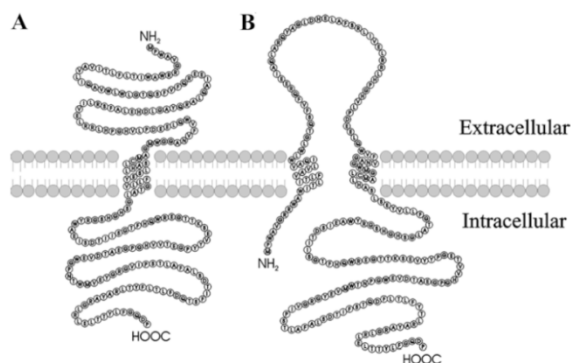


Figure 26 : Modèles structuraux proposés pour la protéine σ_1 .¹⁴³ A) Modèle à un domaine transmembranaire (Mei *et al.*). B) Modèle à deux domaines transmembranaires (Ayadar *et al.*).

Plus récemment, Pal *et al.*¹⁴⁴ ont proposé qu'en plus de la région hydrophobe qui constitue le premier domaine transmembranaire (TM 1), il existerait en fait deux segments hydrophobes additionnels qui correspondraient à des domaines de liaison de type stérol (SBDL 1 et SBDL 2) (Figure 27).¹⁴⁵ Le premier domaine serait constitué des acides aminés 91 à 109 de la protéine et chevaucherait partiellement le domaine transmembranaire TM 1. SBDL 2 serait composé des acides aminés 176 à 194. Des études, notamment par marquage de photoaffinité, ont permis également d'identifier le site de liaison de la protéine. Il a été démontré que les domaines SBDL 1 et SBDL 2 ainsi que le domaine N-terminal TM 1 constituaient en partie ce site de liaison et que l'acide aspartique D188 jouait un rôle important dans la liaison avec les ligands σ_1 .^{146,147}

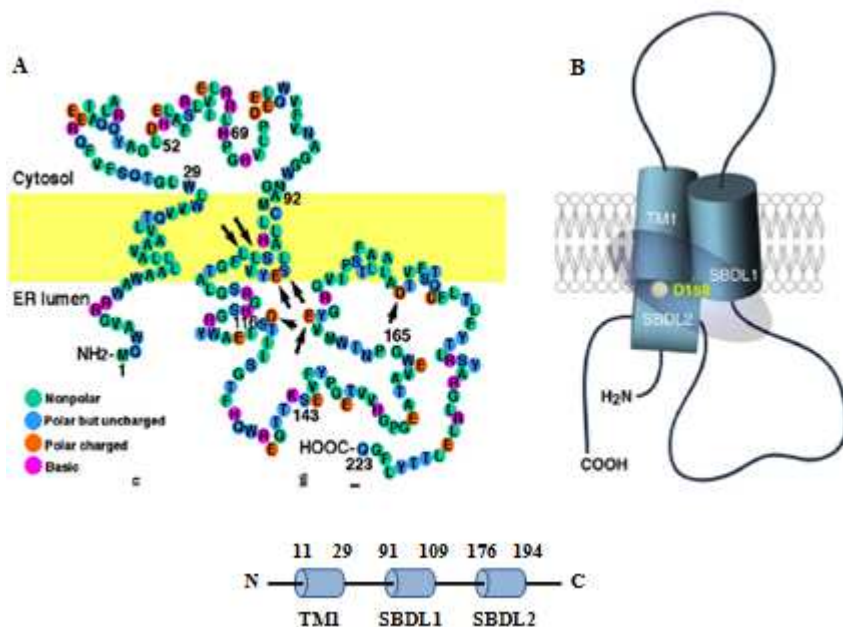


Figure 27 : Modèle structural et site de liaison de la protéine σ_1 .¹⁴⁶ A) Les flèches indiquent les acides aminés impliqués dans le site de liaison. B) La zone elliptique représente le site de liaison.

¹⁴³ X. Guitart *et al.*, *Psychopharmacol.*, **2004**, 174,

¹⁴⁴ A. Pal *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **2007**, 72, 921-933

¹⁴⁵ E. J. Cobos *et al.*, *Curr. Neuropharmacol.*, **2008**, 6, 344-344

¹⁴⁶ T.-P. Su *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2010**, 31, 557-566

¹⁴⁷ D. Fontanilla *et al.*, *Biochem.*, **2008**, 47, 7205-7217

2.2 La protéine σ_2

La protéine σ_2 est bien moins caractérisée que la protéine σ_1 . Il s'agit d'une protéine bien plus petite dont le poids moléculaire avoisine les 18-21 kDa.^{134,135} Le gène de cette protéine n'a pas encore été cloné ni complètement caractérisé à ce jour. Elle pourrait correspondre en fait à une famille de site différente.¹⁴⁸

3. Distribution anatomique

La distribution anatomique de la protéine σ a longuement été étudiée et, est aujourd'hui bien caractérisée. Il a ainsi été montré que les récepteurs σ étaient aussi bien présents au niveau du système nerveux central qu'au niveau périphérique.

3.1 Localisation centrale

Dans un premier temps, les récepteurs σ ont été marqués et visualisés grâce à l'utilisation de radioligands tels que [³H] (+)-3-PPP, [³H]-SKF 10,047, [³H]-DTG ou encore [³H]NE-100.^{149,150,151} Ces différentes études ont montré une concentration des récepteurs σ au niveau des structures limbiques, des aires du cerveau antérieur, du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, du noyau accumbens et du noyau thalamique antériodorsal.

Plus récemment, des études plus approfondies utilisant des techniques comme l'hybridation *in situ* ou l'immunohistochimie ont permis de différencier les récepteurs σ_1 des récepteurs σ_2 et ont ainsi montré une localisation différente au sein du système nerveux central.^{152,153} En effet, la protéine σ_1 est concentrée au niveau des aires limbiques, des couches supérieures du cortex, de l'hypothalamus, du noyau thalamique, du septum, du raphé, de la substance noire, du locus coeruleus et du cervelet. Des études récentes ont même confirmé la présence de la protéine σ_1 dans les neurones, les oligodendrocytes et dans les cellules de Schwann.¹⁵⁴ En revanche, peu de régions du cerveau semblent enrichies en σ_2 . Seules les aires qui contrôlent la posture et le mouvement (striatum et cortex) exprimeraient la protéine σ_2 .

¹⁴⁸ T. Maurice *et al.*, *Brain Res.*, **2001**, 37, 116-132

¹⁴⁹ N. N. Samoilova *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **1988**, 147, 259-264

¹⁵⁰ B. L. Largent *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1986**, 238, 739-748

¹⁵¹ S. Okuyama *et al.*, *Life Sci.*, **1995**, 57, 333-337

¹⁵² G. Alonso *et al.*, *Neurosci.*, **2000**, 97, 155-170

¹⁵³ D. Zamanillo *et al.*, *Neurosci. Lett.*, **2000**, 282, 169-172

¹⁵⁴ G. Palacios *et al.*, *Brain Res.*, **2004**, 1007, 65-70

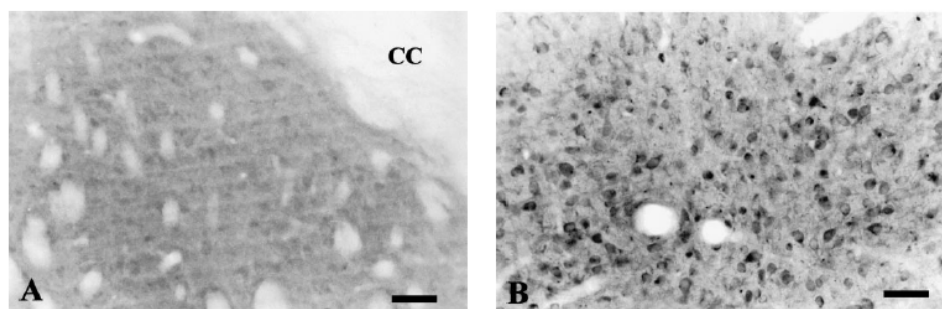


Figure 28 : Micrographies au microscope optique du récepteur σ_1 immunomarcué dans le striatum (A) et le septum (B).¹⁵² A) Immunomarcage faible dans le striatum dû à l'absence de récepteurs σ_1 . B) Immunomarcage intense résultant d'une concentration élevée de récepteurs σ_1 dans le septum.

3.2 Localisation périphérique

En plus du système nerveux central, les récepteurs σ_1 sont aussi largement distribués au niveau des organes périphériques. Effectivement, on les retrouve dans le foie, les reins, les intestins, le cœur et les organes sexuels. De même que pour σ_1 , les récepteurs σ_2 sont présents dans de nombreux organes et notamment avec une forte densité au niveau du foie et des reins.¹⁴³

3.3 Localisation cellulaire

Au niveau cellulaire, la protéine σ_1 est exprimée non seulement sur le réticulum endoplasmique (RE) mais aussi sur la membrane cellulaire et mitochondriale.¹⁵⁵ Cette localisation suggère donc la translocation possible de la protéine du RE vers la membrane cellulaire ou mitochondriale suite à l'activation par un ligand.¹⁵⁶

Différentes études ont suggéré que la protéine σ_2 pourrait également être une protéine intracellulaire située au niveau de la membrane mitochondriale et du RE.¹⁵⁷

4. Mode de transduction

Beaucoup de récepteurs aux neurotransmetteurs sont couplés à des protéines G. Ces protéines jouent un rôle important dans la modulation du signal de transduction.

Les premières études sur les récepteurs σ_1 ont suggéré l'existence d'un couplage aux protéines G.¹⁵⁸ Cependant, leur structure à seulement deux domaines transmembranaires diffère totalement de la structure à sept domaines transmembranaires partagée par les RCPG. D'autres études ont donc montré que les récepteurs σ_1 n'étaient pas directement couplés aux protéines G ou alors de manière très

¹⁵⁵ S. W. Mc Lean, E., *Neurosci.*, **1988**, 25, 259-269

¹⁵⁶ T. Hayashi *et al.*, *Science*, **2001**, 98, 491-491

¹⁵⁷ W. D. Bowen, *Pharmaceut. Acta Helv.*, **2000**, 74, 211-218

¹⁵⁸ J. H. Connick *et al.*, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1992**, 107, 726-731

particulière.¹⁵⁹ Ainsi, pour exercer leurs fonctions physiologiques, ils utiliseraient un mode de transduction unique.

Les récepteurs σ_1 sont des protéines dynamiques identifiées comme des chaperons moléculaires dont l'activité est régulée par des ligands. Ils agissent en tant que modulateurs de la signalisation intracellulaire encourus lors de l'activation de plusieurs récepteurs, canaux ioniques, transporteurs et enzymes, et sont ainsi impliqués dans la modulation de différentes fonctions physiologiques.^{146,160} En tant que protéines chaperonnes, leur activité modulatrice exercée sur les protéines cibles peut être améliorée ou inhibée par l'action d'agonistes ou d'antagonistes (Figure 29).¹⁶¹ Dans des conditions physiologiques normales, la majorité des protéines cibles n'est pas affectée. L'assistance de la protéine σ_1 est réclamée uniquement dans des conditions anormales ou de stress.

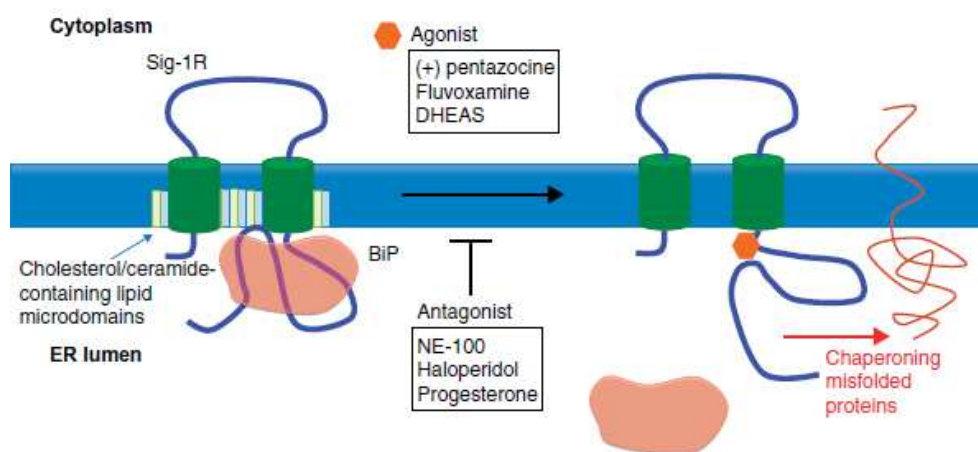


Figure 29 : Régulation de l'activité chaperonne par les ligands de la protéine σ_1 .¹⁶¹

Au niveau cellulaire, les récepteurs σ_1 résident essentiellement au niveau de la membrane MAM (*Mitochondrion-Associated ER Membrane*) entre le RE et la mitochondrie, où ils régulent la signalisation calcique entre les deux organelles *via* les récepteurs à l'inositol triphosphate (IP_3) (Figure 29 et Figure 30).¹⁶² En effet, les récepteurs σ_1 forment un complexe avec une autre protéine chaperonne, la protéine Bip (ou GRP78). A des concentrations physiologiques en calcium ($\geq 0,5$ mM), le complexe σ_1 -Bip se trouve à l'état de repos ce qui minimise l'activité chaperonne de la protéine σ_1 et de Bip. A la suite d'un stress ou dans des conditions pathologiques, la concentration en Ca^{2+} au niveau du RE chute considérablement, et la protéine σ_1 se dissocie alors de la protéine Bip pour aller s'associer aux récepteurs à IP_3 . Ces récepteurs sont des protéines très instables qui sont facilement dégradées par les protéasomes. Une association avec la protéine σ_1 permet leur stabilisation sur MAM.

¹⁵⁹ W. Hong *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **2000**, 408, 117-125

¹⁶⁰ T. Maurice *et al.*, *Pharmacol. Therap.*, **2009**, 124, 195-206

¹⁶¹ T. Hayashi *et al.*, *Expert Opin. Ther. Targets*, **2011**, 15, 557-577

¹⁶² T. Hayashi *et al.*, *Cell*, **2007**, 131, 596-610

Ceci a pour effet de prolonger le signal calcique dans la mitochondrie et de contrôler l'homéostasie calcique.

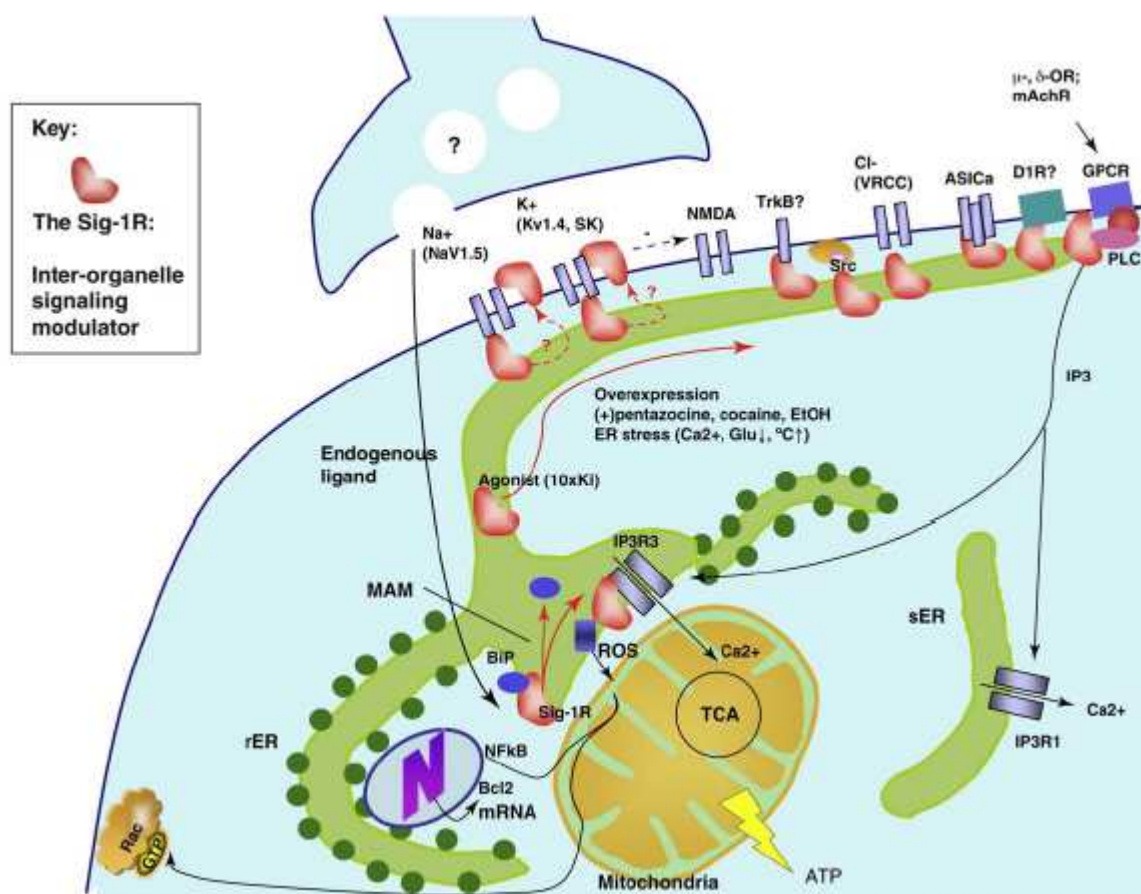


Figure 30 : Activité chaperonne de la protéine σ_1 .¹⁴⁶

De plus, en présence d'agoniste ou lors d'un stress prolongé du RE, les récepteurs σ_1 peuvent se délocaliser au niveau de la membranaire cellulaire où ils vont interagir avec de nombreux canaux ioniques (K^+ , Na^+ , Ca^{2+})¹⁴², des récepteurs (NMDA, D1R, GPCR)^{163,164}, ou des kinases (Src). Toutefois, il est important de préciser que si l'ensemble de ces composants cellulaires sont conformationnellement stables, l'interaction avec la protéine σ_1 n'affecte pas leur fonctionnement normal. En effet, la protéine n'exercerait son activité chaperonne qu'en présence de protéines cibles anormales.¹⁴⁶

Enfin, il a également été démontré que les récepteurs σ_1 protègent les cellules contre le stress oxydant en contrôlant le niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). En effet, ils sont capables de diminuer la concentration d'ERO grâce à une régulation positive des gènes antioxydants comme SOD1 et NQO1 via l'activation d'éléments de réponses antioxydants.¹⁶⁵ Cette diminution d'espèces oxydantes entraîne, non seulement une augmentation de la transcription du gène anti-apoptotique Bcl2

¹⁶³ M. Martina *et al.*, *J. Physiol.*, **2007**, 578, 143-157

¹⁶⁴ Y. Fu *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, 1803, 1396-1408

¹⁶⁵ A. Pal *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **2012**, 682, 12-20

par l'activation du facteur nucléaire NFκB¹⁶⁶ ; mais également une augmentation de la voie Rac1-GTP qui permet de contrôler l'arborisation dendritique des neurones¹⁶⁷.

En résumé, la protéine σ_1 contrôle non seulement la libération de calcium au niveau du récepteur à l'IP₃ mais aussi la communication calcique entre la mitochondrie et le RE. Enfin, elle modifie le trafic intracellulaire et module les différents systèmes de neurotransmission tout en protégeant les cellules contre le stress oxydant.

5. Ligands endogènes

Un grand nombre de molécules dont les benzomorphanes, la PCP et ses dérivés, la cocaïne, l'amphétamine et certains neuroleptiques sont capables de se lier aux récepteurs σ .¹⁴⁸ De nombreuses études ont été réalisées sur la capacité d'interagir avec le site de liaison σ de divers neurotransmetteurs¹⁶⁸ (sérotonine, dopamine, histamine et noradrénaline), acides aminés¹⁶⁹ (glutamate, glycine, aspartate et cystéine) et peptides¹⁷⁰ (endorphine, dynorphine et enképhaline). Malheureusement, aucune de ces molécules n'a donné de résultats concluants. D'autre part, une attention toute particulière a été portée aux peptides liés au neuropeptide Y, au calcitonin-gene-related peptide (CGRP) et à la substance P qui montraient des interactions *in vivo*.¹⁴³ Cependant, les affinités n'étaient pas assez élevées pour que ces molécules soient considérées comme des ligands endogènes du site de liaison σ .

Les stéroïdes ont aussi été considérés comme potentiels ligands endogènes. En effet, de nombreux stéroïdes neuroactifs interagissent avec les sites de liaisons σ_1 . Les agonistes et antagonistes les plus importants sont respectivement, la DHEA et la progestérone (Figure 31).¹⁷¹ Toutefois, des études ont montré qu'un grand nombre de ligands σ_1 dont l'halopéridol et (+)-3-PPP étaient capables d'inhiber l'interaction entre la progestérone et la protéine σ_1 .¹⁷² Ces résultats ont donc remis en question le rôle de ligand endogène des stéroïdes envers le site de liaison σ .

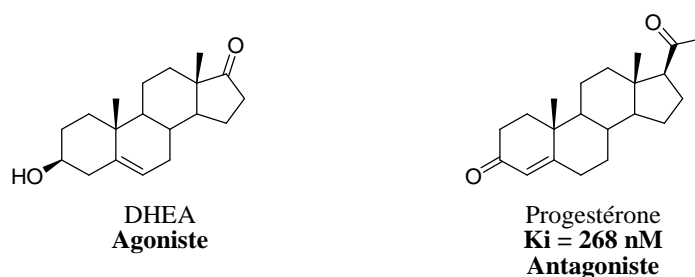


Figure 31 : Les principaux agonistes et antagonistes σ_1 de types stéroïdes.

¹⁶⁶ J. Meunier *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2010**, 332, 388-397

¹⁶⁷ S.-Y. Tsai *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, 106, 22468-22473

¹⁶⁸ E. Weber *et al.*, *Proceedings Nat. Acad. Sci.*, **1986**, 83, 8784-8788

¹⁶⁹ M. D. Klein *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1989**, 251, 207-215

¹⁷⁰ D. L. DeHaven-Hudkins *et al.*, *Life Sci.*, **1992**, 50, 65-70

¹⁷¹ F. P. Monnet *et al.*, *J. Pharmacol. Sci.*, **2006**, 100, 93-118

¹⁷² C. Meyer *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **1998**, 347, 293-299

Finalement, malgré les avancées considérables effectuées dans l'étude des récepteurs σ aux cours des dernières années, aucun ligand endogène spécifique de ce site de liaison n'a encore été identifié. Or, l'identification d'un ligand endogène de la protéine σ permettrait de mieux comprendre le rôle de cette dernière dans les fonctions physiologiques et physiopathologiques du cerveau.

III. Perspectives thérapeutiques

De part sa localisation dans le système nerveux central, la protéine σ_1 serait impliquée dans la modulation des différents systèmes de neurotransmission. Par conséquent, elle affecterait certaines fonctions comme la nociception, la mémoire, la cognition et serait impliquée dans de nombreux désordres neurologiques comme la schizophrénie et la dépression (Figure 32).

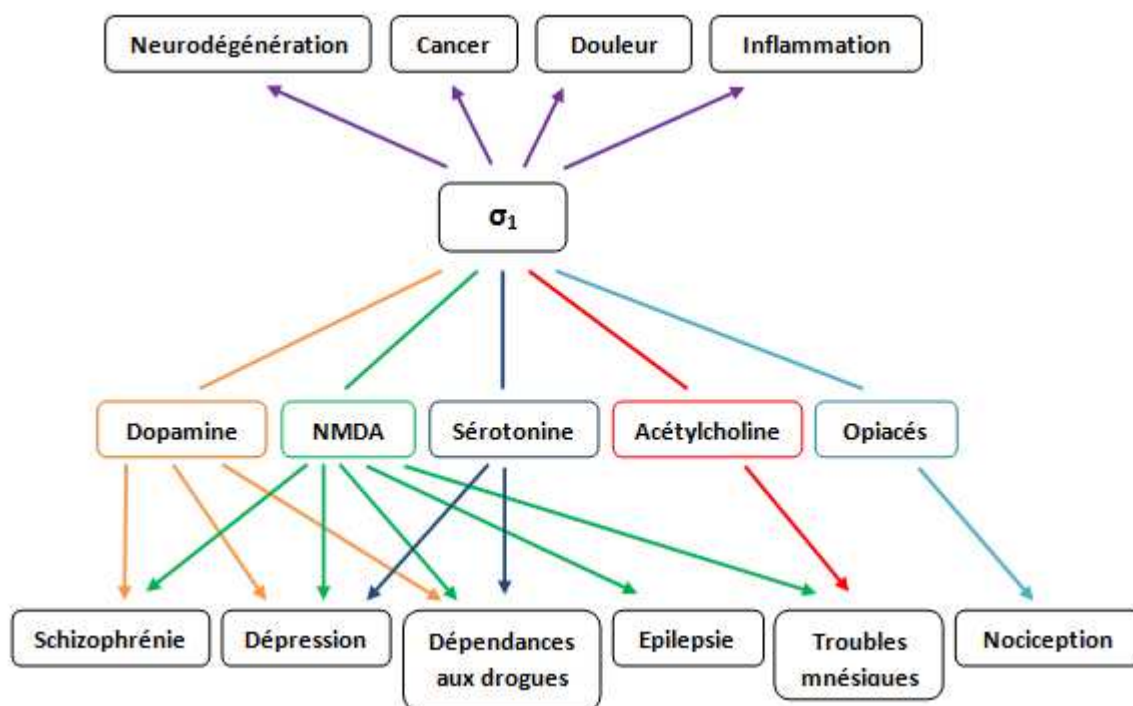


Figure 32 : Rôle et potentiel thérapeutique de la protéine σ_1 .

En 2010, Fu *et al*¹⁶⁴ ont démontré que les récepteurs σ_1 amplifiaient la signalisation des récepteurs dopaminergiques présynaptiques dans le cortex préfrontal. En effet, l'activation des récepteurs σ_1 entraînerait la modulation des taux de dopamine dans un grand nombre de régions du cerveau.¹⁷³ Ainsi la protéine σ serait une nouvelle cible thérapeutique dans le développement de traitement pour la schizophrénie, la dépression ou encore l'addiction aux drogues.

Parmi les effets modulateurs de la protéine σ_1 sur les systèmes de neurotransmission, la modulation du système glutamatergique par l'intermédiaire des récepteurs NMDA est à ce jour la mieux décrite dans la littérature. En effet, il a été reporté que les récepteurs σ_1 pouvaient augmenter spontanément la libération de glutamate dans l'hippocampe, potentialiser la libération de glutamate induite par les facteurs neurotrophiques ainsi que l'augmentation de la concentration en calcium induite par le glutamate dans les neurones pyramidaux.¹⁴⁵ De plus, des études ont montré que les récepteurs σ_1

¹⁷³ D. T. Ault *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **1999**, 386, 145-153

pouvaient moduler les autres systèmes de neurotransmission par l'intermédiaire des récepteurs NMDA.

Ainsi, la protéine σ_1 modulerait de nombreux systèmes de neurotransmission dont les systèmes cholinergique, sérotoninergique et dopaminergique, et il semblerait que la modulation de la réponse NMDA par cette protéine jouerait un rôle central dans la modulation des autres systèmes. La protéine σ_1 serait ainsi associée à certaines fonctions ou troubles dont l'origine est une dérégulation des neurotransmetteurs et par conséquent impliquée dans un grand nombre de désordres neurologiques et psychiatriques. De plus, elle serait surexprimée dans les cellules tumorales, résultant une implication possible dans le traitement du cancer. Le potentiel thérapeutique de la protéine σ_1 dans chacune des pathologies sera expliqué plus en détails dans les paragraphes suivants.

La protéine σ_2 serait impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire. Elle serait ainsi capable d'induire une voie apoptotique sur des lignées de cellules cancéreuses. Les ligands de ce site auraient donc une application dans le traitement du cancer.¹⁷⁰

1. Les troubles psychiatriques

Les troubles psychiatriques regroupent un vaste ensemble de pathologies dont les symptômes diffèrent. Ils se caractérisent généralement par une combinaison de pensées, d'émotions, de comportements et de rapports avec autrui anormaux. Ces troubles comprennent entre autres la schizophrénie, les états dépressifs et d'anxiété.

1.1 La schizophrénie

La schizophrénie est une maladie caractérisée par un sérieux désordre du SNC : perturbation de l'humeur, des pensées, du comportement, de la conscience de soi et des relations avec le monde extérieurs. Dans cette maladie, on distingue les symptômes positifs tels que les hallucinations, les psychoses, la paranoïa et les troubles du comportement, des symptômes négatifs tels que la perte d'énergie, d'initiative et la désociabilisation.

Les antipsychotiques usuellement utilisés dans le traitement de la schizophrénie agissent principalement sur les récepteurs dopaminergiques D_2 . Les antagonistes de ces récepteurs sont efficaces dans l'amélioration des symptômes positifs mais ne le sont toutefois pas suffisamment dans l'amélioration des symptômes négatifs. De plus, ils induisent des effets extrapyramidaux qui se manifestent par des contractions involontaires des muscles, entraînant une raideur et une position crispée. Dans le but d'éviter ces effets indésirables et d'améliorer les effets sur les symptômes négatifs, de nouveaux composés agissant sur différents systèmes de neurotransmission en plus du système dopaminergique ont été développés. Parmi ces potentiels agents antipsychotiques, certains

possèdent une affinité pour les récepteurs σ_1 comme le rimcazole^{174,175}, le BMY-14802¹⁷⁶ et le NE-100¹⁷⁷ (Figure 33).

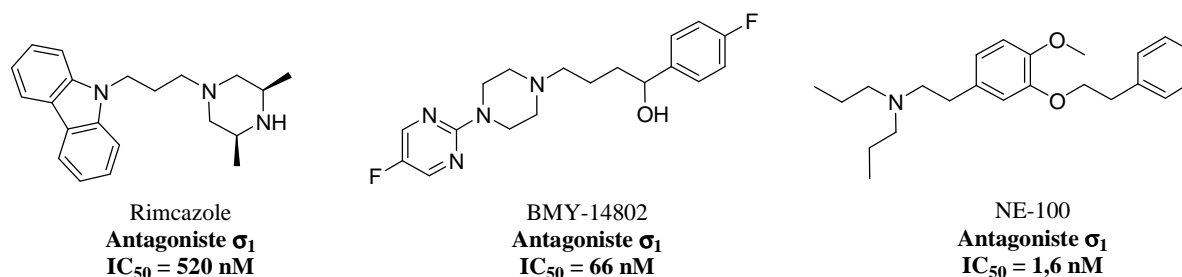


Figure 33 : Potentiel agents antipsychotiques possédant des affinités σ_1 .

Le rimcazole (BM234U) est le premier ligand σ_1 à être proposé dans le traitement de la schizophrénie. Toutefois, des études cliniques ont montré par la suite qu'il s'agissait d'un agent antipsychotique inefficace sur cette pathologie. Des résultats identiques ont été obtenus lors de l'étude du BMY-14802, un antagoniste σ_1 possédant une forte affinité pour les récepteurs 5HT₂ et D₄.¹⁷⁶ Aucune donnée n'a actuellement été publiée sur le NE-100 et son potentiel thérapeutique dans le traitement de la schizophrénie.

Compte tenu de ces résultats, aucun antagoniste σ_1 n'a encore démontré un réel potentiel thérapeutique pour le traitement de la schizophrénie. Toutefois, d'après l'ensemble des données précliniques, les récepteurs σ_1 seraient efficaces sur les symptômes négatifs et non sur les symptômes positifs. Des agents mixtes σ /autre récepteur seraient peut être la solution pour traiter l'ensemble des symptômes de cette pathologie.

1.2 La dépression

L'hypothèse d'utiliser des ligands σ_1 dans le traitement de la dépression provient du fait qu'une substance capable de réduire la neurotransmission au niveau du système NMDA peut représenter une nouvelle classe d'antidépresseurs.¹⁷⁸

De nombreux agonistes σ_1 de structure diverses dont la (+)-pentazocine, l'igmésine et le PRE-084 (Figure 34) ont démontré de bonnes propriétés antidépressives dans des modèles animaux comme la nage forcée et la queue en suspension.^{179,180} Ces effets étaient bloqués par des antagonistes σ_1 tel que le NE-100 ou le BD-1047. L'igmésine fut le premier agoniste σ_1 à faire l'objet d'essais cliniques pour le traitement des troubles dépressifs majeurs. Ces études ont démontré une amélioration significative

¹⁷⁴ R. M. Ferris *et al.*, *Life sci.*, **1986**, 38, 2329-2337

¹⁷⁵ D. L. Gilmore *et al.*, *CNS Drug Rev.*, **2004**, 10, 1-22

¹⁷⁶ G. R. Gewirtz *et al.*, *Neuropsychopharmacol.*, **1994**, 10, 37-40

¹⁷⁷ S. Ogawa *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **1994**, 263, 9-15

¹⁷⁸ R. Trullas *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **1990**, 185, 1-10

¹⁷⁹ M. Ukai *et al.*, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **1998**, 61, 247-252

¹⁸⁰ A. Urani *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2001**, 298, 1269-1279

chez des patients sévèrement dépressifs. Malgré cette activité, ce composé a été arrêté en phase III pour des raisons économiques et par manque de résultats concluants.¹⁸¹

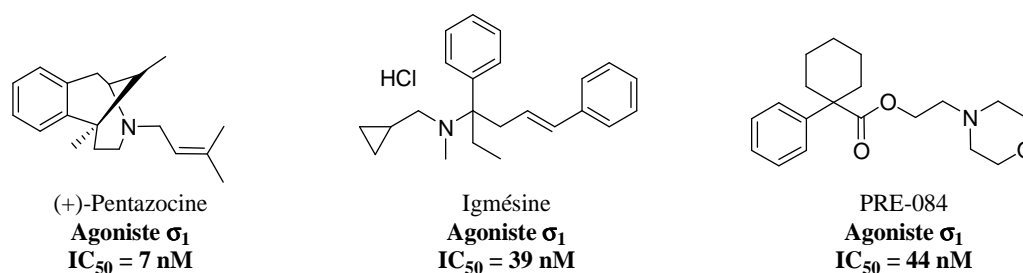


Figure 34 : Ligands σ_1 possédant des propriétés antidépresseives.

Les mécanismes d'action des agonistes σ_1 dans la dépression commencent seulement à être caractérisés. Comme décrit précédemment, σ_1 est une protéine dynamique qui régule le taux et la mobilisation calcique dans la cellule. Les effets antidépresseurs induits par les agonistes σ_1 seraient liés à cette mobilisation calcique.¹⁸² En effet, il semblerait qu'en créant une hypersensibilisation du signal de transduction, la protéine σ_1 produit une rapide modulation du système sérotoninergique dans le noyau raphé dorsal et du système glutamatergique dans l'hippocampe.^{183,184,185} Ces deux structures sont importantes dans la physiopathologie de la dépression.

Ainsi, pour toutes ces raisons, il semblerait que les agonistes σ_1 possèdent un potentiel thérapeutique intéressant pour le traitement de la dépression.

2. La dépendance aux drogues

La dépendance aux drogues est à l'heure actuelle un important problème économique et social à travers le monde. Beaucoup de drogues n'ont pas de thérapie adéquate visant à traiter à la fois la dépendance et les complications associées à leur consommation.

De nombreuses études *in vivo* ont montré que les récepteurs σ_1 étaient capables d'améliorer des effets motivationnels et comportementaux de nombreuses drogues dont la cocaïne, l'amphétamine, l'alcool et la nicotine.¹⁸⁶ Maurice *et al.*¹⁸⁷ ont montré que les effets motivationnels de l'alcool, mesurés chez les souris par conditionnement préférentiel de place (CPP) et par mesure de l'activité locomotrice, sont régulés par les ligands σ_1 . En effet, l'agoniste σ_1 PRE-084 (Figure 34) potentialise, tandis que l'antagoniste BD-1047 inhibe les différents comportements induits par une administration accrue d'alcool. Ainsi, il semblerait que l'activation des récepteurs σ_1 soit un élément nécessaire des

¹⁸¹ H. P. Volz *et al.*, *Pharmacopsychiatry*, **2004**, 37, 214-220

¹⁸² T. Hayashi *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2000**, 293, 788-798

¹⁸³ J. E. Bermack *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **2001**, 134, 691-699

¹⁸⁴ J. E. Bermack *et al.*, *Synapse*, **2005**, 55, 37-44

¹⁸⁵ J. E. Bermack *et al.*, *J. Pharmacol. Sci.*, **2005**, 97, 317-336

¹⁸⁶ M. J. Robson *et al.*, *Curr. Pharm. Des.*, **2012**, 18, 902-919

¹⁸⁷ T. C. Maurice, M. *et al.*, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **2003**, 74, 869-876

effets motivationnels induits par l'alcool. D'autre part, les effets induits par la cocaïne semblent également dépendre de l'activation des récepteurs σ_1 . Les antagonistes σ_1 tels que BD-1047 ou BD1008 bloqueraient l'hyperactivité et le CPP induite par la drogue^{188,189}, tandis que des agonistes comme l'ALL127 potentialiseraient ces effets.¹⁹⁰

L'ensemble de ces données semblent indiquer les récepteurs σ_1 comme nouvelle cible pharmacologique pour le traitement de la dépendance aux drogues.

3. Le cancer

La protéine σ est surexprimée dans les cellules tumorales, de nombreux tissus humains dont les carcinomes de poumons, de rein, de colon, les tumeurs du cerveau, du sein et de la prostate.¹⁹¹ Différentes études ont montré qu'une modulation des deux sous-types σ_1 et σ_2 entraînait une inhibition de la prolifération cellulaire de carcinomes et de mélanomes ainsi qu'une induction de l'apoptose dans des lignées cellulaires de cancer du sein et du colon.¹⁹²

Les récepteurs σ_1 joueraient également un rôle dans les propriétés métastatiques sur des lignées de cellules cancéreuses. En effet, le 4-IBP (Figure 35), un agoniste σ_1 , permet non seulement de diminuer la migration *in vitro* de cellules cancéreuses humaines dont les glioblastomes mais aussi des sensibiliser ces cellules aux dommages cytotoxiques infligés par les médicaments pro-apoptotiques ou pro-autophagiques.¹⁹³ De plus, le SR31747A (Figure 35), un autre agoniste sélectif σ_1 possédant une activité d'immunorégulation et d'inhibition de la prolifération cellulaire, a été évalué en essais clinique de phase II dans le cancer de la prostate.¹⁹⁴ Actuellement, aucun résultat n'a été publié sur cette étude et le composé n'a pas été engagé dans des essais de phase III.

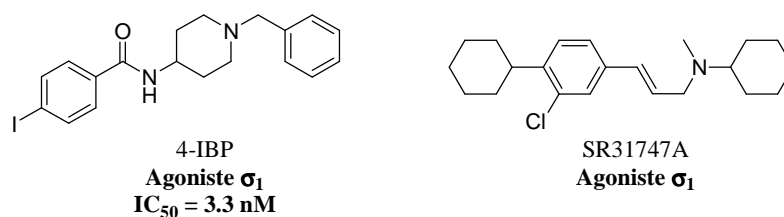


Figure 35 : Agonistes σ_1 possédant des propriétés anticancéreuses.

¹⁸⁸ K. A. McCracken *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **1999**, 365, 35-38

¹⁸⁹ K. A. McCracken *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **1999**, 370, 225-232

¹⁹⁰ M. Toussaint *et al.*, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **2009**, 19, 504-515

¹⁹¹ E. Aydar *et al.*, *Cancer Res.*, **2004**, 64, 5029-5035

¹⁹² B. A. Spruce *et al.*, *Cancer Res.*, **2004**, 64, 4875-4886

¹⁹³ V. Megalizzi *et al.*, *Neoplasia*, **2007**, 9, 358-369

¹⁹⁴ Evaluation of SR31747A versus placebo in androgen-independent non metastatic prostate Cancer (ODYSSEY). <http://clinicaltrials.gov>

Enfin, la capacité des ligands σ_2 à induire l'apoptose ayant également été démontrée¹⁹⁵, la conception de nouvelles molécules possédant une affinité mixte σ_1 et σ_2 a été suggérée pour le traitement de certains types de cancer.¹⁹⁶

4. La douleur

La douleur est l'une des plaintes cliniques les plus courantes, mais en dépit de sa prévalence de nombreuses personnes souffrent toujours de douleur non soulagée ou non traitée. Malgré de nombreux efforts, aucune innovation thérapeutique n'est apparue au cours des dernières années et la gestion de la douleur demeure un réel défi clinique.

Les récepteurs σ_1 pourraient représenter une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la douleur.¹⁹⁷ En effet, ils sont capables non seulement de moduler la réponse analgésique des opioïdes¹⁹⁸, mais aussi de jouer un rôle dans la modulation de la douleur en leur absence¹⁹⁹. De nombreuses études ont montré que les antagonistes σ_1 augmentaient les effets analgésiques induits par la morphine et d'autres agonistes des récepteurs opioïdes^{200, 201}; contrairement aux agonistes σ_1 qui réduiraient ces effets²⁰⁰. Il est également important de préciser que cette potentialisation des effets des opioïdes serait limitée aux effets analgésiques et ne toucherait pas les effets secondaires tels que l'inhibition du transit gastro-intestinal. D'autre part, les récepteurs σ_1 semblent également jouer un rôle important dans la sensibilisation centrale et l'hypersensibilité à la douleur, ainsi que dans la modulation de la nociception en absence d'analgésiques.^{197, 202} Ces effets résulteraient d'une modulation des cascades intracellulaires calcium dépendantes et de l'augmentation de la réponse NMDA.

L'inhibition des récepteurs σ_1 semblent être une condition suffisante afin d'obtenir un effet thérapeutique sur une douleur persistante. Le E-52862 (Figure 36), un antagoniste sélectif σ_1 développé par Esteve, est actuellement en essai clinique de phase II dans le traitement de la douleur neuropathique. Au cours des phases préliminaires, il a démontré une bonne tolérabilité, une non toxicité et un profil pharmacocinétique compatible avec une administration *per os*.^{203, 204}

Ainsi, compte tenu de tous ces résultats, les antagonistes des récepteurs σ_1 semblent posséder un potentiel thérapeutique intéressant pour le traitement de la douleur persistante.

¹⁹⁵ K. W. Crawford *et al.*, *Cancer Res.*, **2002**, 62, 313-322

¹⁹⁶ A. van Waarde *et al.*, *Curr. Pharm. Des.*, **2010**, 16, 3519-3537

¹⁹⁷ D. Zamanillo *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **2013**, In press,

¹⁹⁸ C. C. Chien *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **1993**, 250, 7-8

¹⁹⁹ J. L. Diaz *et al.*, *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, **2009**, 9, 172-183

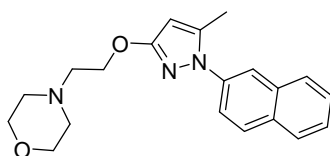
²⁰⁰ C. C. Chien *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1994**, 271, 1583-1590

²⁰¹ M. King *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **1997**, 331, 5-6

²⁰² E. Drews *et al.*, *Pain*, **2009**, 145, 269-270

²⁰³ L. Romero *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, 166, 2289-2306

²⁰⁴ M. Abadias *et al.*, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2013**, 75, 103-117



E-52862
Antagoniste σ_1
 $IC_{50} = 32.9 \text{ nM}$

Figure 36 : E-52862, antagoniste σ_1 évalué en essais clinique de phase II dans le traitement de la douleur.

5. Les troubles neurologiques

Les troubles neurologiques correspondent à des anomalies structurales, biochimiques ou électriques au niveau SNC. Ils sont caractérisés par une variété de symptômes dont des paralysies, des faiblesses musculaires, des pertes de sensation, des douleurs et des convulsions. Il existe de nombreux troubles neurologiques, communs ou beaucoup plus rares, comme les migraines, l'ischémie cérébrale (ou AVC) et l'épilepsie.

5.1 L'ischémie

L'ischémie cérébrale ou AVC correspond à une perte rapide de la fonction cérébrale due à une perturbation dans l'approvisionnement en sang du cerveau. Ce phénomène conduit à des lésions cérébrales plus ou moins sévères qui pourraient entraîner des incapacités motrices, visuelles ou liées à la parole. La récupération est généralement lente et incomplète.

Même si les mécanismes pathologiques ne sont pas encore tous élucidés, il a été démontré que les lésions provoquées par une ischémie seraient essentiellement causées par un stress oxydant, une inflammation et une accumulation excessive de glutamate dans les espaces extracellulaires. C'est pourquoi les ligands des récepteurs σ_1 pourraient être utilisés dans le traitement de l'ischémie pour leurs propriétés neuroprotectrices.

Le 4-PPBP (Figure 37), un agoniste σ_1 , a été étudié dans un modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez le rat (OACM). Administré par voie intraveineuse pendant 24 heures, il permet de réduire significativement le volume de l'infarctus dans le cortex.²⁰⁵ Ses propriétés neuroprotectrices seraient corrélées à la diminution de la production d'acide nitrique et par conséquent du stress oxydant dans le cerveau. D'autre part, une autre étude menée par Yang *et al.*²⁰⁶ a également démontré que l'action neuroprotectrice de ce ligand était liée à la préservation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2.

Ces propriétés neuroprotectrices ont aussi été mises en évidence dans un modèle OACM avec un ligand non sélectif σ_1/σ_2 , le DTG (Figure 37). Administré sous-cutané 24 heures après l'occlusion, le

²⁰⁵ I. Harukuni *et al.*, *Stroke*, **2000**, 31, 976-982

²⁰⁶ S. Yang *et al.*, *Anesth. Analg.*, **2007**, 104, 1179-1184

DTG permet de réduire de 80% l'infarctus au niveau des deux régions corticale/striatale et corticale/hypocampique.²⁰⁷ Son efficacité résulterait de la diminution de la réponse inflammatoire dans le cerveau. Des résultats similaires ont aussi été observés avec le dimemorphan (Figure 37) et le PRE-084 (Figure 34) qui permettent d'améliorer respectivement de 70% et 50% le volume de l'infarctus.²⁰⁸ Ces ligands seraient responsables de la diminution de l'accumulation de glutamate dans les espaces extracellulaires et par conséquent de la réduction de l'exotoxicité qui en résulte.

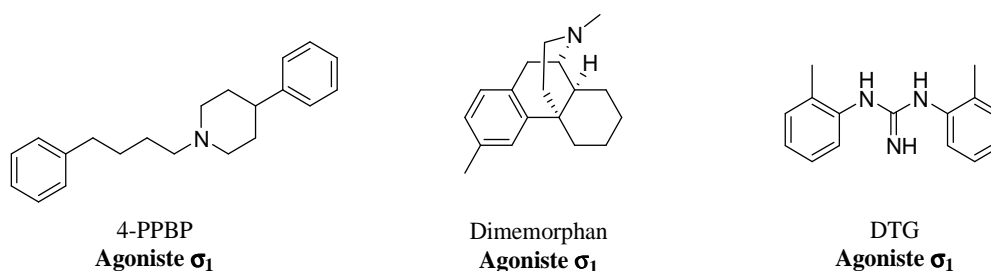


Figure 37 : Agonistes σ_1 possédant des propriétés anti-ischémiques.

Enfin, l'activation des récepteurs σ_1 stimulerait également la récupération après un AVC en améliorant le transport cellulaire des biomolécules nécessaires à la réparation du cerveau.²⁰⁹ Ainsi, en plus de leurs propriétés neuroprotectrices, les ligands σ_1 offrent de nouvelles possibilités pour le traitement des ischémies cérébrales.

5.2 L'épilepsie

L'épilepsie est l'expression d'un fonctionnement anormal de l'activité électrique du cerveau et se manifeste par des crises imprévisibles, soudaines et souvent très brèves qui prennent des formes très diverses.

Les agonistes σ_1 ont longtemps été considérés comme des agents potentiellement anticonvulsivants pouvant être utilisés dans le traitement de l'épilepsie.²¹⁰ En effet, le dextrométhorphan par sa liaison aux récepteurs σ_1 empêcherait les convulsions induites par le triméthylétain.²¹¹ Toutefois, aucune nouvelle donnée concernant le potentiel thérapeutique des récepteurs σ_1 pour le traitement de l'épilepsie n'a été publiée au cours de ces dernières années.

5.3 L'apprentissage et la mémoire

Les systèmes centraux cholinergiques et glutamatergiques jouent un rôle important dans l'apprentissage et la mémorisation. La fonction cholinergique est perturbée dans certaines pathologies

²⁰⁷ C. T. Ajmo *et al.*, *Curr. Neurovasc. Res.*, **2006**, 3, 89-98

²⁰⁸ Y.-C. Shen *et al.*, *J. Neurochem.*, **2008**, 104, 558-572

²⁰⁹ K. Ruscher *et al.*, *Brain*, **2011**, 134, 732-746

²¹⁰ A. Meurs *et al.*, *Eur. J. Neurosci.*, **2007**, 26, 3079-3092

²¹¹ E.-J. Shin *et al.*, *Neurochem. Int.*, **2007**, 50, 791-799

de la mémoire comme l'amnésie et la maladie d'Alzheimer pour lesquelles des déficits de l'activité cholinergique corticale ont été observés. De plus, les récepteurs NMDA sont impliqués dans l'induction des différentes formes de plasticité synaptique qui sont présumées être le substrat synaptique des processus d'apprentissage et de mémorisation.

Les récepteurs σ_1 augmentent la libération d'acétylcholine non seulement dans l'hippocampe mais aussi dans le cortex frontal.²¹² Ainsi, ils auraient des effets bénéfiques dans de nombreux modèles d'amnésie. En effet, des études ont montré que certains ligands σ_1 empêchaient ou s'opposaient aux effets amnésiants induits par la scopolamine chez le rat et la souris.²¹³ Le SA-4503 (Figure 38), un ligand hautement sélectif des récepteurs σ_1 , est capable de reverser ces effets ainsi que d'atténuer l'altération de l'apprentissage chez l'animal présentant un dysfonctionnement cholinergique.²¹⁴ De plus, il montrerait aussi des effets anti-amnésiants provoqués par un blocage des récepteurs NMDA. Il atténuerait, effectivement, les altérations de la mémoire de référence induites par la dizocilpine, un antagoniste des récepteurs NMDA.²¹⁵

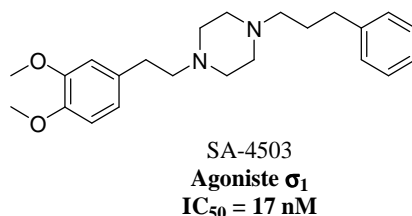


Figure 38 : SA-4503, agoniste sélectif σ_1 possédant des propriétés anti-amnésiques.

Enfin, les stéroïdes neuroactifs joueraient aussi un rôle dans la modulation de la mémoire par les récepteurs σ_1 . En effet, comme cela a été développé dans les paragraphes précédents, ils sont capables d'interagir avec la protéine σ_1 et peuvent aussi moduler les récepteurs GABAergiques et NMDA. La prégénolone et la DHEA, deux ligands des récepteurs σ_1 , ont montré la capacité d'augmenter les propriétés de rétention de la mémoire chez des souris possédant une altération de l'apprentissage.²¹⁶

6. Les maladies neurodégénératives

De part sa localisation au niveau du système nerveux central et son implication dans la modulation des différents systèmes de neurotransmission, la protéine σ_1 présente un potentiel thérapeutique important pour le traitement des MNDs. Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont montré l'engagement des récepteurs σ_1 dans des pathologies comme la maladie de Parkinson²¹⁷, la

²¹² K. Matsuno *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1993**, 265, 851-859

²¹³ B. Earley *et al.*, *Brain Res.*, **1991**, 546, 282-286

²¹⁴ T. Senda *et al.*, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **1998**, 59, 129-134

²¹⁵ L. B. Zou *et al.*, *Neuropharmacol.*, **2000**, 39, 1617-1627

²¹⁶ T. Maurice *et al.*, *Progress Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psy.*, **1997**, 21, 69-102

²¹⁷ T. Mori *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2012**, 341, 663-671

maladie de Charcot^{218,219} ou encore la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques. Seules les perspectives thérapeutiques de la protéine dans le traitement de ces deux dernières maladies seront développées dans les paragraphes suivants.

6.1 La maladie d'Alzheimer

Comme cela a été développé dans la partie I de ce chapitre, la MA est un désordre neurodégénératif progressif et fatal qui se manifeste principalement par une détérioration de la mémoire et des capacités cognitives. Les différentes recherches ont révélé que la MA résultait principalement de la présence de deux lésions : la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques séniles.

Les ligands σ_1 ayant montré une efficacité dans le traitement des troubles de la mémoire et des épisodes dépressifs, ont donc été testés dans le traitement de la MA. Des ligands sélectifs σ_1 comme SA-4503 (Figure 38), ou PRE-084 (Figure 34) sont capables d'atténuer les déficits de mémoire induits par une pathologie A β .²²⁰ Les premières preuves d'une activité neuroprotectrice des ligands σ_1 contre la toxicité induite par le peptide A β ont été mises en évidence par des études *in vivo* menées par Marrazzo *et al*²²¹ en 2005. En effet, dans une culture de neurones du cortex, la mort neuronale induite par la toxicité du peptide A β est bloquée par le ligand PRE-084. Cet effet neuroprotecteur est contrecarré par un antagoniste σ_1 . De plus, quand des composés sélectifs σ_1 tel que PRE-084 ou non sélectif mais agissant comme agoniste σ_1 tel que le donépézil sont co-administrés avec le peptide A β chez la souris, ils sont capables non seulement de bloquer la toxicité A β dans l'hippocampe mais aussi d'atténuer les déficits d'apprentissage et de mémoire. Par conséquent, les agonistes σ_1 pourraient être efficaces dans le traitement de la maladie d'Alzheimer puisqu'ils permettent à la fois d'atténuer les déficits cognitifs observés chez des malades et de réduire les dommages neuronaux.

Le donépézil (Figure 39), utilisé dans le traitement de la MA et commercialisé sous le nom d'Aricept® aurait aussi une action anti-amnésiante grâce à sa liaison avec σ_1 .^{222, 223} En effet, même s'il est utilisé dans le traitement de la MA pour son activité anticholinestérasique, il s'agit aussi d'un agoniste σ_1 de bonne affinité (IC₅₀ = 14,6 nM). Les effets anti-amnésiants produits par le donépézil contre l'altération de l'apprentissage induit par la dizocilpine ou le peptide A β sont bloqués par l'administration d'un antagoniste σ_1 , le BD-1047. De plus, l'administration du donépézil après l'administration du peptide A β chez la souris induit une neuroprotection complète. En comparaison, les autres inhibiteurs de cholinestérase ne montrent que des effets partiels dans les mêmes conditions.²²³ Ces résultats suggèrent qu'une partie des effets bénéfiques du donépézil se produisent

²¹⁸ A. Al-Saif *et al.*, *Ann. Neurol.*, **2011**, 70, 913-919

²¹⁹ T. A. Mavlyutov *et al.*, *Neurosci.*, **2013**, 240, 129-134

²²⁰ T. Maurice *et al.*, *Neurosci.*, **1997**, 83, 413-428

²²¹ A. Marrazzo *et al.*, *Neuroreport*, **2005**, 16, 1223-1226

²²² T. Maurice *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2006**, 317, 606-614

²²³ J. Meunier *et al.*, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2006**, 149, 998-1012

via les récepteurs σ_1 et que la neuroprotection conférée par une pré-administration de donépézil peut conduire à des moyens de prévention de la MA.

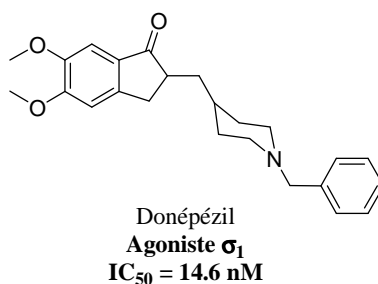


Figure 39 : Donépézil, agoniste σ_1 utilisé dans le traitement de la MA.

Enfin, l'anavex 2-73, un agoniste mixte des récepteurs σ_1 et muscarinique M1 et un antagoniste des récepteurs M2 et M3, est actuellement évalué en essais cliniques de phase II.²²⁴ Il permet de réduire les troubles de l'apprentissage et de la mémoire qui apparaissent au cours de la maladie.²²⁵ Cet agent neuroprotecteur a montré un mode d'action innovant en diminuant non seulement le stress oxydant présent au niveau du SNC mais aussi le stress du RE et de la mitochondrie, différents éléments impliqués dans la physiopathologie de la maladie. Il a été établi que ce composé était capable de bloquer l'apparition de protéine Tau hyperphosphorylée et de peptide A β_{42} dans un modèle *in vivo* de MA.²²⁶

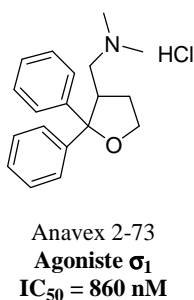


Figure 40 : Anavex 2-73, agoniste σ_1 en essais clinique de phase II dans le traitement de la MA.

Les agonistes σ_1 peuvent ainsi fournir un traitement alternatif contre les déficits cognitifs de la maladie tout en ralentissant sa physiopathologie.

6.2 La sclérose en plaques

Comme cela a été développé dans la partie I de ce chapitre, la sclérose en plaques est une maladie inflammatoire démyélinisante et dégénérative du SNC. Des infiltrats de cellules inflammatoires sont impliqués à tous les stades de la maladie. La localisation de la protéine σ_1 dans le SNC, notamment au

²²⁴ <http://anavex.com> (May 2013)

²²⁵ V. Villard *et al.*, *J. Psychopharmacol.*, **2011**, 25, 1101-17

²²⁶ V. Lahmy *et al.*, *Neuropsychopharmacol.*, **2013**, In press

niveau des neurones, des oligodendrocytes et des microglies, en fait une cible thérapeutique pour le traitement de la SEP.

Des études réalisées sur des modèles cellulaires ont montré qu'une activation des récepteurs σ_1 pouvait stimuler la myélinisation. En effet, l'éliprodil (Figure 41), un ligand non sélectif σ_1 , est capable de multiplier par 5 la myélinisation de cultures cellulaires dans des conditions défavorables au phénomène.²²⁷ D'autre part, de nombreuses études tendent à montrer que la protéine pourrait être impliquée dans la réponse immunitaire et/ou inflammatoire. Le SR-31747 (Figure 41), un agoniste sélectif σ_1 , a été évalué dans des modèles *in vitro* et *in vivo* afin de déterminer ces propriétés immunosuppressives.^{228, 229} Ce composé est capable d'inhiber *via* l'activation des récepteurs σ_1 , la réponse immune à certaines concentrations sans affecter la viabilité cellulaire. D'autre part, ses propriétés anti-inflammatoires ont également été démontrées et le SR-31747 inhibe la production de cytokine pro-inflammatoire comme l'IL-1 et l'IL-6.^{230, 231} Malgré ces résultats et son potentiel thérapeutique pour le traitement de SEP, ce composé n'a jamais fait l'objet d'un développement clinique.

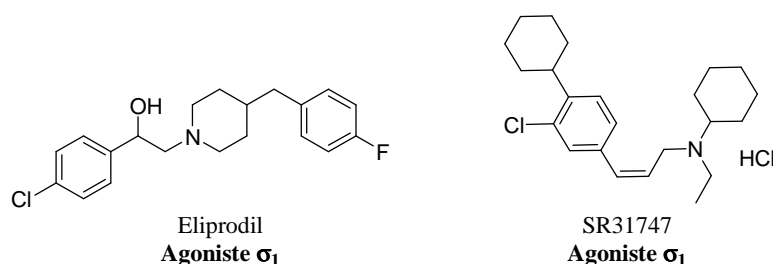


Figure 41 : Ligands σ_1 évalués dans des modèles *in vitro* pour le traitement de la SEP.

Il est bien décrit que l'activation de la protéine σ_1 conduit à des mécanismes myélinisants et neuroprotecteurs. Cependant, les études concernant son implication dans la réponse immunitaire restent peu nombreuses. Le peu de recherches effectuées dans ce domaine font de cette protéine une cible thérapeutique innovante pour le traitement de la sclérose en plaques.

²²⁷ C. Demerens *et al.*, *Neurol.*, **1999**, 52, 346-350

²²⁸ R. Paul *et al.*, *J. Neuroimmunol.*, **1994**, 52, 183-192

²²⁹ P. Casellas *et al.*, *J. Neuroimmunol.*, **1994**, 52, 193-203

²³⁰ J. M. Derocq *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1995**, 272, 224-230

²³¹ B. Bourrie *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, **1995**, 25, 2882-2887

BIBLIOGRAPHIE

1. Graeber, M. B.; Moran, L. B., Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: fashion, fiction, and facts. *Brain Pathol.* **2002**, 12, 385-390.
2. Teplow, D. B., *Molecular biology of neurodegenerative diseases*. Elsevier: **2012** Vol. 107.
3. Ibanez, V., Neurodegenerative diseases: clinical concerns. *Med. Nucl.* **2005**, 29, 213-219.
4. Hardiman, O., *Neurodegenerative disorders: a clinical guide*. Springer London Ltd: **2011**; p 312.
5. Dobson, C. M., Protein folding and misfolding. *Nature* **2003**, 426, 884-890.
6. Moreno-Gonzalez, I.; Soto, C., Misfolded protein aggregates: mechanisms, structures and potential for disease transmission. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, 22, 482-487.
7. Soto, C.; Estrada, L. D., Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch. Neurol.* **2008**, 65, 184-189.
8. Soto, C.; Estrada, L.; Castilla, J., Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, 31, 150-155.
9. Jarrett, J. T.; Lansbury, P. T., Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **1993**, 73, 1055-1058.
10. Nakamura, T.; Lipton, S., Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis* **2009**, 14, 455-468.
11. Hartl, F. U.; Hayer-Hartl, M., Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **2002**, 295, 1852-1858.
12. Shaw, L. M.; Korecka, M.; Clark, C. M.; Lee, V. M. Y.; Trojanowski, J. Q., Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 295-303.
13. Forman, M. S.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M., Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat. Med.* **2004**, 10, 1055-1063.
14. Naeem, A.; Fazili, N., Defective protein folding and aggregation as the basis of neurodegenerative diseases: the darker aspect of proteins. *Cell Biochem. Biophys.* **2011**, 61, 237-250.
15. Caughey, B.; Lansbury, P. T., Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* **2003**, 31, 267-298.
16. Glabe, C. G., Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol. aging* **2006**, 27, 570-575.
17. Walsh, D. M.; Selkoe, D. J., A β Oligomers – a decade of discovery. *J. Neurochem.* **2007**, 101, 1172-1184.
18. Demuro, A.; Mina, E.; Kaye, R.; Milton, S. C.; Parker, I.; Glabe, C. G., Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 17294-17300.
19. Bucciantini, M.; Calloni, G.; Chiti, F.; Formigli, L.; Nosi, D.; Dobson, C. M.; Stefani, M., Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 31374-31382.
20. Cleary, J. P.; Walsh, D. M.; Hofmeister, J. J.; Shankar, G. M.; Kuskowski, M. A.; Selkoe, D. J.; Ashe, K. H., Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* **2005**, 8, 79-84.
21. Shankar, G. M.; Li, S.; Mehta, T. H.; Garcia-Munoz, A.; Shepardson, N. E.; Smith, I.; Brett, F. M.; Farrell, M. A.; Rowan, M. J.; Lemere, C. A.; Regan, C. M.; Walsh, D. M.; Sabatini, B. L.;

- Selkoe, D. J., Amyloid-[beta] protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **2008**, 14, 837-842.
22. Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. O.; Riek, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D., Structure of the cross-[beta] spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **2005**, 435, 773-778.
 23. Glass, C. K.; Saijo, K.; Winner, B.; Marchetto, M. C.; Gage, F. H., Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* **2010**, 140, 918-934.
 24. Amor, S.; Puentes, F.; Baker, D.; Van Der Valk, P., Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* **2010**, 129, 154-169.
 25. Carson, M. J.; Doose, J. M.; Melchior, B.; Schmid, C. D.; Ploix, C. C., SNC immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol. Rev.* **2006**, 213, 48-65.
 26. Block, M. L.; Hong, J.-S., Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress Neurobiol.* **2005**, 76, 77-98.
 27. Freude, S.; Hausmann, J.; Hofer, M.; Pham-Mitchell, N. C., I.L.; Staeheli, P.; Pagenstecher, A., Borna disease virus accelerates inflammation and disease associated with transgenic expression of interleukin-12 in the central nervous system. *J. Virol.* **2002**, 76, 12223-12232.
 28. Boztug, K.; Carson, M. J.; Pham-Mitchell, N.; Asensio, V. C.; DeMartino, J.; Campbell, I. L., Leukocyte infiltration, but not neurodegeneration in the CNS of transgenic mice with astrocyte production of the CXC chemokine ligand 10. *J. Immunol.* **2002**, 169, 1505-1515.
 29. Trifilo, M. J.; Lane, T. E., Adenovirus-mediated expression of CXCL10 in the central nervous system results in T-cell recruitment and limited neuropathology. *J. Neurovirol.* **2003**, 9, 315-324.
 30. Kreutzberg, G. W., Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosc.* **1996**, 19, 312-318.
 31. Streit, W. J., Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* **2002**, 40, 133-139.
 32. Gao, H.-M.; Hong, J.-S., Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol.* **2008**, 29, 357-365.
 33. Schwartz, M.; Shechter, R., Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2010**, 6, 405-410.
 34. Ransohoff, R. M.; Cardona, A. E., The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* **2010**, 468, 253-262.
 35. Wei, R.; Jonakait, G. M., Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *J. Neuroimmunol.* **1999**, 95, 8-18.
 36. Luo, X. G.; Ding, J.-Q.; Chen, S.-D., Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* **2010**, 5, 12-20.
 37. Streit, W. J., Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosc.* **2006**, 29, 506-510.
 38. Streit, W. J.; Sammons, N. W.; Kuhns, A. J.; Sparks, D. L., Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* **2004**, 45, 208-212.
 39. Sierra, A.; Gottfried-Blackmore, A. C.; McEwen, B. S.; Bulloch, K., Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia* **2007**, 55, 412-424.
 40. Halliwell, B., Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* **2006**, 97, 1634-1658.
 41. Andersen, J. K., Oxidative stress and neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, 8, 18-25.

42. Dröge, W., Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* **2002**, 82, 47-95.
43. Rivas-Arancibia, S.; Gallegos-Rios, C. B., D. F.; Navarro, L.; Rodriguez-Martinez, E., Chapter 3: Oxidative stress and neurodégénérative disease. In *Neurodegenerative diseases - Process, Prevention, Protection and Monitoring*, Chang, R. C.-C., Ed. InTech: **2011**.
44. Cretu, D. I.; Sovrea, A.; Ignat, R. M.; Filip, A.; Bidian, C. C., A., Morpho-pathological and physiological changes of the brain and liver after ozone exposure. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **2010**, 51, 701-706.
45. Schwela, D., Air pollution and health in urban areas. *Rev. Environ. Health* **2000**, 15, 13-42.
46. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M., Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* **1984**, 323, 1396-1397.
47. Somogyi, A.; Rosta, K.; Pusztai, P.; Tulassay, Z.; Nagy, G., Antioxidant measurements. *Physiol. Meas.* **2007**, 28, 41-55.
48. Melo, A.; Monteiro, L.; Lima, R. M. F.; de Oliveira, D. M.; de Cerquiera, M. D.; El-Bacha, R. S., Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2011**, 2011, 1-14.
49. Gandhi, S.; Abramov, A. Y., Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 2012, 1-11.
50. Beal, M. F., Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *An. Neurol.* **2005**, 58, 495-505.
51. Nunomura, A.; Honda, K.; Takeda, A.; Hirai, K.; Zhu, X.; A., S. M.; Perry, G., Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 2006, 1-6.
52. Perry, G.; Nunomura, A.; Hirai, K.; Zhu, X.; Perez, M.; Avila, J.; Castellani, R. J.; Atwood, C. S.; Aliev, G.; Sayre, L. M.; Takeda, A.; Smith, M. A., Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 33, 1475-1479.
53. Dorado-Martinez, C.; Paredes-Carbajal, C.; Mascher, D.; Borgonio-Perez, G.; Rivas-Arancibia, S., Effects of different ozone doses on memory, motor activity and lipid peroxidation levels, in rats. *Int. J. Neurosci.* **2001**, 108, 149-161.
54. Pereyra-Muñoz, N.; Rugerio-Vargas, C.; Angoa-Pérez, M.; Borgonio-Pérez, G.; Rivas-Arancibia, S., Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to ozone. *J. Chem. Neuroanat.* **2006**, 31, 114-123.
55. Federico, A.; Cardaioli, E.; Da Pozzo, P.; Formichi, P.; Gallus, G. N.; Radi, E., Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J. Neurol. Sci.* **2012**, 322, 254-262.
56. Karbowski, M.; Neutzner, A., Neurodegeneration as a consequence of failed mitochondrial maintenance. *Act. Neuropathol.* **2012**, 123, 157-171.
57. Du, H.; Yan, S. S., Mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, 42, 560-572.
58. Paschen, W.; Frandsen, A., Endoplasmic reticulum dysfunction – a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain? *J. Neurochem.* **2001**, 79, 719-725.
59. Lindholm, D.; Wootz, H.; Korhonen, L., ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ.* **2006**, 13, 385-392.
60. Rao, R. V.; Bredesen, D. E., Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, 16, 653-662.
61. Chesselet, M.-F., *Molecular mechanism of neurodegenerative disease*. Humana Press: **2001**.
62. Maurer, K.; Volk, S.; Gerbaldo, H., Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* **1997**, 349, 1546-1549.
63. Touchon, J.; Portet, F., *La maladie d'Alzheimer*. Elsevier Masson: **2004**.

64. Alzheimer's Disease Research, American Health Assistance Foundation. <http://www.ahaf.org>
65. Alzheimer's disease, I. *World Alzheimer Report 2010*; **2010**.
66. Qiu, C.; Kivipelto, M.; von Strauss, E., Epidemiology of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2009**, 11, 111-128.
67. Soto, M.; Reynish, E.; Nourhashemi, F.; Vellas, B., Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer. *La Presse Médicale* **2007**, 36, 1491-1499.
68. Knopman, D.; Donohue, J. A.; Guterman, E. M., Patterns of care in the early stages of Alzheimer's disease : Impediments to timely diagnosis. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2000**, 48, 300-304.
69. Freds, S.; Cohen, D.; Eisdorfer, C.; Paveza, G.; Gorelick, P.; Luchins, D. J.; Hirschman, R.; Ashford, J. W.; Levy, P.; Semla, T.; Shaw, H., Functional Status and Clinical Findings in Patients With Alzheimer's Disease. *J. Gerontol.* **1992**, 47, 177-182.
70. Goode, B. L.; Denis, P. E.; Panda, D.; Radeke, M. J.; Miller, H. P.; Wilson, L.; Feinstein, S. C., Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol. Biol. Cell* **1997**, 8, 353-365.
71. Buée, L.; Delacourte, A., Tauopathie et maladie d'Alzheimer, un processus dégénératif à part entière. *Psychol. neuropsychiatr. Vieil.* **2006**, 4, 1-12.
72. Takeda, M.; Tanaka, T.; Cacabelos, R., *Molecular neurobiology of Alzheimer disease and related disorder*. Karger Publishers: **2004**.
73. Dawbarn, D.; Allen, S. J., *Neurobiology of Alzheimer's Disease*. Oxford University Press: **2007**.
74. Checler, F., Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **1995**, 65, 1431-1444.
75. Sisodia, S. S.; Price, D. L., Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *FASEB J.* **1995**, 9, 366-370.
76. Checler, F.; Alves da Costa, C.; Dumachin-Njock, C.; Lopez-Perez, E.; Marambaud, P.; Paitel, E.; Petit, A.; Vincent, B., Métabolisme du précurseur du peptide amyloïde et présénilines. *Méd. Sci.* **2002**, 18, 717-724.
77. Burdick, D.; Soreghan, B.; Kwon, M.; Kosmoski, J.; Knauer, M.; Henschen, A.; Yates, J.; Cotman, C.; Glabe, C., Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 546-546.
78. Gandy, S., The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* **2005**, 115, 1121-1129.
79. Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M., Alzheimer's Disease. *New Eng. J. Med.* **2010**, 362, 329-344.
80. Ittner, L. M.; Götz, J., Amyloid-beta and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Rev. Neurosci.* **2010**, 12, 67-72.
81. Gotz, J.; Streffer, J. R.; David, D.; Schild, A.; Hoernkli, F.; Pennanen, L.; Kurosinski, P.; Chen, F., Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Mol. Psy.* **2004**, 9, 664-683.
82. Oddo, S.; Billings, L.; Kesslak, J. P.; Cribbs, D. H.; LaFerla, F. M., A β Immunotherapy Leads to Clearance of Early, but Not Late, Hyperphosphorylated Tau Aggregates via the Proteasome. *Neuron.* **2004**, 43, 321-332.
83. Rapoport, M.; Dawson, H. N.; Binder, L. I.; Vitek, M. P.; Ferreira, A., Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proceedings Nat. Acad. Sci.* **2002**, 99, 6364-6369.
84. Rhein, V.; Song, X.; Wiesner, A.; Ittner, L. M.; Baysang, G.; Meier, F.; Ozmen, L.; Bluethmann, H.; Dröse, S.; Brandt, U.; Savaskan, E.; Czech, C.; Götz, J.; Eckert, A., Amyloid- β and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proceedings Nat. Acad. Sci.* **2009**, 106, 20057-20062.

85. Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K., The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* **1999**, 66, 137-147.
86. VanDenBerg, C. M.; Kazmi, Y.; Jann, M. W., Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease in the elderly. *Drugs & Aging* **2000**, 16, 123-138.
87. Rogers, S. L.; Doody, R. S.; Pratt, R. D.; Ieni, J. R., Long-term efficacy and safety of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease: final analysis of a US multicentre open-label study. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2000**, 10, 195-203.
88. Marcusson, J.; Bullock, R.; Gauthier, S.; Kurz, A.; Schwalen, S., Galantamine demonstrates efficacy and safety in elderly patients with Alzheimer disease. *Alzheimers Dis. Assoc. Disord.* **2003**, 17 86-91.
89. Rösler, M.; Anand, R.; Cicin-Sain, A.; Gauthier, S.; Agid, Y.; Dal-Bianco, P.; Stähelin, H. B.; Hartman, R.; Gharabawi, M.; Bayer, T., Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial *BMJ* **1999**, 318, 633-640.
90. Parsons, C. G.; Danysz, W.; Quack, G., Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacol.* **1999**, 38, 735-767.
91. Lyketsos, C. G.; Sheppard, J.-M. E.; Steele, C. D.; Kopunek, S.; Steinberg, M.; Baker, A. S.; Brandt, J.; Rabins, P. V., Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial of Sertraline in the Treatment of Depression Complicating Alzheimer's Disease: Initial Results From the Depression in Alzheimer's Disease Study. *Am. J. Psychiatry* **2000**, 157, 1686-1689.
92. Lebert, F.; Pasquier, F., Traitement médical des manifestations psychiatriques et comportementales de la maladie d'Alzheimer. *Rev. Neurol.* **2003**, 159, 825-830.
93. Recommandations professionnelles. " Diagnostique et prise en charge de la maladie d'Alzheimer et des maladies apparentées.". www.has-sante.fr
94. Hickey, W. F., The pathology of multiple sclerosis: a historical perspective. *J. Neuroimmunol.* **1999**, 98, 37-44.
95. Charcot, J.-M., Histologie de la sclérose en plaque. *Gaz. Hop. De Paris* **1868**, 41, 554-566.
96. WHO; MSIF *Atlas: Multiple sclerosis resources in the world* **2008**.
97. Association Française des Scléroses en Plaques. <http://nafsep.org/> (2013)
98. Ouallet, J. C.; Brochet, B., Aspects cliniques, physiopathologiques, et thérapeutiques de la sclérose en plaques. *Neurol.* **2004**, 1, 415-457.
99. Multiple Sclerosis International Federation (MSIF). <http://www.msif.org/> (2013)
100. Garbay, B.; Heape, A. M.; Sargueil, F.; Cassagne, C., Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Progress Neurobiol.* **2000**, 61, 267-304.
101. Baumann, N.; Pham-Dinh, D., Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiol. Rev.* **2001**, 81, 871-927.
102. Moore, G. R. W.; Esiri, M. M., The pathology of multiple sclerosis and related disorders. *Diagn. Histopathol.* **2011**, 17, 225-231.
103. Trapp, B. D.; Kidd, G. J., Structure of myelinated axon. In *Myelin biology and disorders*, Lazzarini, R. A.; Griffin, J. W.; Lassmann, H.; Nave, K. A.; Trapp, B. D., Eds. Elsevier: **2004**; pp 3-27.
104. Steinman, L.; Zamvil, S., Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, 3, 483-492.
105. Chabas, D., Progrès récents concernant les mécanismes immunitaires de la sclérose en plaques. *Rev. Neurol.* **2005**, 162, 162-173.
106. Hemmer, B.; Nessler, S.; Zhou, D.; Kieseier, B.; Hartung, H.-P., Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat. Clin. Pract. Neuro.* **2006**, 2, 201-211.

107. Ousman, S. S.; Tomooka, B. H.; van Noort, J. M.; Wawrousek, E. F.; O'Connor, K. C.; Hafler, D. A.; Sobel, R. A.; Robinson, W. H.; Steinman, L., Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* **2007**, 448, 474-479.
108. Mathey, E. K.; Derfuss, T.; Storch, M. K.; Williams, K. R.; Hales, K.; Woolley, D. R.; Al-Hayani, A.; Davies, S. N.; Rasband, M. N.; Olsson, T.; Moldenhauer, A.; Velhin, S.; Hohlfeld, R.; Meinel, E.; Linington, C., Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J. Exp. Med.* **2007**, 204, 2363-2372.
109. Kutzelnigg, A.; Lucchinetti, C. F.; Stadelmann, C.; Brück, W.; Rauschka, H.; Bergmann, M.; Schmidbauer, M.; Parisi, J. E.; Lassmann, H., Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* **2005**, 128, 2705-2712.
110. Franklin, R. J. M.; ffrench-Constant, C., Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, 9, 839-855.
111. Compston, A.; Coles, A., Multiple sclerosis. *Lancet* **2008**, 372, 1502-1517.
112. Sclérose en plaques: évaluations et recommandations 2001. www.has-sante.fr
113. Kita, M., Treatment of spasticity. In *Multiple sclerosis therapeutics*, Rudick, R. A.; Goodkin, D. E., Eds. Martin Dunitz: London, **1999**; pp 475-488.
114. Krupp, L. B., Treatment of fatigue. In *Multiple sclerosis therapeutics*, Rudick, R. A.; Goodkin, D. E., Eds. Martin Dunitz: London, **1999**; pp 467-474.
115. Luessi, F.; Siffrin, V.; Zipp, F., Neurodegeneration in multiple sclerosis: novel treatment strategies. *Expert Rev. Neurother.* **2012**, 12, 1061-1077.
116. Barten, L. J.; Allington, D. R.; Procacci, K. A.; Rivey, M. P., New approaches in the management of multiple sclerosis. *Drug. Des. Devel. Ther.* **2010**, 4, 343-66.
117. Yong, V. W., Differential mechanism of action of interferon- β and glatiramer acetate in MS. *Neurol.* **2002**, 59, 802-808.
118. Kieser, B. C.; Hartung, H. P., Interferon- β and neuroprotection in multiple sclerosis - facts, hopes and phantasies. *Exp. Neurol.* **2007**, 203, 1-4.
119. Arnon, R.; Aharoni, R., Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 14593-14598.
120. Gran, B.; Tranquill, L. R.; Chen, M.; Bielekova, B.; Zhou, W.; Dhib-Jalbut, S.; Martin, R., Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurol.* **2000**, 55, 1704-1714.
121. Ncuhaus, O.; Wiendl, H.; Kieseier, B. C.; Archelos, J. J.; Hemmer, B.; Stüve, O.; Hartung, H.-P., Multiple sclerosis: Mitoxantrone promotes differential effects on immunocompetent cell in vitro. *J. Neuroimmuno.* **2005**, 168, 128-137.
122. Hartung, H. P.; Gonsette, R.; König, N.; Kwiecinski, H.; Guseo, A.; Morrisey, S. P.; Krapf, H.; Zwingers, T., Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* **2002**, 360, 2018-2025.
123. Rommer, P. S.; Stüve, O.; Goertsches, R.; Mix, E.; Zettl, U. K., Monoclonal antibodies in the therapy of multiple sclerosis. *J. Neurol.* **2008**, 255, 28-35.
124. Stüve, O.; Gold, R.; Chan, A.; Mix, E.; Zettl, U.; Kieseier, B., α 4-Integrin antagonism with natalizumab. *J. Neurol.* **2008**, 255, 58-65.
125. Brinkmann, V.; Billich, A.; Baumruker, T.; Heining, P.; Schmouder, R.; Francis, G.; Aradhye, S.; Burtin, P., Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 883-897.
126. Cyster, J. G., Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, 23, 127-159.

127. Gasperini, C.; Ruggieri, S.; Mancinelli, C. R.; Pozzilli, C., Advances in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis - critical appraisal of fingolimod. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2013**, 9, 73-82.
128. Freeman, J. A.; Langdon, D. W.; Hobart, J. C.; Thompson, A. J., The impact of inpatient rehabilitation on progressive multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **1997**, 42, 236-244.
129. Martin, W. R.; Eades, C. E.; Thompson, J. A.; Huppler, R. E., The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1976**, 197, 517-532.
130. Brady, K. T.; Balster, R. L.; May, E. L., Stereoisomers of *N*-allylnormetazocine: phencyclidine-like behavioral effects in squirrel monkeys and rats. *Science* **1982**, 215, 178-180.
131. Vaupel, D. B., Naltrexone fails to antagonize the sigma effects of PCP and SKF 10,047 in the dog. *Eur. J. Pharmacol.* **1983**, 92, 269-274.
132. Zukin, S. R.; Brady, K. T.; Slifer, B. L.; Blaster, R. L., Sigma opioid receptor: characterization and co-identity with the phencyclidine receptor. *Brain Res.* **1984**, 233, 597-602.
133. Quirion, R.; Bowen, W. D.; Itzhak, Y.; Junien, J. L.; M., M. J.; Rothman, R. B.; Su, T. P.; Tam, S. W.; Taylor, D. P., A proposal for the classification of sigma binding sites. *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, 13, 85-86.
134. Hellewell, S. B.; Bowen, W. D., A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest different sigma receptor form from that guinea pig brain. *Brain Res.* **1990**, 527, 244-253.
135. Hellewell, S. B.; Bruce, A.; Feinstein, G.; Orringer, J.; Williams, W.; Bowen, W. D., Rat liver and kidney contain high densities of sigma-1 and sigma-2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect.* **1994**, 268, 9-18.
136. Hanner, M.; Moebius, F. F.; Flandorfer, A.; Knaus, H. G.; Striessnig, J.; Kempner, E.; Glossmann, H., Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma-1-binding site. *Proceedings Nat. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 8072-8072.
137. Prasad, P. D.; Li, H. W.; Fei, Y. J.; Ganapathy, M. E.; Fujita, T.; Plumley, L. H.; Yang-Feng, T. L.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V., Exon-Intron Structure, Analysis of Promoter Region, and Chromosomal Localization of the Human Type 1 σ Receptor Gene. *J. Neurochem.* **1998**, 70, 443-451.
138. Seth, P.; Fei, Y. J.; Li, H. W.; Huang, W.; Leibach, F. H., Cloning and functional characterization of a σ receptor from rat brain. *J. Neurochem.* **1998**, 70, 922-931.
139. Pan, Y. X.; Mei, J.; Xu, J.; Wan, B. L.; Zuckerman, A.; Pasternak, G. W., Cloning and characterization of a mouse σ receptor. *J. Neurochem.* **1998**, 70, 2279-2285.
140. Mei, J.; Pasternak, G. W., Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma1 receptor1. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 62, 349-355.
141. Hayashi, T.; Su, T. P., The potential role of sigma-1 receptors in lipid transport and lipid raft reconstitution in the brain: implication for drug abuse. *Life Sci.* **2005**, 77, 1612-1624.
142. Aydar, E.; Palmer, C. P.; Klyachko, V. A.; Jackson, M. B., The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron.* **2002**, 34, 399-410.
143. Guitart, X.; Codony, X.; Monroy, X., Sigma receptors: biology and therapeutic potential. *Psychopharmacol.* **2004**, 174.
144. Pal, A.; Hajipour, A. R.; Fontanilla, D.; Ramachandran, S.; Chu, U. B.; Mavlyutov, T.; Ruoho, A. E., Identification of regions of σ_1 receptor ligand binding site using a novel photoprobe. *Mol. Pharmacol.* **2007**, 72, 921-933.
145. Cobos, E. J.; Entrena, J. M.; Nieto, F. R.; Cendán, C. M.; Del Pozo, E., Pharmacology and therapeutic potential of sigma1 receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.* **2008**, 6, 344-344.

146. Su, T.-P.; Hayashi, T.; Maurice, T.; Buch, S.; Ruoho, A. E., The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, 31, 557-566.
147. Fontanilla, D.; Hajipour, A. R.; Pal, A.; Chu, U. B.; Arbabian, M.; Ruoho, A. E., Probing the steroid binding domain-like I (SBDLI) of the Sigma-1 receptor binding site using N-substituted photoaffinity labels. *Biochem.* **2008**, 47, 7205-7217.
148. Maurice, T.; Urani, A.; Phan, V. L.; Romieu, P., The interaction between neuroactive steroids and the σ_1 receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities. *Brain Res.* **2001**, 37, 116-132.
149. Samovilova, N. N.; Nagornaya, L. V.; Vinogradov, V. A., (+)-[³H]SKF 10,047 binding sites in rat liver. *Eur. J. Pharmacol.* **1988**, 147, 259-264.
150. Largent, B. L.; Gundlach, A. L.; Snyder, S. H., Pharmacological and autoradiographic discrimination of sigma and phencyclidine receptor binding sites in brain with (+)-[³H]SKF 10,047, (+)-[³H]-3-[3-hydroxyphenyl]-N-(1-propyl)piperidine and [³H]-1-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1986**, 238, 739-748.
151. Okuyama, S.; Chaki, S.; Yae, T.; Nakazato, A.; Murumatsu, M., Autoradiographic characterization of binding sites for [³H]NE-100 in guinea pig brain. *Life Sci.* **1995**, 57, 333-337.
152. Alonso, G.; Phan, V. L.; Guillemain, I.; Saunier, M.; Legrand, A.; Anoaï, M.; Maurice, T., Immunocytochemical localization of the sigma1 receptor in the adult rat central nervous system. *Neurosci.* **2000**, 97, 155-170.
153. Zamanillo, D.; Andreu, F.; Ovalle, S.; Pérez, M. P.; Romero, G.; Farré, A. J.; Guitart, X., Up-regulation of sigma1 receptor mRNA in rat brain by a putative atypical antipsychotic and sigma receptor ligand. *Neurosci. Lett.* **2000**, 282, 169-172.
154. Palacios, G.; Muro, A.; Verdú, E.; Pumarola, M.; Vela, J. M., Immunohistochemical localization of the sigma1 receptor in Schwann cells of rat sciatic nerve. *Brain Res.* **2004**, 1007, 65-70.
155. Mc Lean, S. W., E., Autoradiographic visualization of haloperidol-sensitive sigma receptors in guinea-pig brain. *Neurosci.* **1988**, 25, 259-269.
156. Hayashi, T.; Su, T. P., Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Science* **2001**, 98, 491-491.
157. Bowen, W. D., Sigma receptors: recent advances and new clinical potentials. *Pharmaceut. Acta Helv.* **2000**, 74, 211-218.
158. Connick, J. H.; Hanlon, G.; Roberts, J.; France, L.; Fox, P. K.; Nicholson, C. D., Multiple sigma binding sites in guinea pig and rat brain membranes: G-protein interactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1992**, 107, 726-731.
159. Hong, W.; Werling, L. L., Evidence that the σ_1 receptor is not directly coupled to G proteins. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, 408, 117-125.
160. Maurice, T.; Su, T. P., The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol. Therap.* **2009**, 124, 195-206.
161. Hayashi, T.; Tsai, S.-Y.; Mori, T.; Fujimoto, M.; Su, T.-P., Targeting ligand-operated chaperone sigma-1 receptors in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert Opin. Ther. Targets* **2011**, 15, 557-577.
162. Hayashi, T.; Su, T.-P., Sigma-1 Receptor Chaperones at the ER- Mitochondrion Interface Regulate Ca²⁺ Signaling and Cell Survival. *Cell* **2007**, 131, 596-610.
163. Martina, M.; Turcotte, M.-E. B.; Halman, S.; Bergeron, R., The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus. *J. Physiol.* **2007**, 578, 143-157.

164. Fu, Y.; Zhao, Y.; Luan, W.; Dong, L.-Y.; Dong, Y.; Lai, B.; Zhu, Y.; Zheng, P., Sigma-1 receptors amplify dopamine D1 receptor signaling at presynaptic sites in the prelimbic cortex. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, 1803, 1396-1408.
165. Pal, A.; Fontanilla, D.; Gopalakrishnan, A.; Chae, Y.-K.; Markley, J. L.; Ruoho, A. E., The sigma-1 receptor protects against cellular oxidative stress and activates antioxidant response elements. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, 682, 12-20.
166. Meunier, J.; Hayashi, T., Sigma-1 receptors regulate Bcl-2 expression by reactive oxygen species-dependent transcriptional regulation of nuclear factor kappaB. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, 332, 388-397.
167. Tsai, S.-Y.; Hayashi, T.; Harvey, B. K.; Wang, Y.; Wu, W. W.; Shen, R. F.; Zang, Y.; Becker, K. G.; Hoffer, B. J.; Su, T. P., Sigma-1 receptors regulate hippocampal dendritic spine formation via a free radical sensitive mechanism involving Rac1-GTP pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 22468-22473.
168. Weber, E.; Sonders, M.; McLean, S.; Pou, S.; Keana, J. F. W., 1,3-Di(2-[5-³H]tolyl)guanidine: a selective ligand that labels sigma type receptors for psychomimetic opiates and antipsychotic drugs. *Proceedings Nat. Acad. Sci.* **1986**, 83, 8784-8788.
169. Klein, M. D.; Musacchio, J. M., High affinity dextromorphan binding sites in guinea pig brain. Effect of sigma ligand and other agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, 251, 207-215.
170. DeHaven-Hudkins, D. L.; Fleissner, L. C., Competitive interactions at [³H]1,3-di(2tolyl)guanidine(DTG)-defined sigma recognition site in guinea pig brain. *Life Sci.* **1992**, 50, 65-70.
171. Monnet, F. P.; Maurice, T., The sigma 1 protein as a target for non-genomic effect of neuro(active)steroids, physiological and behavioral aspects. *J. Pharmacol. Sci.* **2006**, 100, 93-118.
172. Meyer, C.; Schmieding, K.; Falkenstein, E.; Wehling, M., Are high-affinity progesterone binding site(s) from porcine liver microsomes members of the s receptor family ? *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, 347, 293-299.
173. Ault, D. T.; Werling, L. L., Phencyclidine and dizocilpine modulate dopamine release from rat nucleus accumbens via [sigma] receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, 386, 145-153.
174. Ferris, R. M.; Tang, F. L.; Chang, K. J.; Russel, A., Evidence that the potential antipsychotic agent rimcazole (BW 234U) is a specific, competitiv antagonist of sigma sites in brain. *Life sci.* **1986**, 38, 2329-2337.
175. Gilmore, D. L.; Liu, Y.; Matsumoto, R. R., review of the pharmacological and clinical profile of rimcazole. *CNS Drug Rev.* **2004**, 10, 1-22.
176. Gewirtz, G. R.; Gorman, J. M.; Volavaka, J.; Macaluso, J.; G., G.; Taylor, D. P.; Borison, R., BMY 14802, a sigma receptor ligand for the treatment of schizophrenia. *Neuropsychopharmacol.* **1994**, 10, 37-40.
177. Ogawa, S.; Okuyama, S.; Araki, H.; Otomo, S., Effect of NE-100, a novel sigma receptor ligand, on phencyclidine-induced cognitive dysfunction. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, 263, 9-15.
178. Trullas, R.; Skolnick, P., Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, 185, 1-10.
179. Ukai, M.; Maeda, H.; Nanya, Y.; Kameyama, T.; Matsuno, K., Beneficial effects of acute and repeated administrations of sigma receptor agonists on behavioral despair in mice exposed to tail suspension. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1998**, 61, 247-252.
180. Urani, A.; Roman, F. J.; Phan, V. L.; Su, T. P.; Maurice, T., The antidepressant-like effect induced by sigma-1 receptor agonists and neuroactive steroids in mice submitted to the forced swimming test. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 298, 1269-1279.
181. Volz, H. P.; Stoll, K. D., Clinical trials with sigma ligands. *Pharmacopsychiatry* **2004**, 37, 214-220.

182. Hayashi, T.; Maurice, T.; Su, T. P., Ca²⁺ signaling via sigma-1 receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca²⁺ concentration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, 293, 788-798.
183. Bermack, J. E.; Debonnel, G., Modulation of serotonergic neurotransmission by short- and long-term treatments with sigma ligands. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, 134, 691-699.
184. Bermack, J. E.; Debonnel, G., Distinct modulatory roles of sigma receptor subtypes on glutamatergic responses in the dorsal hippocampus. *Synapse* **2005**, 55, 37-44.
185. Bermack, J. E.; Debonnel, G., The role of sigma receptors in depression. *J. Pharmacol. Sci.* **2005**, 97, 317-336.
186. Robson, M. J.; Noorbakhsh, B.; Seminerio, M. J.; Matsumoto, R. R., Sigma-1 receptors: potential targets for the treatment of substance abuse. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, 18, 902-919.
187. Maurice, T. C., M.; Lacroix, M.; Romieu, P., Involvement of sigma-1 receptor in the motivational effects of ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, 74, 869-876.
188. McCracken, K. A.; Bowen, W. D.; Matsumoto, R. R., Novel sigma receptor ligands attenuate the locomotor stimulatory effects of cocaine. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, 365, 35-38.
189. McCracken, K. A.; Bowen, W. D.; De Costa, B. R.; Matsumoto, R. R., Two novel sigma receptor ligands, BD-1047 and LR-172, attenuate cocaine-induced toxicity and locomotor activity. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, 370, 225-232.
190. Toussaint, M.; Delair, B.; Foulon, C.; Lempereur, N.; Vaccher, C.; Maurice, T.; Melnyk, P., Tic hydantoin sigma-1 agonist: Pharmacological characterization on cocaine-induced stimulant and appetitive effects. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2009**, 19, 504-515.
191. Aydar, E.; Palmer, C. P.; Djamgoz, M. B. A., Sigma Receptors and Cancer: Possible Involvement of Ion Channels. *Cancer Res.* **2004**, 64, 5029-5035.
192. Spruce, B. A.; Campbell, L. A.; McTavish, N.; Cooper, M. A.; Appleyard, M. V.; O'Neill, M.; Howie, J.; Samson, J.; Watt, S.; Murray, K.; McLean, D.; Leslie, N. R.; Safrany, S. T.; Ferguson, M. J.; Peters, J. A.; Prescott, A. R.; Box, G.; Hayes, A.; Nutley, B.; Raynaud, F.; Downes, C. P.; Lambert, J. J.; Thompson, A. M.; Eccles, S., Small molecule antagonists of the sigma-1 receptor cause selective release of the death program in tumor and self-reliant cells and inhibit tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **2004**, 64, 4875-4886.
193. Megalizzi, V.; Mathieu, V.; Mijatovic, T.; Gailly, P.; Debeir, O.; De Neve, N.; Van Damme, M.; Bontempi, G.; Haibe-Kains, B.; Decaestecker, C.; Kondo, Y.; Kiss, R.; Lefranc, F., 4-IBP, a sigma-1 receptor agonist, decreases the migration of human cancer cells, including glioblastoma cells, in vitro and sensitizes them in vitro and in vivo to cytotoxic insults of proapoptotic and proautophagic drugs. *Neoplasia* **2007**, 9, 358-369.
194. Evaluation of SR31747A versus placebo in androgen-independent non metastatic prostate Cancer (ODYSSEY). <http://clinicaltrials.gov>
195. Crawford, K. W.; Bowen, W. D., Sigma-2 receptor agonists activate a novel apoptotic pathway and potentiate antineoplastic drugs in breast tumor cell lines. *Cancer Res.* **2002**, 62, 313-322.
196. van Waarde, A.; Rybczynska, A. A.; Ramakrishnan, N.; Ishiwata, K.; Elsinga, P. H.; Dierckx, R. A., Sigma receptors in oncology: therapeutic and diagnostic applications of sigma ligands. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16, 3519-3537.
197. Zamanillo, D.; Romero, L.; Merlos, M.; Vela, J. M., Sigma 1 receptor: A new therapeutic target for pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, In press.
198. Chien, C. C.; Pasternak, G. W., Functional antagonism of morphine analgesia by (+)-pentazocine: evidence for an anti-opioid sigma 1 system. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, 250, 7-8.
199. Diaz, J. L.; Zamanillo, D.; Corbera, J.; Baeyens, J. M.; Maldonado, R.; Pericas, M. A.; Vela, J. M.; Torrens, A., Selective sigma-1 (sigma1) receptor antagonists: emerging target for the treatment of neuropathic pain. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **2009**, 9, 172-183.

200. Chien, C. C.; Pasternak, G. W., Selective antagonism of opioid analgesia by a sigma system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, 271, 1583-1590.
201. King, M.; Pan, Y.-X.; Mei, J.; Chang, A.; Xu, J.; Pasternak, G. W., Enhanced κ -opioid receptor-mediated analgesia by antisense targeting the σ_1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, 331, 5-6.
202. Drews, E.; Zimmer, A., Central sensitization needs sigma receptors. *Pain* **2009**, 145, 269-270.
203. Romero, L.; Zamanillo, D.; Nadal, X.; Sanchez-Arroyos, R.; Rivera-Arconada, I.; Dordal, A.; Montero, A.; Muro, A.; Bura, A.; Segales, C.; Laloya, M.; Hernandez, E.; Portillo-Salido, E.; Escriche, M.; Codony, X.; Encina, G.; Burgueno, J.; Merlos, M.; Baeyens, J. M.; Giraldo, J.; Lopez-Garcia, J. A.; Maldonado, R.; Plata-Salaman, C. R.; Vela, J. M., Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, 166, 2289-2306.
204. Abadias, M.; Escriche, M.; Vaque, A.; Sust, M.; Encina, G., Safety, tolerability and pharmacokinetics of single and multiple doses of a novel sigma-1 receptor antagonist in three randomized phase I studies. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, 75, 103-117.
205. Harukuni, I.; Bhardwaj, A.; Shaivitz, A. B.; DeVries, A. C.; London, E. D.; Hurn, P. D.; Traystman, R. J.; Kirsch, J. R.; Faraci, F. M., sigma(1)-receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl)-piperidine affords neuroprotection from focal ischemia with prolonged reperfusion. *Stroke* **2000**, 31, 976-982.
206. Yang, S.; Bhardwaj, A.; Cheng, J.; Alkayed, N. J.; Hurn, P. D.; Kirsch, J. R., Sigma receptor agonists provide neuroprotection in vitro by preserving bcl-2. *Anesth. Analg.* **2007**, 104, 1179-1184.
207. Ajmo, C. T.; Vernon, D. O.; Collier, L.; Pennypacker, K. R.; Cuevas, J., Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Curr. Neurovasc. Res.* **2006**, 3, 89-98.
208. Shen, Y.-C.; Wang, Y.-H.; Chou, Y.-C.; Liou, K.-T.; Yen, J.-C.; Wang, W.-Y.; Liao, J.-F., Dimemorfan protects rats against ischemic stroke through activation of sigma-1 receptor-mediated mechanisms by decreasing glutamate accumulation. *J. Neurochem.* **2008**, 104, 558-572.
209. Ruscher, K.; Shamloo, M.; Rickhag, M.; Ladunga, I.; Soriano, L.; Gisselsson, L.; Toresson, H.; Ruslim-Litrus, L.; Oksenberg, D.; Urfer, R.; Johansson, B. B.; Nikolich, K.; Wieloch, T., The sigma-1 receptor enhances brain plasticity and functional recovery after experimental stroke. *Brain* **2011**, 134, 732-746.
210. Meurs, A.; Clinckers, R.; Ebinger, G.; Michotte, Y.; Smolders, I., Sigma 1 receptor-mediated increase in hippocampal extracellular dopamine contributes to the mechanism of the anticonvulsant action of neuropeptide Y. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, 26, 3079-3092.
211. Shin, E.-J.; Nah, S.-Y.; Chae, J. S.; Bing, G.; Shin, S. W.; Yen, T. P. H.; Baek, I.-H.; Kim, W.-K.; Maurice, T.; Nabeshima, T.; Kim, H.-C., Dextromethorphan attenuates trimethyltin-induced neurotoxicity via σ_1 receptor activation in rats. *Neurochem. Int.* **2007**, 50, 791-799.
212. Matsuno, K.; Matsunaga, K.; Senda, T.; Mita, S., Increase in extracellular acetylcholine level by sigma ligands in rat frontal cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, 265, 851-859.
213. Earley, B.; Burke, M.; Leonard, B. E.; Gouret, C. J.; Junien, J. L., Evidence for an amnesic effect of JO 1784 in the rat: a potent and selective ligand for the sigma receptor. *Brain Res.* **1991**, 546, 282-286.
214. Senda, T.; Matsuno, K.; Kobayashi, T.; Nakazawa, M.; Nakata, K.; Mita, S., Ameliorative effect of SA4503, a novel cognitive enhancer, on the basal forebrain lesion-induced impairment of the spatial learning performance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1998**, 59, 129-134.

215. Zou, L. B.; Yamada, K.; Sasa, M.; Nakata, Y.; Nabeshima, T., Effects of sigma(1) receptor agonist SA4503 and neuroactive steroids on performance in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacol.* **2000**, 39, 1617-1627.
216. Maurice, T.; Lockhart, B. P., Neuroprotective and anti-amnesic potentials of sigma σ receptor ligands. *Progress Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psy.* **1997**, 21, 69-102.
217. Mori, T.; Hayashi, T.; Su, T.-P., Compromising σ -1 Receptors at the Endoplasmic Reticulum Render Cytotoxicity to Physiologically Relevant Concentrations of Dopamine in a Nuclear Factor- κ B/Bcl-2-Dependent Mechanism: Potential Relevance to Parkinson's Disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, 341, 663-671.
218. Al-Saif, A.; Al-Mohanna, F.; Bohlega, S., A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **2011**, 70, 913-919.
219. Mavlyutov, T. A.; Epstein, M. L.; Verbny, Y. I.; Huerta, M. S.; Zaitoun, I.; Ziskind-Conhaim, L.; Ruoho, A. E., Lack of sigma-1 receptor exacerbates ALS progression in mice. *Neurosci.* **2013**, 240, 129-134.
220. Maurice, T.; Su, T. P.; Privat, A., Sigma1 (σ_1) receptor agonists and neurosteroids attenuate β_{25-35} -amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neurosci.* **1997**, 83, 413-428.
221. Marrazzo, A.; Caraci, F.; Salinaro, E. T.; Su, T. P.; Copani, A.; Ronsisvalle, G., Neuroprotective effects of sigma-1 receptor agonists against beta-amyloid-induced toxicity. *Neuroreport* **2005**, 16, 1223-1226.
222. Maurice, T.; Meunier, J.; Feng, B.; Ieni, J.; Monaghan, D. T., Interaction with σ 1 Protein, but Not N-Methyl-d-aspartate Receptor, Is Involved in the Pharmacological Activity of Donepezil. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, 317, 606-614.
223. Meunier, J.; Ieni, J.; Maurice, T., The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid β_{25-35} peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the σ 1 receptor. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2006**, 149, 998-1012.
224. Anavex <http://anavex.com> (May 2013)
225. Villard, V.; Espallergues, J.; Keller, E.; Vamvakides, A.; Maurice, T., Anti-amnesic and neuroprotective potentials of the mixed muscarinic receptor/sigma 1 (sigma1) ligand ANAVEX2-73, a novel aminotetrahydrofuran derivative. *J. Psychopharmacol.* **2011**, 25, 1101-17.
226. Lahmy, V.; Meunier, J.; Malmstrom, S.; Naert, G.; Givalois, L.; Kim, S. H.; Villard, V.; Vamvakides, A.; Maurice, T., Blockade of Tau Hyperphosphorylation and Abeta Generation by the Aminotetrahydrofuran Derivative ANAVEX2-73, a Mixed Muscarinic and sigma Receptor Agonist, in a Nontransgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuropharmacol.* **2013**, In press.
227. Demerens, C.; Stankoff, B.; Zalc, B.; Lubetzki, C., Eliprotil stimulate CNS myelination: New prospects for multiple sclerosis. *Neurol.* **1999**, 52, 346-350.
228. Paul, R.; Lavastre, S.; Floutard, D.; Floutard, R.; Canat, X.; Casellas, P.; Le Fur, G.; Breliere, J. C., Allosteric modulation of peripheral sigma binding sites by a new selective ligand: SR 31747. *J. Neuroimmunol.* **1994**, 52, 183-192.
229. Casellas, P.; Bourrie, B.; Canat, X.; Carayon, P.; Buisson, I.; Paul, R.; Breliere, J. C.; Le Fur, G., Immunopharmacological profile of SR 31747: in vitro and in vivo studies on humoral and cellular responses. *J. Neuroimmunol.* **1994**, 52, 193-203.
230. Derocq, J. M.; Bourrie, B.; Segui, M.; Le Fur, G.; Casellas, P., In vivo inhibition of endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines production by the sigma ligand SR 31747. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, 272, 224-230.
231. Bourrie, B.; Bouaboula, M.; Benoit, J. M.; Derocq, J. M.; Esclangon, M.; Le Fur, G.; Casellas, P., Enhancement of endotoxin-induced interleukin-10 production by SR 31747A, a sigma ligand. *Eur. J. Immunol.* **1995**, 25, 2882-2887.

CHAPITRE 2 :
Conception de ligands sigma-1

Les liens établis entre les récepteurs σ_1 et les différents systèmes de neurotransmission, ainsi que le rôle fondamental de ces systèmes dans le processus de la cognition, ont permis d'impliquer la protéine σ_1 dans le processus normal de la mémoire et son déclin. D'autre part, la protéine a également été impliquée dans des phénomènes inflammatoires et de myélinisation. Par conséquent, les récepteurs σ_1 représentent une cible intéressante dans le développement de nouvelles molécules pour le traitement des maladies neurodégénératives, notamment de la maladie d'Alzheimer et de la sclérose en plaques.

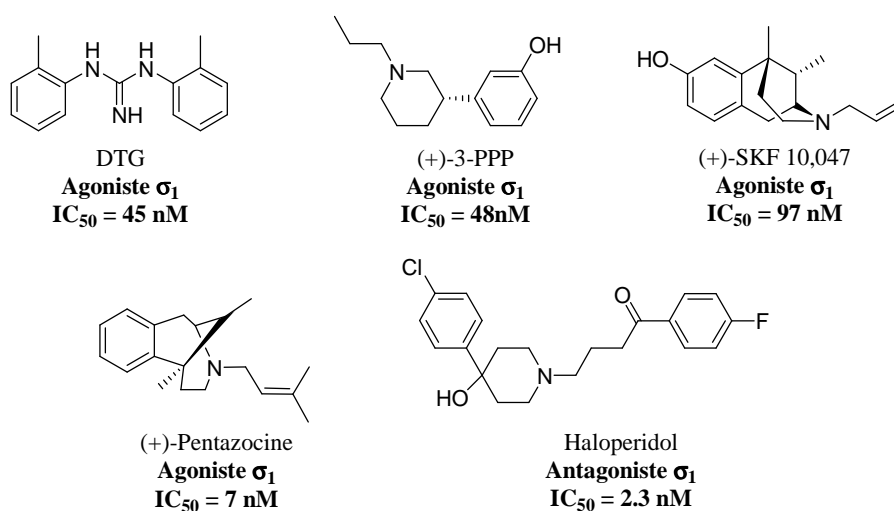
Ce chapitre présente la conception de nouveaux ligands σ_1 ainsi que l'ensemble des travaux antérieurs réalisés au laboratoire.

1. Pharmacophores et ligands synthétiques

Les études biochimiques et pharmacologiques ont permis de mettre en évidence un grand nombre de ligands synthétiques de la protéine σ . De nombreuses familles de molécules et une diversité de structures chimiques semblent se lier avec une bonne affinité à ce site de liaison. Parmi les différentes familles, on retrouve de nombreux agents antipsychotiques (les butyrophénones, les phénothiazines et les thioxanthènes), des anxiolytiques, des antidépresseurs tricycliques, des anticholinergiques, certaines drogues comme la cocaïne et la métamphétamine, des hormones stéroïdiennes dont la progestérone et la DHEA, et enfin la PCP.

1.1 Pharmacophore de Gilligan

Comme les récepteurs σ sont capables de se lier à des composés de structures chimiques totalement différentes, il a été supposé dans un premier temps qu'ils pouvaient avoir une flexibilité au niveau du site actif ou alors que tous les ligands possédaient des caractéristiques communes. Cette dernière hypothèse semble être la plus probable. En effet, il semblerait que la présence d'un atome d'azote protonable soit un élément pharmacophorique commun à un grand nombre de ligands σ_1 (Figure 42).



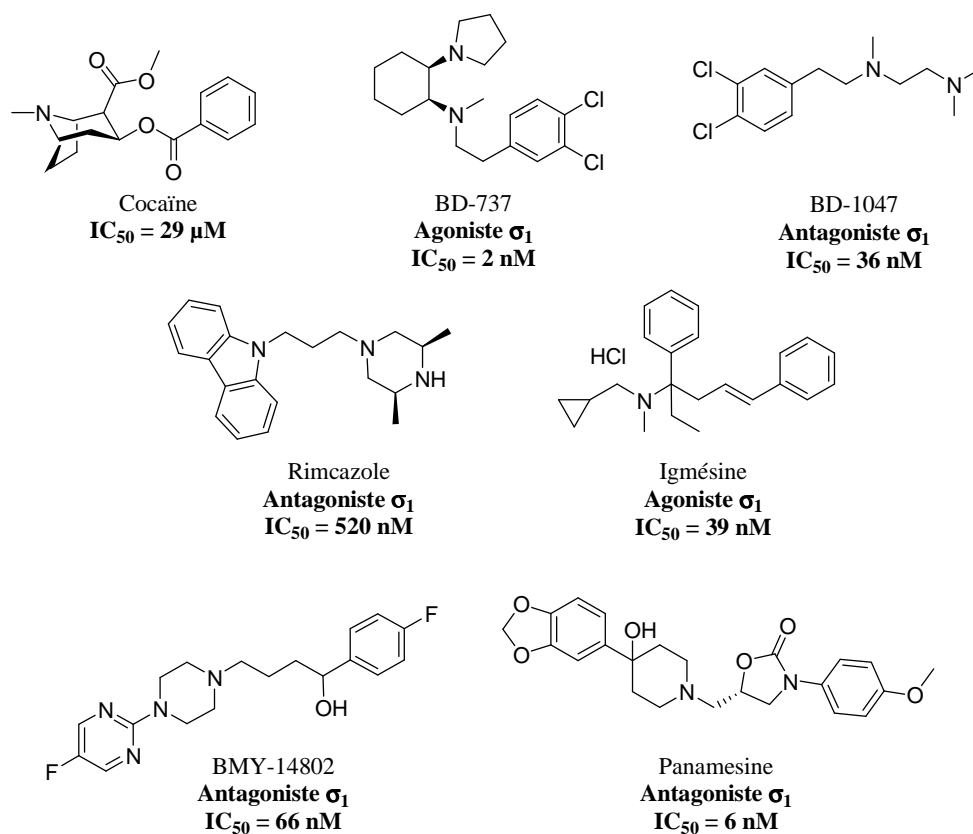


Figure 42 : Ligands sélectifs du site de liaison σ₁.

Ainsi, suite à des études d'optimisation de structures, Gilligan *et al.*²³² ont proposé un modèle triangulaire avec aux sommets un atome d'azote protonable, et deux groupements hydrophobes dont l'un est aromatique. De plus, un groupement accepteur de liaison hydrogène sépare le noyau aromatique de l'atome d'azote (Figure 43).

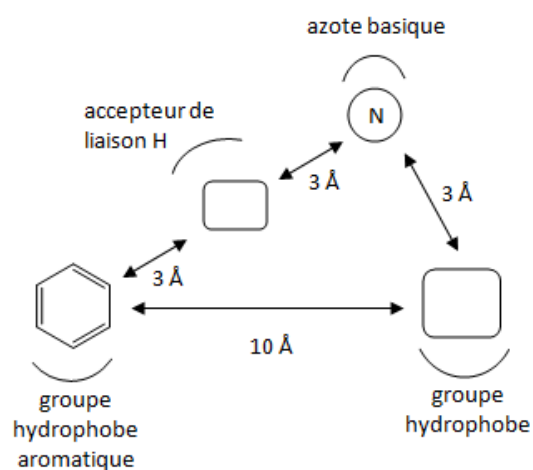


Figure 43 : Pharmacophore d'après Gilligan *et al.*²³²

²³² P. J. Gilligan *et al.*, *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 4344-4361

1.2 Pharmacophore de Glennon et Ablordeppey

Basé sur les études de Gilligan, un pharmacophore Ar-X-N a été développé par Ablordeppey, Glennon *et al.*²³³ quelques années plus tard. Ce pharmacophore est constitué de deux sites hydrophobes séparés par une amine. Le linker X, séparant le premier groupe hydrophobe aromatique de l'amine, peut être linéaire ou branché avec des structures insaturées ou cycliques. Il peut aussi accueillir des fonctions comme un ester, une cétone ou une amine. Sa longueur dépend de la taille spécifique du groupement hydrophobe ainsi que de la tolérance à l'encombrement du récepteur σ . L'amine peut être secondaire ou tertiaire et un second site hydrophobe assez encombrant peut être toléré.

Plus récemment, Glennon a précisé son modèle pharmacophorique.²³⁴ Ses études sont basées sur une approche appelée « déconstruction-construction-élaboration ». En effet, à partir de ligands σ déjà connus (benzomorphanes, halopéridol, PCP...), possédant des affinités plus ou moins importantes, il procède d'abord à une simplification de la structure pour pouvoir identifier les éléments pharmacophoriques essentiels. Il s'agit de la phase de déconstruction. Puis, il ajoute ou modifie des groupements afin d'améliorer les affinités (phases de construction et d'élaboration). Grâce à cette approche, il montrera que la longueur optimale du linker X serait une chaîne pentyle. L'atome d'azote protonable serait nécessaire à la liaison aux récepteurs σ et pourrait être intégré dans une structure cyclique telle qu'une pyrrolidine, une pipéridine ou une pipérazine. Le second site hydrophobe serait un peu plus petit que le site principal et accueillerait de manière optimale une chaîne de trois atomes de carbones. Enfin, les deux sites hydrophobes tolèrent assez bien l'encombrement. Un modèle pharmacophorique plus général a ainsi été redéfini (Figure 44).

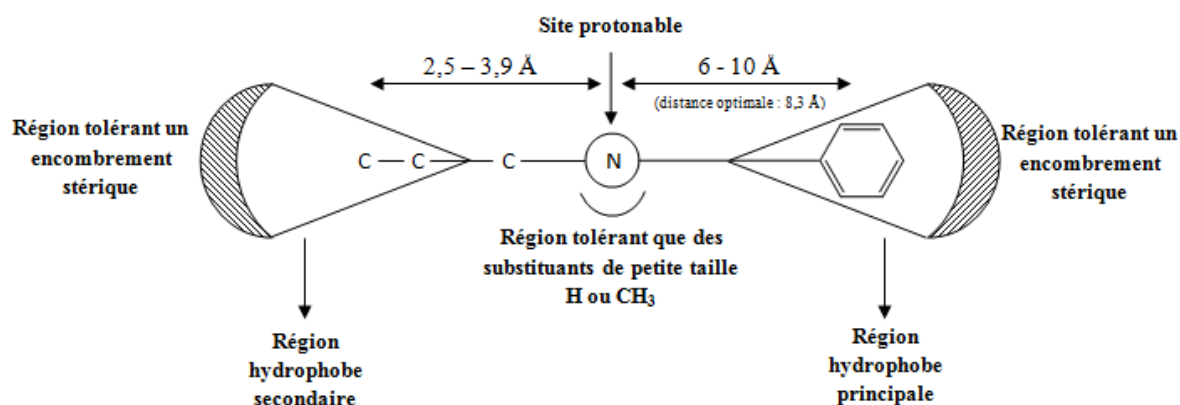


Figure 44 : Modèle pharmacophorique d'après Glennon et Ablordeppey.²³⁴

L'application de cette approche « déconstruction-construction-élaboration » aura permis de mettre en évidence les différentes caractéristiques structurales qui contribuent à la liaison aux récepteurs σ_1 .

²³³ S. Y. Ablordeppey *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, 8, 2105-2111

²³⁴ R. A. Glennon, *Mini Rev. Med. Chem.*, **2005**, 5, 927-940

Cependant, même si de nombreux ligands possédant une très haute affinité ont ainsi été identifiés, des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux définir ce pharmacophore et développer un modèle en 3D fiable.

1.3 Pharmacophore 3D

Comparé à d'autres outils de découverte de médicaments, une approche par pharmacophore 3D a l'avantage non négligeable de permettre une prédiction de l'activité d'un assez grand nombre de molécules dans un temps relativement court.

En 2009, Zampieri *et al.*²³⁵ ont présenté un premier modèle pharmacophorique en 3D basé sur l'étude *in silico* d'une trentaine de ligands σ_1 . Ce modèle a permis de prédire raisonnablement l'affinité des molécules testées avec un coefficient de corrélation de 0,896. Toutefois, ce pharmacophore 3D nécessitait une validation avec des séries de molécules plus importantes et plus diversifiées. Ainsi, afin d'en confirmer la fiabilité en tant que plateforme pour la conception de nouveaux ligands σ_1 , une nouvelle étude menée par la même équipe a été réalisée sur une trentaine de nouvelles molécules.²³⁶ L'ensemble des composés a été classé selon leur affinité pour les récepteurs σ_1 à l'aide de calculs de l'énergie libre par simulation de dynamique moléculaire et les résidus peptidiques impliqués dans la liaison ont été analysés dans un modèle par homologie (Figure 45). Enfin, les différents ligands ont ensuite été synthétisés puis leurs affinités testées *in vitro*. L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus était compatible avec les prédictions réalisées à partir de la procédure *in silico*.

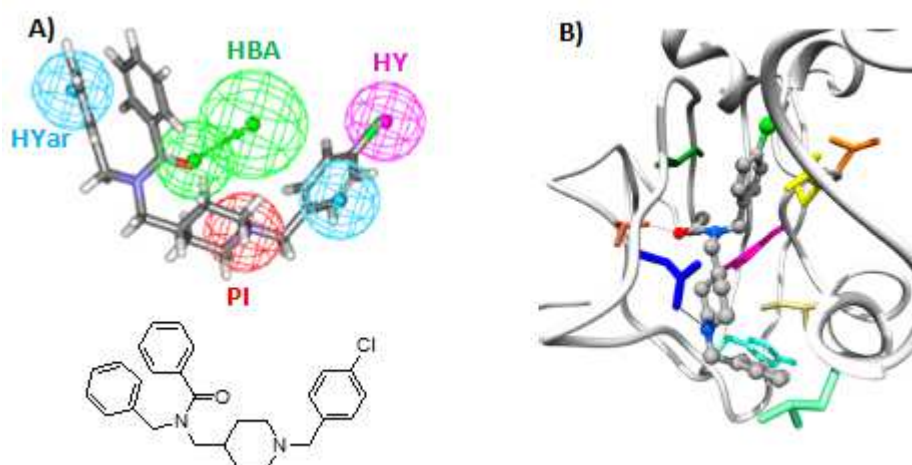


Figure 45 : Validation du modèle pharmacophorique 3D. A) Mapping : les éléments pharmacophoriques importants sont représentés par des sphères (HYar : hydrophobe aromatique ; HBA : accepteur liaisons H ; HY : hydrophobe ; PI : site protonable). B) Modèle par homologie : les résidus protéiques importants impliqués dans les interactions sont en couleurs (Arg119 (rouge) ; Tyr120 (bleu clair) ; Trp121 (cyan) ; Val171 (orange) ; Glu172 (jaune) ; Ile128 (vert) ; Asp126 (bleu) ; Tyr173 (magenta)).

²³⁵ D. Zampieri *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 5380-5393

²³⁶ E. Laurini *et al.*, *Mol. Pharmaceutics*, **2012**, 9, 3107-3126

Ainsi, il semblerait que ce pharmacophore 3D développé par Zampieri *et al.* soit un modèle 3D fiable, utilisable dans la conception et l'optimisation de nouveaux ligands σ_1 .

Cependant, il est important de préciser que quelques unes des caractéristiques structurales contribuant à la liaison aux récepteurs σ_1 , contribuent également à la liaison aux récepteurs σ_2 . Plusieurs pharmacophores σ_2 sont actuellement à l'étude. Ainsi, il est nécessaire d'identifier de nouveaux agents possédant une meilleure sélectivité σ_1/σ_2 afin de mieux investiguer la pharmacologie de la protéine σ .

2. Les dérivés Tic-hydantoïnes

A partir des éléments pharmacophoriques importants ayant été mis en valeur par les différents modèles, de nouveaux ligands σ_1 avaient été conçus au laboratoire. Une optimisation par le modèle de Glennon et Ablordeppey de la nouvelle structure contrainte, suivie par de nombreuses pharmacomodulations ont permis de mettre en évidence des dérivés Tic-hydantoïnes aux propriétés pharmacologiques intéressantes.

2.1 Elaboration d'une structure contrainte

Les dérivés des hydantoïnes ont largement été utilisés lors de criblages biologiques, ce qui a donné lieu à de nombreuses applications thérapeutiques. En effet, le noyau hydantoïne (ou imidazolidine-2,4-one), un cycle à cinq chaînons usuel contenant une fonction urée réactive, est présent dans une large gamme de composés biologiquement actifs incluant des anticonvulsivants, des antiarythmiques, des anticancéreux et des anxiolytiques.^{237, 238, 239}

La stratégie du laboratoire a donc été d'élaborer de nouveaux hétérocycles contenant le noyau hydantoïne pour une application en neuroprotection. Pour cela, le noyau hydantoïne **1** a été fusionné par ses positions C₅ et N₁ avec un autre cycle afin d'obtenir une nouvelle série de produits possédant une structure plus contrainte : les Tic-hydantoïnes **2** (pour tétrahydroquinoléine Hydantoïne) (Figure 46). Lors d'un criblage de chimiothèque, le noyau tétrahydroisoquinoléine (Tic) avait été identifié comme une structure sélective de σ_1 .

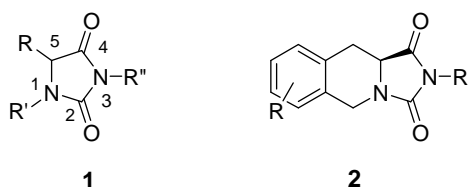


Figure 46 : Elaboration de la structure contrainte des Tic-hydantoïnes.

²³⁷ M. L. Lopez-Rodriguez *et al.*, *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 4439-4450

²³⁸ W. J. Brouillette *et al.*, *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 3289-3293

²³⁹ W. J. Brouillette *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **1990**, 79, 871-874

Parmi les différents composés intéressants sélectionnés, le composé A₁ (Figure 47) s'est révélé être un ligand très sélectif de la protéine σ_1 de cochon d'inde avec une IC₅₀ de 16 nM.²⁴⁰ L'affinité de cette molécule pour σ_1 pourrait s'expliquer par la présence d'une partie aromatique et d'un atome d'azote protonable. En effet, la spécificité envers σ_1 pour ce genre de structure a été décrite dans la partie précédente de ce chapitre. Par conséquent, le noyau Tic-hydantoïne a été choisi comme groupement pharmacophorique pour la conception de nouveaux ligands σ_1 .

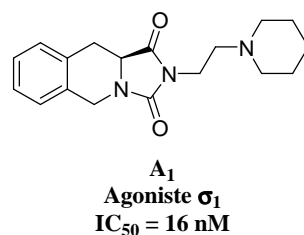


Figure 47 : Dérivé Tic-hydantoïne A₁ : ligand sélectif de la protéine σ_1 .

2.2 Optimisation par application du modèle de Glennon et Ablordeppey

Comme cela a été décrit précédemment, l'atome d'azote se trouve au centre des différents modèles pharmacophoriques de σ_1 . L'optimisation du composé A₁ a donc été réalisée par l'application du modèle de Glennon et Ablordeppey^{233, 234}, qui décrit la longueur optimale entre l'atome d'azote et les deux régions hydrophobes. La première génération de ligand a ainsi été conçue en ajoutant un second centre hydrophobe et en faisant varier la longueur de la chaîne de part et d'autre de l'atome d'azote (Figure 48).

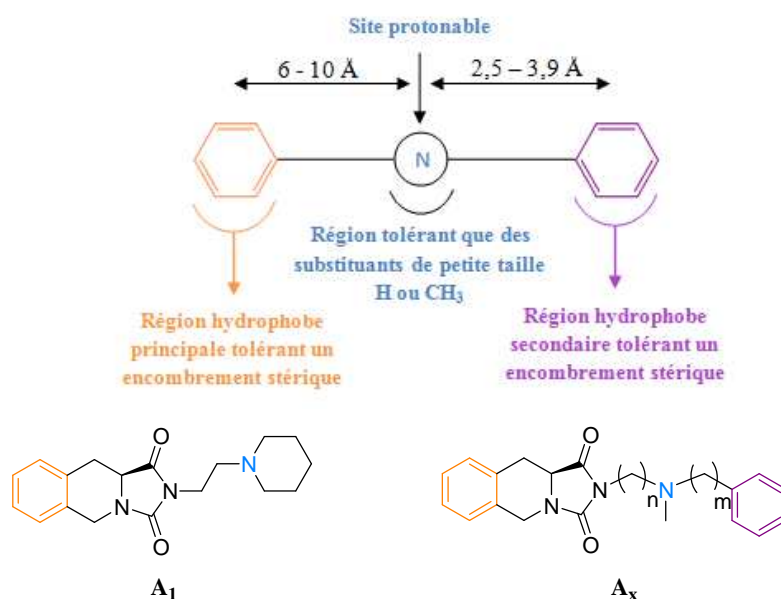


Figure 48 : Optimisation du composé A₁ d'après le modèle de Glennon et Ablordeppey.

²⁴⁰ J. Charton *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 4833-4837

L'ensemble des ligands σ_1 synthétisés ($n = 3-6$ et $m = 0-5$) montrent des affinités comprises entre 3 nM et 30 nM.²⁴¹ Il semblerait que pour ce motif Tic-hydantoïne A_x , la longueur de la chaîne de part et d'autre de l'atome d'azote ne possède pas d'influence significative sur l'affinité. Seule la disparition de l'atome d'azote protonable sur la chaîne latérale entraîne une perte totale d'affinité ($n = 3$, $m = 0$, $IC_{50} > 100$ nM).

Au cours de cette étude, des tests de toxicité ont également été réalisés sur les composés possédant une IC_{50} entre 3 et 15 nM. D'après les résultats présentés dans le Tableau 2, tous les composés testés présentent une faible cytotoxicité, avec des valeurs supérieures à 100 μ M pour les composés possédant une amine tertiaire. Les index de sélectivité (rapport CC_{50} sur IC_{50}) sont très bons, tous supérieurs ou égaux 10000. Cependant, le remplacement de l'amine tertiaire par une amine secondaire A_2 , provoque non seulement une baisse de l'affinité mais aussi une augmentation de la cytotoxicité.

Tableau 2 : Affinité (IC_{50}), cytotoxicité (CC_{50}) et index de sélectivité (IS) des ligands σ_1 de première génération.

Composé	Structure	IC_{50} (nM) Cochon d'inde	CC_{50} (μ M)	IS
A_2		$10,5 \pm 0,1$	31 ± 1	2950
A_3		$4,5 \pm 0,1$	107 ± 4	23770
A_4		$13,6 \pm 1,9$	136 ± 7	10000
A_5		$3,9 \pm 0,1$	196 ± 11	50260
A_6		$9,9 \pm 0,1$	106 ± 3	10710
A_7		$5,0 \pm 0,1$	101 ± 20	20200

Ainsi, les études biochimiques et pharmacologiques ont révélé que le composé A_5 présentait le meilleur compromis entre affinité, sélectivité et cytotoxicité en comparaison aux autres composés obtenus. En effet, le dérivé A_5 possède une bonne affinité envers la protéine σ_1 de cochon d'inde

²⁴¹ A. C. Gassiot *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 4828-4832

($IC_{50} = 3,9$ nM), une sélectivité envers σ_2 ($IC_{50} > 500$ nM), et une très faible cytotoxicité ce qui lui confère un index de sélectivité (ratio CC_{50}/IC_{50}) très important, supérieur à 50 000. Par conséquent, il a été choisi comme chef de file et a fait l'objet d'une étude des relations structure-activité.

2.3 Relations structure-activité des dérivés Tic-hydantoïnes

De nombreuses pharmacomodulations ont été effectuées sur le composé A_5 afin d'améliorer son activité et sa sélectivité vis-à-vis des récepteurs σ_1 .^{242, 243} Parmi ces modulations, on retrouve notamment des modifications du noyau Tic-hydantoïne et du second centre hydrophobe, la rigidification de la chaîne latérale et l'inversion de la stéréochimie (Figure 49). Ces études ont permis de mettre en évidence la nécessité de certains éléments pharmacophoriques. En effet, il a ainsi été établi l'importance de la présence d'un second centre hydrophobe en plus du noyau Tic-hydantoïne. Comme décrit dans les différents modèles, l'atome d'azote protonable est nécessaire et ne tolère des substituants que de petite taille (méthyle ou éthyle). Enfin, le motif Tic-hydantoïne semble être un élément clé pour l'affinité σ_1 puisque toutes modifications entraînent une perte d'affinité.

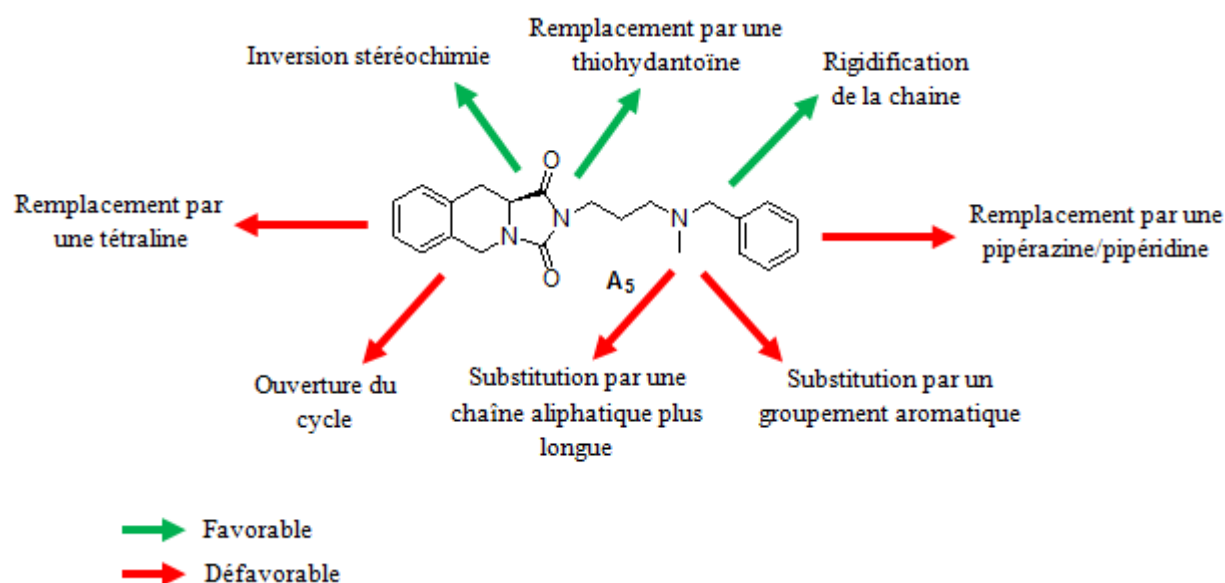


Figure 49 : Relations structure-activité autour du composé A_5 .

Finalement, l'ensemble des études de relations structure-activité n'aura pas vraiment mis en évidence de nouveau motif favorable par rapport à la structure du composé A_5 . Les propriétés pharmacologiques ainsi que le potentiel thérapeutique dans différentes pathologies de ce composé ont donc été évalués.

²⁴² M. Toussaint *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, 45, 256-263

²⁴³ M. Toussaint. Synthèse et évaluation de dérivés tétrahydroisoquinoléine-hydantoïne comme ligands sélectifs des récepteurs sigma 1. Université Lille 2, Lille, **2008**.

2.4 Evaluations pharmacologiques

Les évaluations pharmacologiques ont été réalisées non seulement sur le composé **A₅**, mais également sur l'énantiomère R possédant des propriétés biologiques identiques (IC₅₀ = 13,7 nM).

Évalué dans un modèle d'ischémie cérébrale, l'énantiomère S du composé **A₅** a permis de diminuer de 57% le volume de l'infarctus après perfusion et traitement (2 *i.p/j*, 2,5 mg/kg).²⁴⁴ L'énantiomère R a montré une efficacité importante dans des modèles d'addiction à la cocaïne.^{190, 245} En effet, ce composé a montré un profil agoniste permettant de potentialiser la réponse hyperlocomotrice de la cocaïne dès la dose unique de 1 mg/kg. Il bloque aussi les effets appétants de la cocaïne dans un modèle de CPP dès la dose de 0,1 mg/kg. Enfin, également évalués dans un modèle EAE (Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale), ces composés conduisent au développement d'une pathologie moins sévère (publication soumise). Ces résultats prometteurs pourraient s'expliquer par une activité anti-inflammatoire associée à une action neuroprotectrice des ligands.

Toutefois, pour pouvoir être envisagé comme un médicament pour le traitement d'une pathologie, une molécule doit présenter un certain nombre de propriétés physicochimiques. Un profil représentatif des propriétés d'Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination (ADME) est réalisé afin de connaître le potentiel d'une molécule en tant que futur médicament. Ces études ADME ont été menées sur les composés les plus prometteurs de la famille Tic-hydantoïne. Les paramètres de solubilité, biodisponibilité, passage de la barrière intestinale ou hématoencéphalique étaient favorables. Malheureusement, malgré leur stabilité chimique, ces dérivés présentaient une faible stabilité métabolique. En effet, après une heure d'incubation à 37°C en présence de microsomes hépatiques humain, seulement 15% de produit est retrouvé. Des études complémentaires ont été réalisées afin d'identifier les différents métabolites. La structure de deux métabolites a ainsi pu être déterminée (Figure 50). Le premier, retrouvé à hauteur de 9,1%, provient de la débenzylation du composé **A₅**. Le second, présent en plus faible quantité (4,9%), est issu de la déméthylation du composé parent. Les autres métabolites non identifiés (86%) proviendraient de la métabolisation du noyau Tic-hydantoïne. Il semble donc que la métabolisation rapide de tels composés serait due à l'instabilité du groupement hydantoïne en présence de microsomes hépatiques.

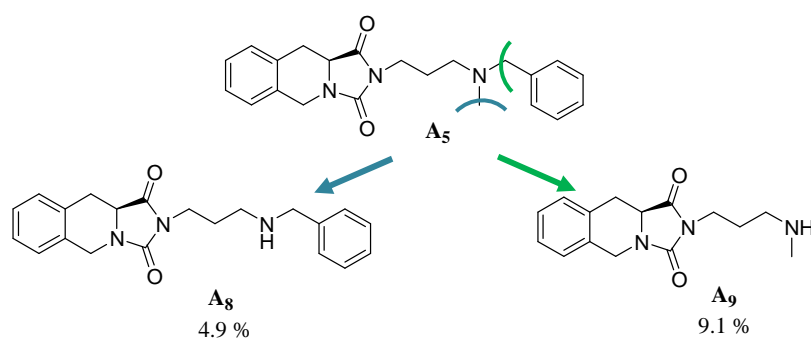


Figure 50 : Identification des métabolites du composé **A₅**.

²⁴⁴ V. R. Venna *et al.*, *Fund. Clin. Pharmacol.*, **2008**, 22,

²⁴⁵ M. Toussaint *et al.*, *Med. Chem.*, **2010**, 6, 355-373

3. But du projet

Les résultats des différentes évaluations pharmacologiques ainsi que les propriétés ADME des dérivés Tic-hydantoïnes, nous ont incités à approfondir l'étude des ligands σ_1 . Par conséquent, de nombreuses pharmacomodulations ont été envisagées afin de pallier au problème de stabilité métabolique de cette première génération de ligand. C'est pourquoi une série de composé a été conçue à partir de modulations réalisées sur le composé A₅ (Figure 51).

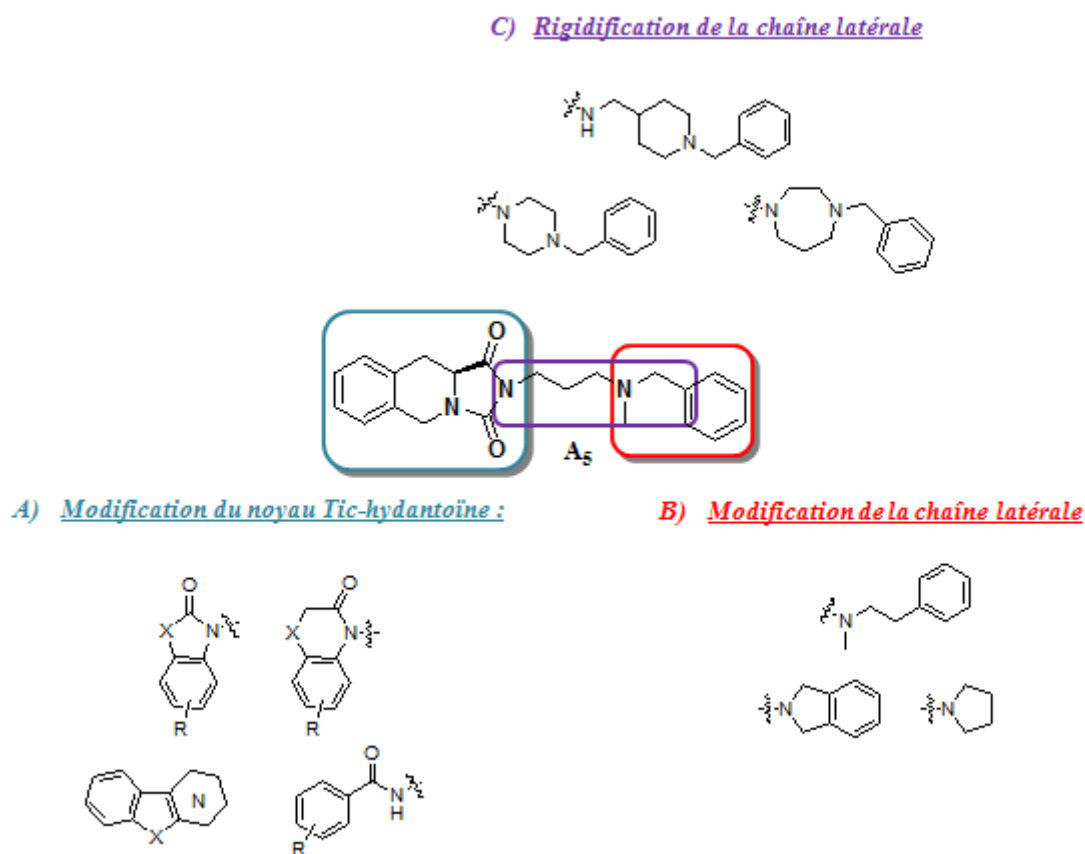


Figure 51 : Pharmacomodulations autour du chef de file.

Dans un premier temps de nombreux hétérocycles peu hydrophiles et plus ou moins encombrés ont été introduits sur la chaîne latérale à la place du noyau Tic-hydantoïne (Modulation A, Figure 51). Après une étude de la littérature, notre choix s'est porté sur des hétérocycles bicycliques ou tricycliques. Ainsi, des structures benzoxazolinones, benzothiazolinones, β -carbolines, γ -carbolines et des structures analogues ont été sélectionnées. De plus, une simplification extrême du noyau Tic-hydantoïne a également été envisagée afin d'améliorer la stabilité métabolique des dérivés. Des monocycles tels que des benzamides ont été introduits sur la chaîne latérale. Des structures apparentées sont présentes sur des ligands σ_1 de bonne affinité tel que le 4-IPB (Chapitre 1, Figure 35). L'ensemble de ces composés a été fonctionnalisé non seulement avec un ou plusieurs atomes

d'halogènes mais aussi avec un groupement méthoxy. Ces pharmacomodulations permettent d'augmenter l'hydrophobie de la région encombrée principale.

D'autre part, des modulations ont également été effectuées sur la chaîne latérale afin de bloquer la déméthylation et la débenzylation observées lors de la métabolisation des dérivés Tic-hydantoïnes (Modulation B, Figure 51). En effet, une cyclisation de la partie latérale a été réalisée et les groupements isoindoliques et pyrrolidiniques ont été sélectionnés. Précédemment introduite sur des dérivés Tic-hydantoïnes, l'isoindoline permettait de conserver une bonne activité et le caractère agoniste des composés. De plus, la *N*-méthyl-*N*-phényléthylamine a également été utilisée. Des études précédentes ont montré que l'augmentation d'un carbone la chaîne latérale, ne modifiait pas le caractère agoniste et l'affinité des composés. Cette modulation permettrait de stabiliser la chaîne latérale et d'éviter la perte du benzyle lors de la métabolisation.

Pour certains dérivés, une rigidification de la chaîne latérale a été envisagée afin d'en étudier l'impact sur l'affinité σ_1 . Pour cela, l'atome d'azote protonable a été introduit dans des structures cycliques telles que la pipérazine et l'homopipérazine (Modulation C, Figure 51).

Finalement, l'objectif de ces modulations est d'aboutir à des composés agonistes envers la protéine σ_1 , sélectifs σ_2 et aux propriétés ADME compatibles avec un développement thérapeutique. Après sélection des meilleurs composés, des études *in vitro* et *in vivo* seront réalisées sur des modèles Alzheimer et SEP. Enfin, l'obtention de structures originales permettra de valoriser plus aisément les résultats biologiques obtenus.

BIBLIOGRAPHIE

232. Gilligan, P. J.; Cain, G. A.; Christos, T. E.; Cook, L.; Drummond, S.; Johnson, A. L.; Kergaye, A. A.; McElroy, J. F.; Rohrbach, K. W., Novel piperidine. sigma. receptor ligands as potential antipsychotic drugs. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4344-4361.
233. Ablordeppey, S. Y.; Fischer, J. B.; Glennon, R. A., Is a Nitrogen Atom an Important Pharmacophoric Element in Sigma Ligand Binding? *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 2105-2111.
234. Glennon, R. A., Pharmacophore Identification for Sigma-1 (σ_1) Receptor Binding: Application of the " Deconstruction-Reconstruction-Elaboration" Approach. *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, 5, 927-940.
235. Zampieri, D.; Mamolo, M. G.; Laurini, E.; Florio, C.; Zanette, C.; Fermeglia, M.; Posocco, P.; Paneni, M. S.; Pricl, S.; Vio, L., Synthesis, Biological Evaluation, and Three-Dimensional in Silico Pharmacophore Model for σ_1 Receptor Ligands Based on a Series of Substituted Benzo[*d*]oxazol-2(3 H)-one Derivatives *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 5380-5393.
236. Laurini, E.; Marson, D.; Dal Col, V.; Fermeglia, M.; Mamolo, M. G.; Zampieri, D.; Vio, L.; Pricl, S., Another Brick in the Wall. Validation of the σ_1 Receptor 3D Model by Computer-Assisted Design, Synthesis, and Activity of New σ_1 Ligands. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, 9, 3107-3126.
237. Lopez-Rodriguez, M. L.; Rosado, M. L.; Benhamu, B.; Morcillo, M. J.; Sanz, A. M.; Beneitez, M. E. F., J. A.; Manzanares, J., Synthesis and structure activity relationships of a new model of arylpiperazine. 1. 2-[[4-(*o*-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1,3-dioxoperhydroimidazo[1,5-*a*]pyridine: a selective 5-HT_{1A} receptor agonist. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 4439-4450.
238. Brouillette, W. J.; Jestkov, V. P.; Brown, M. L.; Akhtar, M. S.; DeLorey, T. M.; Brown, G. B., Bicyclic hydantoin with a bridgehead nitrogen. Comparison of anticonvulsant activities with binding to the neuronal voltage-dependent sodium channel. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3289-3293.
239. Brouillette, W. J.; Brown, G. B.; DeLorey, T. M.; Liang, G., Sodium channel binding and anticonvulsant activities of hydantoin containing conformationally constrained 5-phenyl substituents. *J. Pharm. Sci.* **1990**, 79, 871-874.
240. Charton, J.; Gassiot, A. C.; Girault-Mizzi, S.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Melnyk, P.; Sergheraert, C., Synthesis and pharmacological evaluation of Tic-hydantoin derivatives as selective σ_1 ligands. Part 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 4833-4837.
241. Gassiot, A. C.; Charton, J.; Girault-Mizzi, S.; Gilleron, P.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Sergheraert, C.; Melnyk, P., Synthesis and pharmacological evaluation of Tic-hydantoin derivatives as selective σ_1 ligands. Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 4828-4832.
242. Toussaint, M.; Mousset, D.; Foulon, C.; Jacquemard, U.; Vaccher, C.; Melnyk, P., Sigma-1 ligands: Tic-hydantoin as a key pharmacophore. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 256-263.
243. Toussaint, M. Synthèse et évaluation de dérivés tétrahydroisoquinoléine-hydantoïne comme ligands sélectifs des récepteurs sigma 1. Université Lille 2, Lille, **2008**.
244. Venna, V. R.; Deplancke, D.; Melnyk, P.; Bordet, R., Neuroprotective and antidepressant-like effects of LC 03/35, a novel sigma-1 receptor ligand. *Fund. Clin. Pharmacol.* **2008**, 22.
245. Toussaint, M.; Debreu-Fontaine, M. A.; Maurice, T.; Melnyk, P., New synthesis of tic-hydantoin sigma-1 ligands and pharmacological evaluation on cocaine-induced stimulant effects. *Med. Chem.* **2010**, 6, 355-373.

CHAPITRE 3 :

Synthèses de ligands sigma-1 : résultats et discussion

De nombreuses stratégies de synthèses ont été élaborées au laboratoire ces dernières années afin d'obtenir divers ligands σ_1 . Ces ligands ont fait l'objet d'un grand nombre d'études pharmacologiques et biologiques qui ont permis de mieux comprendre l'affinité σ_1 . Basées sur ces travaux, de nouvelles stratégies de synthèses ont été mises au point au cours de ce projet, afin d'obtenir de nouveaux ligands. Ces nouvelles stratégies et les résultats des études *in vitro* (affinité, sélectivité et cytotoxicité) seront présentés dans ce chapitre.

L'ensemble des composés synthétisés a été divisé en trois familles suivant la nature du centre hydrophobe principal : bicyclique, tricyclique ou monocyclique. Les modulations réalisées ont été orientées par les résultats des études *in vitro* obtenus tout au long du projet. Pour chaque famille, les synthèses des nouveaux dérivés seront dans un premier temps décrites puis suivies par les résultats d'affinité, de sélectivité et de cytotoxicité.

1. Famille des dérivés bicycliques

En 2009, Zampieri *et al.*²⁴⁶ ont montré que des molécules contenant une benzoxazolinone possédaient une bonne affinité et une bonne sélectivité envers les récepteurs σ_1 . C'est pourquoi l'étude de dérivés bicycliques fonctionnalisés a été envisagée. Une série d'une vingtaine de composés a donc été synthétisée à partir de structures bicycliques telles que les benzoxazolinones, les benzothiazolinones, les benzimidazolinones et les benzimidazoles (Figure 52).

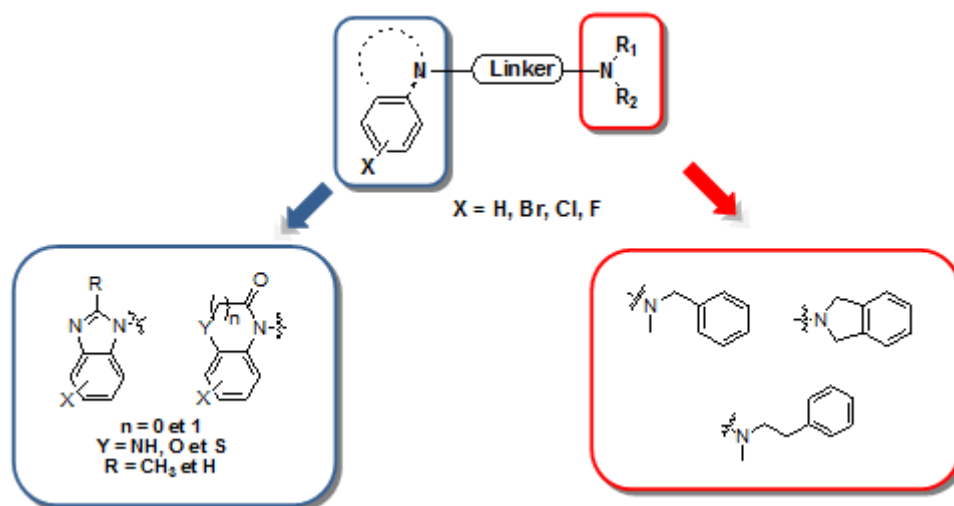


Figure 52 : Famille des dérivés bicycliques.

1.1 Synthèses des bicycles

La majeure partie des hétérocycles utilisés au cours de cette étude était accessible au laboratoire ou dans le commerce.

²⁴⁶ D. Zampieri *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 44, 124-130

Les dérivés benzothiazolinones et benzoxazolinones bromés en position 6 étaient accessibles au laboratoire et avaient été préparés par bromation dans le chloroforme en présence de dibrome (Figure 53).

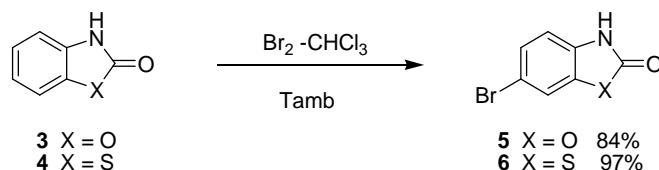


Figure 53 : Synthèses des benzoxazolinone et benzothiazolinone bromées en position 6.

La position 5 n'étant pas un site électrophile contrairement à la position 6, il n'avait pas été possible de préparer les dérivés bromés en position 5 par simple bromation. Ainsi, la 5-bromobenzothiazolinone **9** avait été préparée selon une synthèse en deux étapes décrite par Pirat *et al.*²⁴⁷ (Figure 54).

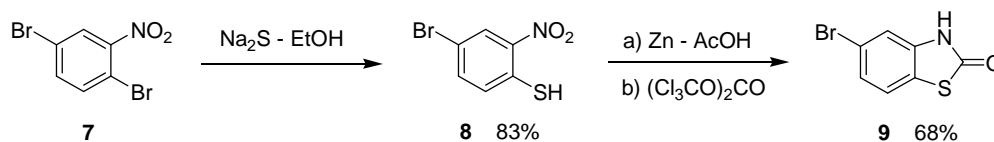


Figure 54 : Synthèse de la 5-bromobenzothiazolinone **9**.

La 6-bromobenzothiazinone **12** avait été préparée selon une synthèse en deux étapes décrite par Badger *et al.* (Figure 55). Dans un premier temps, le dérivé bromonitré avait été mis en réaction avec l'acide mercaptoacétique en présence de carbonate de sodium pour donner le composé **11**. Puis une cyclisation en milieu ammoniacal avait été réalisée pour donner le composé désiré **12**.

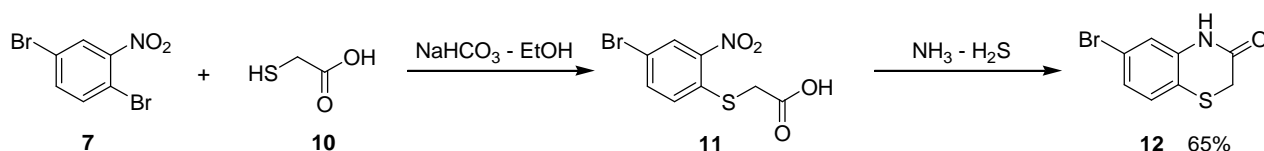


Figure 55 : Synthèse de la 6-bromobenzothiazinone **12**.

Dans le but d'avoir une étude des relations structure-activité complète, il a été nécessaire de synthétiser un certain nombre de nouveaux dérivés bicycliques au cours de ce projet. La 6-bromobenzoxazinone a été obtenue grâce à une synthèse en 3 étapes (Figure 56). Dans un premier temps, le dérivé nitrophénolique a été synthétisé selon une réaction décrite par Nugiel *et al.*²⁴⁸ Le 4-bromophénol a été mis en présence de silice imprégnée d'acide nitrique dans du dichlorométhane. Après 20 minutes d'agitation à 0°C, une coloration jaune du milieu réactionnel indiquait la formation

²⁴⁷ C. Pirat *et al.*, *Synthesis*, **2011**, 3, 480-484

²⁴⁸ D. A. Nugiel *et al.*, *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 1465-1474

du composé nitré. Une purification par colonne chromatographique a permis de séparer le 4-bromo-2-nitrophénol **14** (91%) du 4-bromo-2,6-dinitrophénol (3%).

La fonction nitro a ensuite été réduite en présence de dichlorure d'étain dans un mélange méthanol : HCl_{gaz}.²⁴⁹ Après précipitation et filtration des sels d'étain, le 2-amino-4-bromophénol **15** a été obtenu sans purification avec un rendement de 76%. L'hétérocycle est formé par réaction entre le 2-amino-4-bromophénol **15** et le bromoacétate d'éthyle dans le DMSO. La 6-bromobenzoxazinone **16** est finalement isolée par filtration.

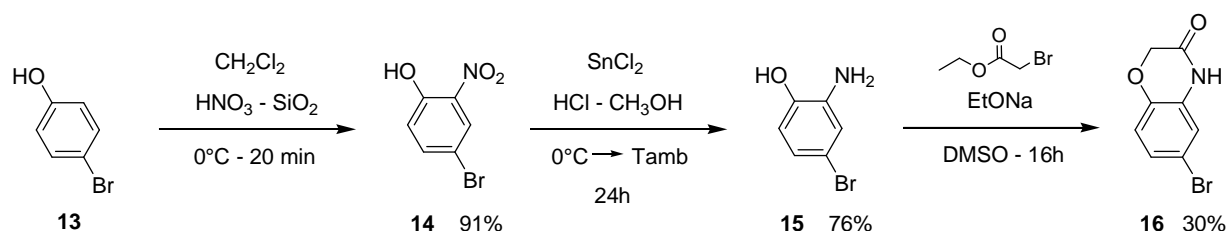


Figure 56 : Synthèse de la 6-bromobenzoxazinone **16**.

Pour la 5-bromobenzoxazolinone, deux stratégies de synthèse ont été envisagées impliquant soit l'utilisation de triphosgène ou de carbonyldiimidazole (CDI) en tant que donneur de CO soit directement du CO_{gaz} dans une réaction de carbonylation catalytique.

Dans un premier temps, des essais de réaction de carbonylation catalytique ont été réalisés au sein de l'équipe de carbonylation de l'Unité de Catalyse et Chimie du Solide de Lille 1. Afin de valider la procédure de Gabriele *et al.*²⁵⁰, les essais ont tout d'abord été effectués sur le dérivé non bromé. Un autoclave est chargé avec le 2-aminophénol **17**, le catalyseur PdI_2 et le solvant (Figure 57). Il est ensuite pressurisé avec 4 bars d'un mélange d'air et 20 bars de monoxyde de carbone. Après 12 heures de réaction, la benzoxazolinone **18** est isolée par colonne chromatographique avec un rendement de 42%. Ce rendement peut s'expliquer par la formation d'un produit secondaire, isolé et identifié comme étant la 2-aminophénoxazin-3-one **19**.²⁵⁰

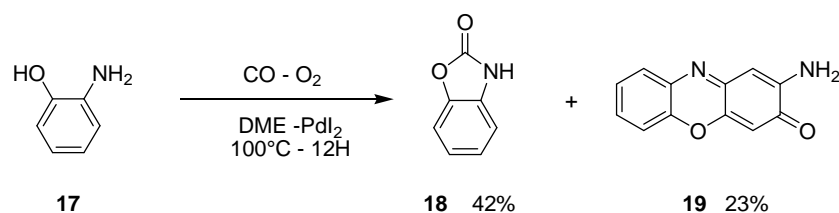


Figure 57 : Synthèse de la benzoxazolinone **18** par carbonylation catalytique.

La procédure ayant ainsi été validée, des essais ont été réalisés dans les mêmes conditions avec le 2-amino-4-bromophénol **15** (Figure 58). Cependant, la 5-bromobenzoxazolinone **20** n'a pu être obtenu par cette voie. En effet, un empoisonnement du catalyseur a été observé lors de cette réaction. Ces résultats s'expliquent par le fait que le catalyseur utilisé PdI_2 est un précurseur de Pd(II) . Or en milieu

²⁴⁹ M. von Wantoch Rekowski *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 18, 1288-1296

²⁵⁰ B. Gabriele *et al.*, *J. Organomet. Chem.*, **2003**, 687, 219-228

réducteur tel qu'un milieu contenant du CO, Pd(II) se réduit très facilement en Pd(0). L'halogénure d'aryle présent sur le dérivé **15** va alors pouvoir réaliser facilement une addition oxydante sur ce Pd(0) formé. Cette réaction d'addition oxydante conduit à la formation d'un complexe inactif pour la réaction de carbonylation.

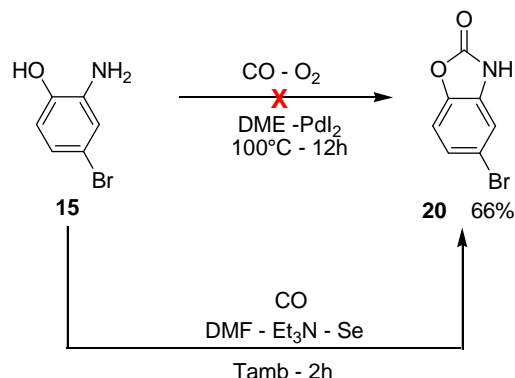


Figure 58 : Synthèse de la 5-bromobenzoxazolinone **20** par carbonylation catalytique.

Ces résultats nous ont incités à changer de catalyseur et notamment à envisager une catalyse au sélénium afin d'éviter une addition oxydante. Après 2h à température ambiante en présence de CO et de sélénium, une purification par colonne chromatographique a permis d'isoler la 5-bromobenzoxazolinone **20** avec un bon rendement (66%) (Figure 58).^{251, 252}

Les premières études mécanistiques réalisées sur les carbonylations catalytiques au sélénium ont montré que la réaction implique un sélénure de carbonyle, qui en réagissant avec une amine permet la formation d'un premier intermédiaire carbamoselénate **I** (Figure 59). Une addition nucléophile intramoléculaire du groupement hydroxyle sur le carbonyle de l'intermédiaire **I** aboutit à la formation d'un second intermédiaire **II** qui se dissocie pour donner l'hétérocycle souhaité et du sélénure d'hydrogène. Finalement, ce dernier réagit avec l'oxygène pour régénérer le sélénium qui sera de nouveau engagé dans le système réactionnel.

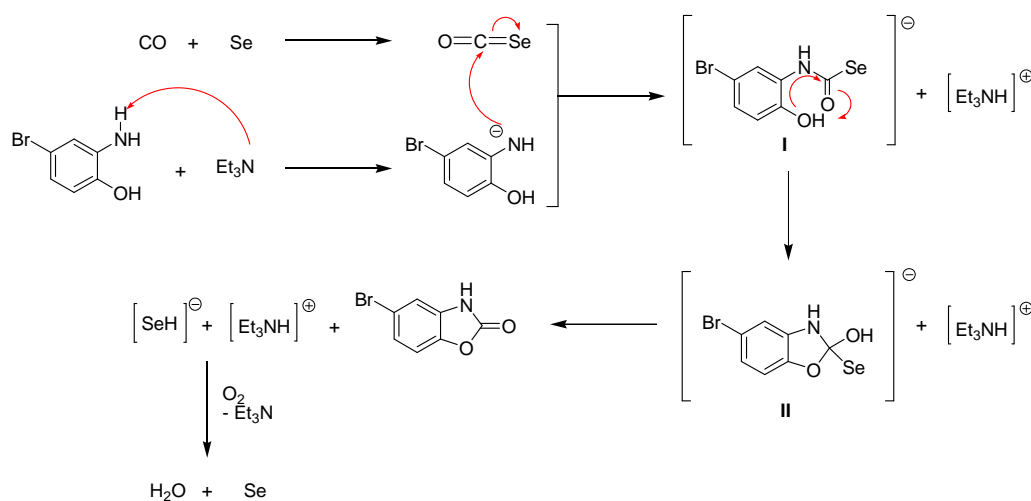


Figure 59 : Mécanisme réactionnel de carbonylation catalytique au Sélénium.

²⁵¹ N. Sonoda *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 24, 1969-1972

²⁵² T. Kihlberg *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3687-3692

En parallèle, la 5-bromobenzoxazolinone **20** a également été synthétisée par réaction du 2-amino-4-bromophénol **15** avec le triphosgène en présence de carbonate de potassium dans du DMF (Figure 60). Après 12 heures de réaction à 70°C, le dérivé bicyclique a été isolé avec un bon rendement de 80%.

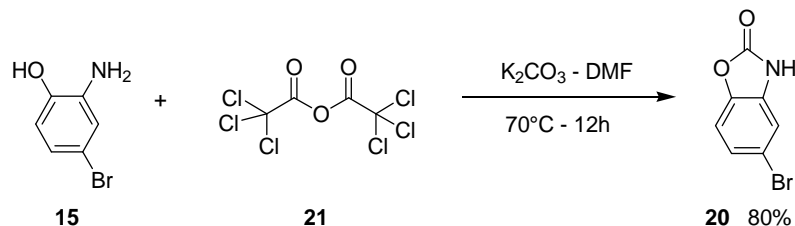


Figure 60 : Synthèse de la 5-bromobenzoxazolinone **20**.

Enfin, la 1-méthylbenzimidazolinone a été préparée selon une synthèse en trois étapes (Figure 61). La benzimidazolinone a tout d'abord été monoprotégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc).²⁵³ Le dérivé **23** résultant de cette protection a ensuite été engagé dans une méthylation en présence d'iodométhane dans du THF. Une purification par colonne chromatographique a permis d'isoler le composé méthylé **24** avec un rendement de 48%. Enfin, une réaction de déprotection réalisée dans une solution de dioxane saturée en HCl gaz a permis d'obtenir la 1-méthylbenzimidazolinone **25** sous forme chlorhydrate.

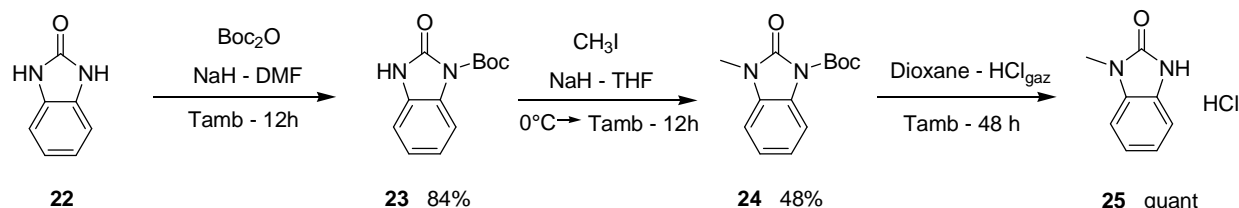


Figure 61 : Synthèse de la 1-méthylbenzimidazolinone **25**.

1.2 Synthèse des dérivés de la benzylméthylamine

L'introduction de la chaîne *N*-benzyl-*N*-méthylpropylamine sur les différents hétérocycles a été réalisée grâce à une synthèse en deux étapes (Figure 62). Dans un premier temps, le 1-bromo-3-chloropropane et la *N*-méthylbenzylamine sont engagés dans une substitution nucléophile réalisée dans le DMF en présence de carbonate de potassium. Une purification par colonne chromatographique a permis d'isoler le dérivé chloropropylylé **28** avec un excellent rendement (95%). Afin de conserver des quantités importantes sans risque de dégradation, le sel de chlorhydrate a été réalisé. Le dérivé chlorhydraté a ensuite été engagé dans une seconde substitution nucléophile en présence des différents hétérocycles. Les composés finaux **29** à **42** ont été obtenus après 24 à 72 heures de réactions. Une purification par chromatographie sur couche épaisse ou colonne chromatographique a été nécessaire à l'obtention des composés purs.

²⁵³ E. Badarau *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 1600-1603

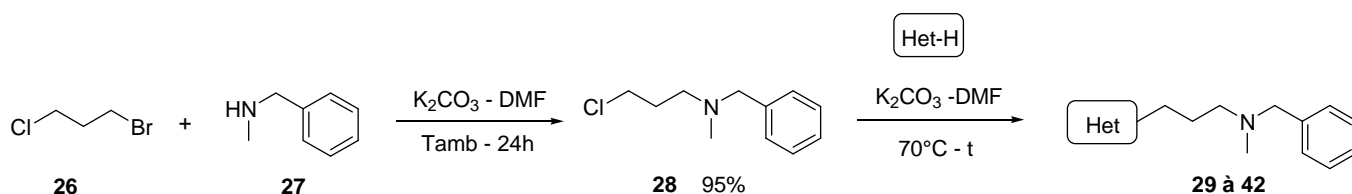
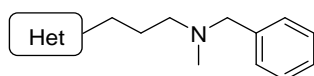


Figure 62 : Synthèse des composés finaux bicycliques avec la chaîne *N*-benzyl-*N*-méthylpropylamine.

Les conditions expérimentales ainsi que les rendements de réactions pour chacun des hétérocycles sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Conditions expérimentales et rendements de synthèses des composés finaux bicycliques avec la chaîne *N*-benzyl-*N*-méthylpropylamine.



Réf.	Het	t (h)	Rdt	Réf.	Het	t (h)	Rdt
29		24	79%	36		48	91%
30		48	57%	37		72	62%
31		24	95%	38		48	47%
32		72	23%	39		24	64%
33		48	54%	40		72	65%*
34		48	88%	41		24	-
35		48	86%	42		24	85%*

* Mélange des deux isomères de positions non séparables.

D'après ce tableau, certains composés ont été obtenus avec des rendements moyens voir faibles. Ceci peut être expliqué de plusieurs façons et notamment par le fait que des études biologiques étant

envisagées sur l'ensemble des composés, la pureté ($P_{\text{HPLC}} > 96\%$) des produits a donc été privilégiée à la quantité. D'autre part, en ce qui concerne les modulations des benzoxazolinones et des benzothiazolinones, les temps de réactions et les conditions de purification ont été optimisées, ce qui a permis d'améliorer les rendements de 23 à 95%. Une augmentation du rendement a été observée avec la diminution du temps de réaction pour les dérivés benzoxazolinones (**29**, **30**, **31** et **32**). Il est donc possible qu'un temps de réaction trop long entraîne la dégradation des composés. Pour les dérivés benzothiazolinones halogénés (**34**, **35** et **36**), un temps de réaction de 48h permettait d'obtenir les produits finaux avec de bons rendements (86-91%). Seul le composé non halogéné **33**, a été obtenu avec un rendement plus faible dans les mêmes conditions.

Pour les dérivés benzoxazinones **37** et benzothiazinones **38**, les réactions ont également été réalisées dans le DMF en présence de carbonate de potassium. Toutefois, une réaction dans le THF en présence d'hydrure de sodium aurait probablement permis d'améliorer les rendements (respectivement 62% et 47%). Les quantités de composés **37** et **38** obtenues étant suffisantes, les réactions n'ont pas été renouvelées dans ces conditions.

Le composé **40** a été obtenu dans un mélange 1:1 de deux isomères de positions. La formation de ces deux isomères peut être expliquée par le mécanisme représenté dans la Figure 63. Les composés **40a** et **40b** n'ont pas pu être séparés quelques soient les méthodes utilisées. Les propriétés électroniques des deux halogènes étant très proches, la réaction ne peut être orientée vers l'obtention de l'un ou l'autre des isomères. Il a donc été envisagé de synthétiser les composés finaux à partir d'hétérocycles symétriques afin d'éviter ce problème d'isomère de position.

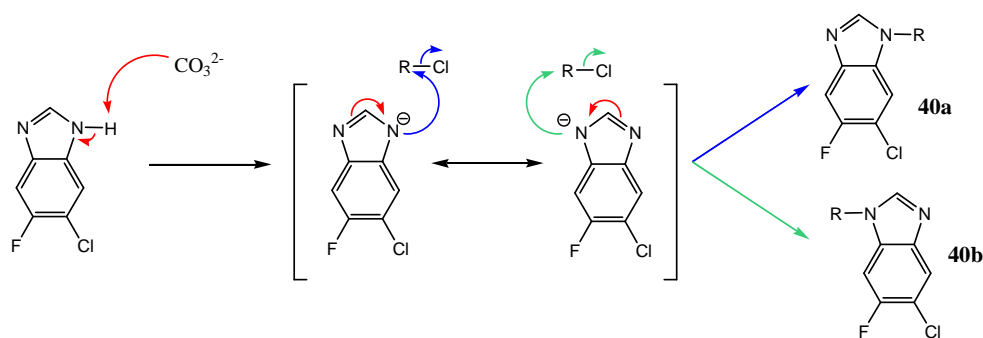


Figure 63 : Mécanisme de formation des deux isomères de position du composé **40**.

Le 5,6-dichlorobenzimidazole commercial a donc été sélectionné et introduit sur la chaîne latérale (Figure 64). La réaction a été réalisée dans les mêmes conditions que pour les autres hétérocycles mais n'a pas abouti à l'obtention du composé **41**.

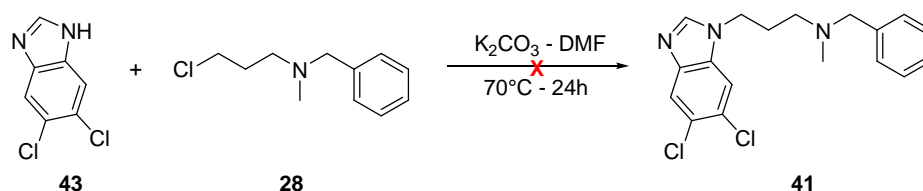


Figure 64 : Synthèse du dérivé benzimidazole **41**.

Une purification par colonne chromatographique a permis d'isoler non pas un produit comme attendu, mais un mélange 1:2 de deux composés. Des analyses LCMS et HPLC ont mis en évidence la présence de deux dérivés dichlorés de masses moléculaires identiques. Afin d'élucider la structure de chacun des dérivés, différentes analyses RMN (1D et 2D) ont été réalisées sur le mélange. Une analyse RMN NOESY a notamment mis en évidence des corrélations indiquant la présence des atomes de chlore en position 4/6 ou 5/7 (Figure 65). Ainsi, les composés **42a** et **42b** ont été identifiés comme étant respectivement le 1-[3-(*N*-benzyl-*N*-méthylamino)propyl]-5,7-dichlorobenzimidazole et le 1-[3-(*N*-benzyl-*N*-méthylamino)propyl]-4,6-dichlorobenzimidazole. Ces deux isomères de position n'ont pas pu être séparés quel que soit les méthodes utilisées. En effet, une séparation a été observée en HPLC analytique, mais n'a pas été possible en HPLC préparative.

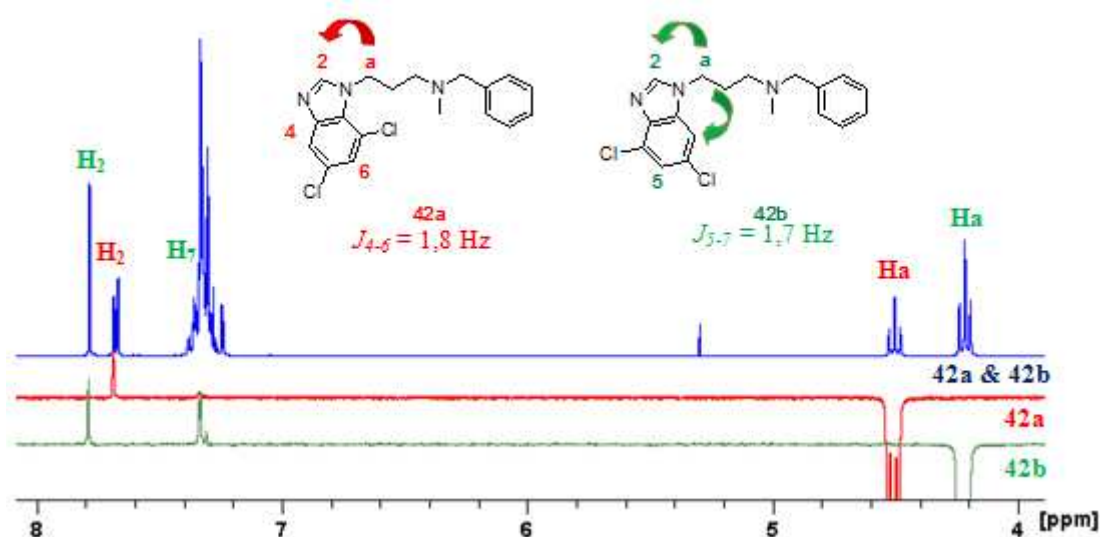


Figure 65 : Analyses RMN (^1H et NOESY) réalisées sur le mélange **42**. Les flèches vertes et rouges représentent les corrélations observées en NOESY.

Des analyses RMN ont par la suite été réalisées sur la matière première commerciale afin de mieux comprendre la formation des dérivés **42a** et **42b**. Les résultats obtenus ne correspondaient pas aux données décrites dans la littérature.²⁵⁴ De plus, le spectre RMN proton ne présentait pas les caractéristiques d'une molécule symétrique mais les caractéristiques d'un benzimidazole possédant deux atomes de chlore en position 4/6 ou 5/7 (Figure 66). Ainsi, le composé livré ne correspondait

²⁵⁴ J. Valdez *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 2221-2224

pas au 5,6-dichlorobenzimidazole commandé. Le fournisseur n'étant pas en mesure de nous fournir le 5,6-dichlorobenzimidazole, aucune réaction n'a pu être réalisée avec cet hétérocycle symétrique.

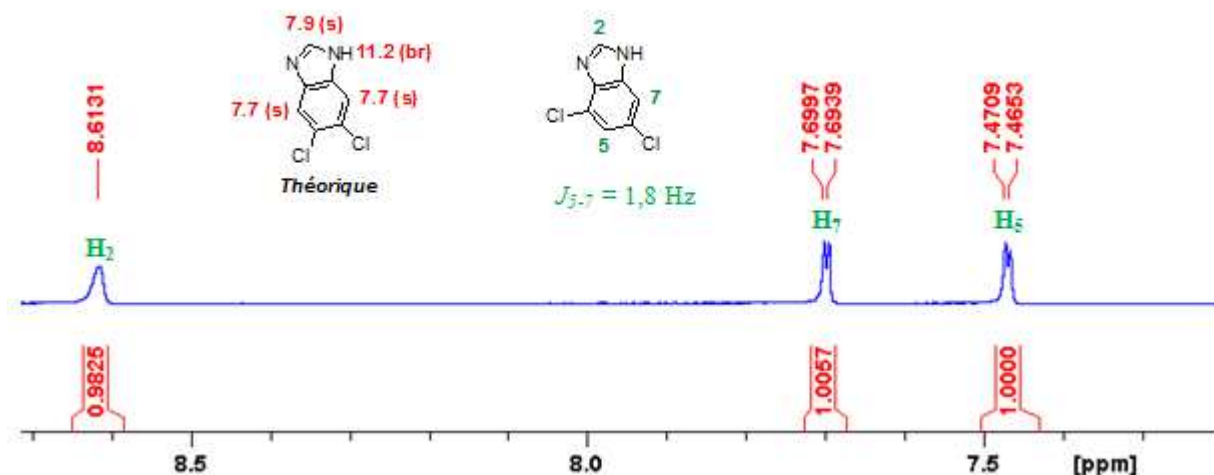


Figure 66 : Spectre RMN ^1H de la matière première et données théoriques²⁵⁴.

Finalement, les études *in vitro* ont été réalisées sur le mélange des composés **42a** et **42b**.

Enfin, afin de compléter les relations structure-activité, deux derniers hétérocycles ont été sélectionnés pour cette famille : la benzimidazolinone **22** et la 1-méthylbenzimidazolinone **25**. Dans un premier temps, les réactions ont été réalisées dans le DMF en présence de carbonate de potassium comme pour les dérivés précédents (Figure 67). Ces conditions ont permis d'isoler uniquement le composé **45**. En effet, la benzimidazolinone **22** possède deux sites réactifs, ce qui a conduit à un mélange complexe composé d'hétérocycles monosubstitué, disubstitué et non substitué, non séparables.

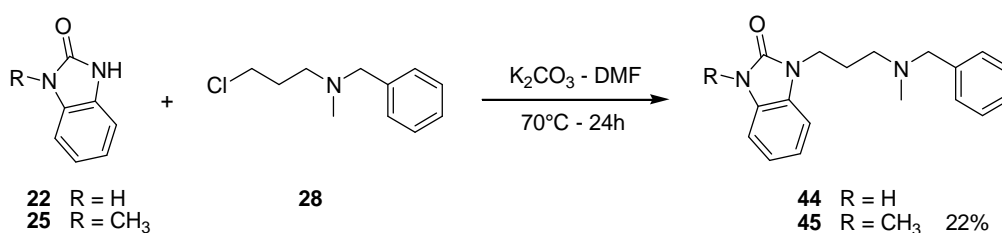


Figure 67 : Synthèse des dérivés de la benzimidazolinone **44** et **45**.

Par conséquent, afin d'éviter la disubstitution, les conditions expérimentales ont été modifiées. Le dérivé chloré **28** a notamment été introduit en défaut goutte à goutte dans le milieu réactionnel. La température et le temps de réaction ont également été diminués. Ces modifications n'ont entraîné aucune amélioration puisque le même mélange complexe de composés a été obtenu. Finalement, une nouvelle stratégie de synthèse a été envisagée en protégeant un des sites réactionnels par un groupement *tert*-butoxycarbonyl (Figure 68). L'hétérocycle protégé **23** a donc été engagé dans une substitution nucléophile avec le dérivé chloropropylé **28** en présence d'hydrure de sodium dans le

THF. Ces conditions avaient été utilisées pour la méthylation de l'hétérocycle **22** (Figure 61). Toutefois, malgré l'ensemble des précautions prises, un mélange complexe de dérivés mono- et disubstitués a été obtenu. En effet, au cours des différents essais réalisés, une déprotection en milieu basique du groupement Boc conduit à la formation du composé disubstitué **47**. Ainsi, aucune solution n'a pu être trouvée pour éviter la formation du composé disubstitué et obtenir en quantité suffisante le composé monosubstitué **44**.

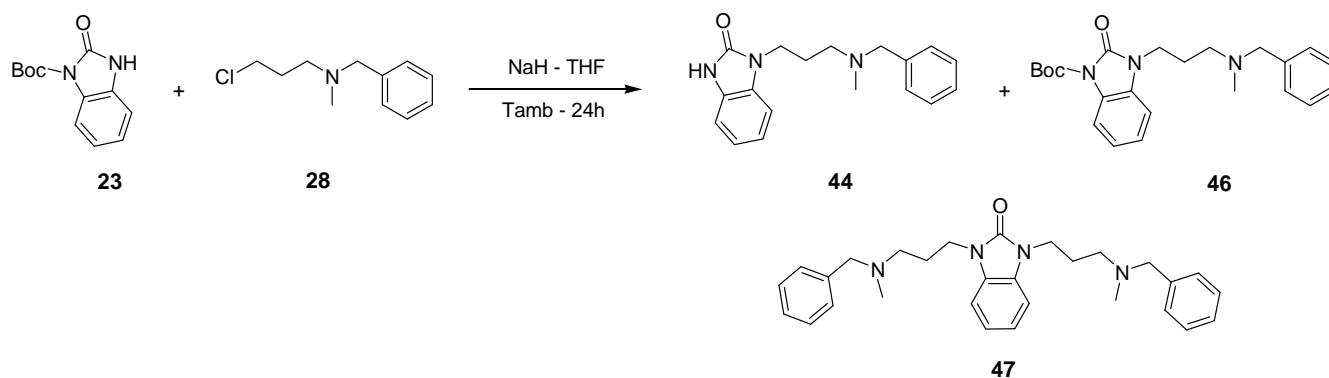


Figure 68 : Deuxième stratégie de synthèse pour le dérivé benzimidazolone **44**

1.3 Synthèse des dérivés de l'isoindoline

Des études sur la première génération de ligands σ_1 avaient démontré que le remplacement du motif benzylméthylamine par un motif isoindoline influençait peu l'affinité des ligands et permettait même de conserver le caractère agoniste des molécules.²⁴⁵ Or une cyclisation de la chaîne latérale permettrait d'empêcher la perte du benzyle et du méthyle observée au cours de la métabolisation.

La chaîne propylisoindoline a donc été introduite sur 7 dérivés bicycliques halogénés ou non selon la même stratégie que précédemment. Dans un premier temps, le 1-bromo-3-chloropropane et l'isoindoline sont engagés dans une substitution nucléophile dans l'acétonitrile en présence de carbonate de potassium. L'isoindoline étant un composé sensible qui se dégrade facilement, l'utilisation d'acétonitrile à la place de DMF permettait d'obtenir une réaction plus propre. Une purification par colonne chromatographique a permis d'isoler le dérivé chloropropylylé **49** avec un bon rendement (77%). Afin de conserver des quantités importantes sans risque de dégradation, le sel de chlorhydrate a été réalisé. Le dérivé chlorhydraté a ensuite été engagé dans une seconde substitution nucléophile avec les différents bicycles sélectionnés. Après 24 à 72 heures de réaction, les dérivés **50** à **56** ont été purifiés par chromatographie sur couche épaisse ou colonne chromatographique.

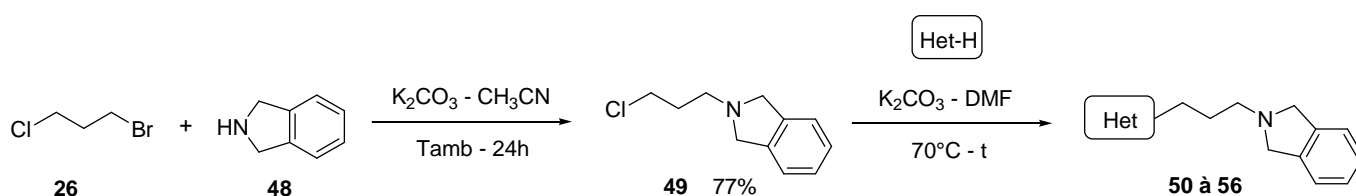
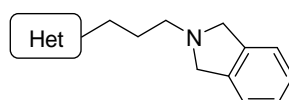


Figure 69 : Synthèse des composés finaux bicycliques avec la chaîne propylisoindoline.

Les conditions expérimentales ainsi que les rendements de réactions pour chacun des hétérocycles sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Conditions expérimentales et rendements de synthèses des composés finaux bicycliques avec la chaîne propylisoindoline.



Réf.	Het	t (h)	Rdt	Réf.	Het	t (h)	Rdt
50		24	70%	54		72	66%
51		24	65%	55		24	87%*
52		48	52%	56		72	69%**
53		48	64%				

*Mélange des deux isomères de positions non séparables.

** Réaction réalisée à 50°C.

L'ensemble des dérivés ainsi synthétisés ont été obtenus avec des rendements corrects (52-87%) et des puretés HPLC supérieures à 96%. Les conditions optimisées lors de la synthèse des dérivés précédents ont été utilisées pour les composés **50** à **54**.

Comme pour son analogue **42**, le composé **55** a été obtenu en mélange 1:2 de deux isomères de positions. Les différentes analyses réalisées, notamment de RMN 1D et 2D, ont permis d'identifier ces deux isomères comme respectivement le 1-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]-5,7-dichlorobenzimidazole **55a** et le 1-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]-4,6-dichlorobenzimidazole **55b**. Ces deux isomères de position n'ont pas pu être séparés quelques soient les méthodes utilisées. Les études biologiques ont donc été menées sur le mélange.

Enfin, pour le dérivé de la 1-méthylbenzimidazolinone **56**, une optimisation des conditions expérimentales a été réalisée. En effet, son analogue **45** avait été obtenu après 24h de réaction à 70°C dans le DMF avec un faible rendement de 22%. Des changements de solvant (DMF, acétonitrile, THF), de base (K₂CO₃, NaH), de température et de temps de réaction ont été opérés. Le composé **56** a finalement été obtenu après 72 heures de réaction dans le DMF à 50°C avec un rendement de 62%. Ces conditions permettaient non seulement de laisser la réaction assez longtemps pour avoir le composé en assez grande quantité mais aussi d'éviter toute dégradation du groupement isoindolique liée à une température trop élevée et un temps de réaction trop long.

1.4 Synthèse des dérivés de la phényléthylamine

Les études antérieures réalisées sur la première génération de ligands σ_1 avaient également montré que la longueur de la chaîne latérale influençait peu l'affinité des ligands pour la protéine σ_1 .²⁴¹ Il a donc été envisagé d'augmenter d'un carbone cette chaîne afin de limiter la métabolisation et bloquer la perte du benzyle.

La chaîne *N*-méthyl-*N*-phényléthylpropylamine a ainsi été introduite sur deux bicycles bromés. Ces deux hétérocycles ont été choisis non seulement pour leur originalité structurale mais aussi afin d'observer l'impact de la longueur de la chaîne sur de telles structures comparé à leurs analogues benzylaminé **35** et **37**. Une synthèse en deux étapes a été réalisée pour obtenir les dérivés **59** et **60**. Dans un premier temps, le 1-bromo-3-chloropropane et la *N*-méthyl-*N*-phényléthylamine sont engagés dans une substitution nucléophile réalisée dans le DMF en présence de carbonate de potassium. Une purification par colonne chromatographique permet d'isoler le dérivé chloropropylylé **58** avec un rendement correct (65%). Ce dérivé est ensuite engagé dans une seconde substitution nucléophile avec les deux hétérocycles. Les composés finaux **59** et **60** ont été obtenus après 48 à 72 heures de réaction. Une purification par colonne chromatographique était nécessaire à l'obtention des composés purs.

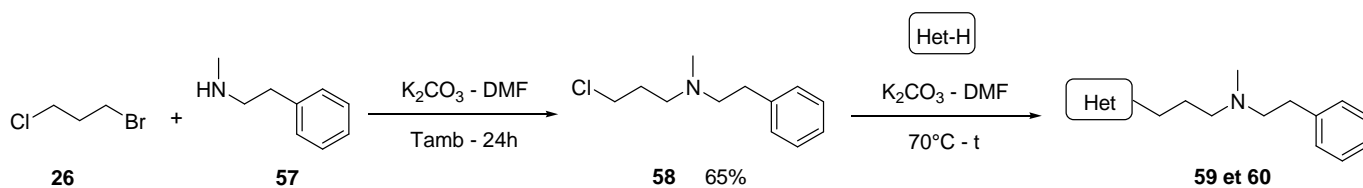
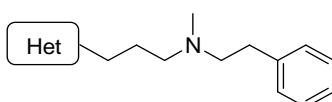


Figure 70 : Synthèse des composés finaux bicycliques avec la chaîne *N*-méthyl-*N*-phényléthylpropylamine.

Les conditions expérimentales ainsi que les rendements de réactions pour les deux hétérocycles sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Conditions expérimentales et rendements de synthèses des composés finaux bicycliques avec la chaîne *N*-méthyl-*N*-phényléthylpropylamine.

Réf.	Het	t (h)	Rdt
59		48	57%
60		72	62%

Les mêmes conditions expérimentales que pour leurs analogues précédents ont été utilisées pour la synthèse des composés **59** et **60**. Ils ont ainsi été obtenus avec des rendements corrects de respectivement 57% et 62%, ainsi que des puretés HPLC supérieures à 98%.

1.5 Etudes des propriétés biologiques

Afin de valider l'ensemble des pharmacomodulations réalisées au sein de cette famille de composés, les propriétés biologiques ont été évaluées. Ainsi, des études d'affinité σ_1 , de sélectivité envers σ_2 et de cytotoxicité sur des cellules neuronales ont été réalisées au niveau de la Faculté de Pharmacie de Lille ou par la société CEREP.

Il est important de préciser que l'ensemble de ces analyses n'a pas été effectué sur les bases libres des composés mais sur les sels de chlorhydrates correspondants. En effet, la majorité des dérivés synthétisés étant sous forme d'huile, les sels de chlorhydrate (largement utilisés dans la littérature) permettent de conserver les produits sans risque de dégradation et d'assurer une meilleure solubilité aqueuse.

1.5.1 Affinité et sélectivité

L'évaluation des affinités σ_1 et σ_2 a été réalisée par la société CEREP, d'après une procédure décrite par Ganapathy *et al.*²⁵⁵ (Partie expérimentale).

Cette étude a été menée en duplicate avec moins de 10% de déviation sur des membranes Jurkat (cellules lymphocytaires humaines). Les membranes sont incubées en présence d'un ligand spécifique ou non et d'une gamme de concentration des composés testés. La radioactivité est ensuite déterminée par scintillation. Pour les études d'affinité σ_1 , la [³H](+)pentazocine (concentration de 15 nM) est utilisée comme radioligand de référence et l'halopéridol (concentration 10 μ M) comme ligand non

²⁵⁵ M. E. Ganapathy *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, 289, 251-260

spécifique. Dans le cas de la protéine σ_2 , le [H^3] DTG (concentration de 25 nM) est utilisé comme radioligand de référence et l'halopéridol (concentration 10 μ M) comme ligand non spécifique.

Les constantes d'affinité σ_1 (K_i) ont été déterminées à partir des valeurs d'IC₅₀ correspondantes pour chacun des composés finaux **29** à **60**. Pour les composés présentant une forte affinité σ_1 , la sélectivité envers σ_2 a également été déterminée.

D'après les résultats rassemblés dans le Tableau 6, le remplacement du noyau Tic-hydantoïne par différents hétérocycles bicycliques semble affecter fortement l'affinité envers les récepteurs σ_1 . En effet, même si certaines modulations entraînent une perte dramatique de l'affinité comparé au composé de référence **A5**, une affinité importante est maintenue voire significativement améliorée pour certains dérivés (Figure 71).

En ce qui concerne la nature de l'hétérocycle, une influence de l'hétéroatome sur l'affinité peut être observée pour les dérivés non-halogénés. Le dérivé benzothiazolinone **33** ($K_i = 10,3$ nM) s'est montré 5 fois plus affin que ses analogues oxygéné **29** ($K_i > 50$ nM), azoté **45** ($K_i = 65,4$ nM) et même que le dérivé benzimidazole **39** ($K_i > 50$ nM). D'autre part, si la taille de l'hétérocycle est augmentée de 5 à 6 atomes, la présence d'oxygène provoque une perte d'affinité (**37**, $K_i > 50$ nM). En comparaison, l'analogue soufré **38** conserve une bonne affinité avec une constante de 2,2 nM.

Les différents modèles pharmacophoriques des ligands σ_1 mettent en évidence l'importance du caractère hydrophobe des deux régions encombrées. Or, la présence d'atomes d'halogène sur des molécules permet d'augmenter ce caractère hydrophobe. Il existait donc un intérêt particulier à introduire de tels atomes sur nos structures. Pour cette étude, des atomes de brome, de chlore et de fluor ont été introduits sur la partie hétérocyclique des composés. Pour la majorité des dérivés halogénés, une amélioration significative de l'affinité est observée comparé aux analogues non halogénés. Dans le cas de l'hétérocycle benzothiazolinone (**33-36**), les composés halogénés présentent une affinité 2 à 10 fois plus importante. Pour les dérivés benzoxazolinones (**29-32**), l'amélioration est encore plus importante (> 50). Pour ces deux familles, quelque soit la nature de l'hétérocycle, les dérivés halogénés présentent des affinités σ_1 très intéressantes avec des constantes inférieures à 7 nM. De plus, la nature de l'halogène semble influencer l'affinité envers les récepteurs σ_1 puisque les composés bromés **30** et **34** présentent des constantes au minimum 2 fois plus importantes que leurs analogues chlorés **32** et **36**. Au contraire, la position de l'halogène ne semble pas moduler l'affinité. En effet, les dérivés 5-bromo **30** et **34**, et les dérivés 6-bromo **31** et **35** possèdent tous des constantes comprises entre 1 et 3 nM.

La modification de la chaîne aminée latérale sur la première génération de ligands avait montré un intérêt pour la stabilité métabolique sans engendrer de diminution significative de l'affinité des ligands. Des résultats identiques ont été obtenus sur les dérivés bicycliques lorsque la chaîne a été augmentée d'un carbone. Ainsi, le dérivé **59** présente une constante d'affinité du même ordre de grandeur que son analogue **35** (respectivement $K_i = 1,4$ nM et $K_i = 0,6$ nM). Toutefois, le

remplacement de la méthylbenzylamine par l'isoindoline provoque une nette diminution de l'affinité. En effet, en comparaison aux dérivés méthylbenzylamine **31** et **42** qui possèdent de bonnes affinités (respectivement $K_i = 0,9$ nM et $K_i = 5,1$ nM), les analogues isoindoliques **51** et **55** présentent des constantes supérieures à 50 nM. A part les composés **53** et **52**, l'ensemble des dérivés isoindoliques se sont avérés peu affins envers les récepteurs σ_1 . Pour ces deux composés, la présence d'un substituant bromé est à noter. Enfin, des études complémentaires permettront de préciser les constantes d'affinités pour tous les composés présentant des constantes supérieures à 50 nM.

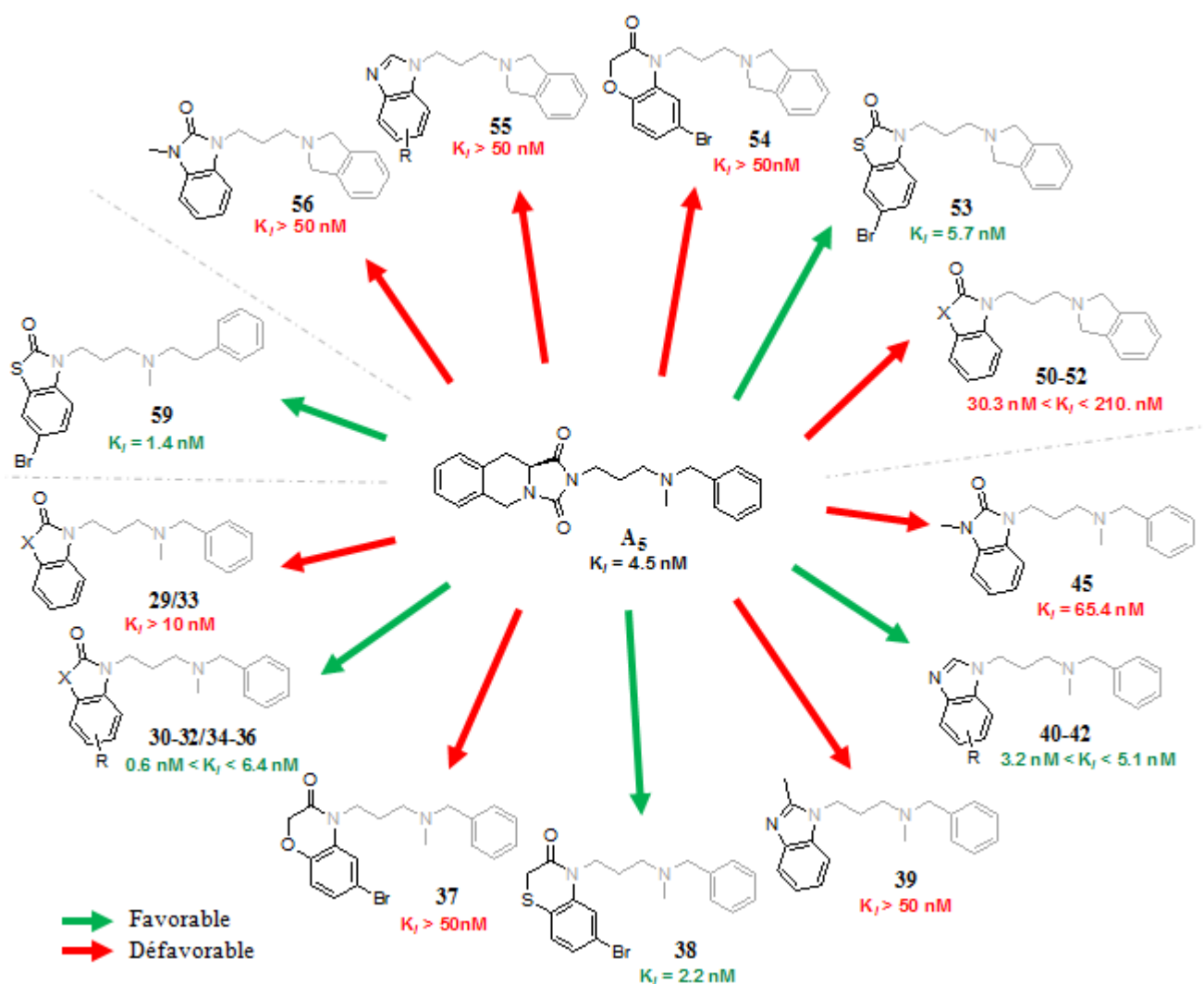


Figure 71 : Relations structure-activité de la famille des dérivés bicycliques.

Enfin, en plus de l'étude de l'affinité σ_1 , la sélectivité envers la protéine σ_2 des meilleurs ligands a également été examinée. Les résultats, présentés dans le Tableau 6, montrent clairement une affinité pour le récepteur σ_2 plus faible ($15,9$ nM $< K_i < 165,4$ nM) que pour le récepteur σ_1 , ce qui indique une certaine sélectivité des composés bicycliques. Il semblerait que les dérivés benzothiazolinones **34-36** présentent une meilleure sélectivité, avec des ratios σ_2/σ_1 respectivement de 35, 48 et 35, que leurs analogues oxygénés **30-32** (ratios σ_2/σ_1 de 13, 37 et 16). Dans le cas des hétérocycles soufrés, la modification de la taille de l'hétérocycle ne semble pas influencer la sélectivité σ_2/σ_1 .

1.5.2 Cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité des composés a été réalisée par le Dr Delphine LE BROCC, au sein de la plateforme de binding de la Faculté de Pharmacie de Lille (Partie expérimentale).

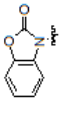

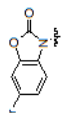
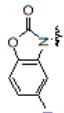
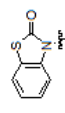
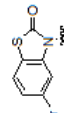
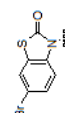
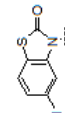
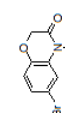
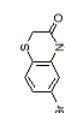

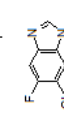
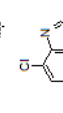
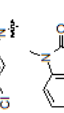
La mesure de la prolifération cellulaire s'effectue *via* l'activité enzymatique de la succinyl déshydrogénase mitochondriale. Cette enzyme, active dans les cellules vivantes est capable de cliver le MTT ou bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium. En effet, le MTT est un tétrazole de couleur jaune qui est réduit en dérivé formazan de couleur violette dans les mitochondries des cellules vivantes. Il est important de noter que cette réduction s'effectue uniquement lorsque les réductases sont actives, et par conséquent, cette conversion est liée au nombre de cellules vivantes. L'apparition du MTT-formazan est suivie par spectrométrie, en mesurant l'absorbance à 570 nm avec une correction à 630 nm. Ainsi, l'augmentation de l'absorbance est le marqueur de la prolifération cellulaire. En effet, plus il reste de cellules vivantes, plus il se forme de dérivés formazan de couleur violette.

Cette étude a été réalisée en triplicate avec moins de 10% de déviation sur une lignée cellulaire de neuroblastome humain SY5Y. Les constantes d'inhibition de la prolifération cellulaire ont été déterminées pour tous les composés finaux **29** à **60**.

D'après les résultats présentés dans le Tableau 6, l'ensemble des composés montre une cytotoxicité modérée voire faible. En général, les dérivés soufrés possèdent des effets cytotoxiques plus importants que leurs analogues oxygénés et azotés. De plus, la chaîne propylisindoline entraîne une diminution de la cytotoxicité en comparaison à la chaîne *N*-benzyl-*N*-méthylpropylamine. Sept composés (**29**, **32**, **50**, **51**, **52**, **54** et **56**) présentent des IC₅₀ supérieures à 100 µM. Les autres dérivés montrent des effets cytotoxiques plus modérés mais toujours raisonnables, avec des IC₅₀ comprises entre 10 µM et 60 µM. Enfin, parmi ces 23 nouveaux ligands σ₁, les composés **30-32** (IC₅₀ = 14,2 µM, 58,8 µM et 13,2 µM) présentent des résultats très intéressants avec des index de sélectivité (IS = IC₅₀ (SY5Y)/K_i (σ₁)) supérieurs à 10 000. Les meilleurs composés **31** et **35** possèdent des IS de respectivement 63 291 et 23 250.

Pour conclure, plusieurs ligands avec une affinité importante, une bonne sélectivité et une faible cytotoxicité ont été identifiés dans cette famille de composés. La présence d'halogène comme le brome ou le chlore sur la partie bicyclique permet d'améliorer significativement l'affinité envers les récepteurs σ₁ dans la majorité des cas. Ce résultat souligne, en accord avec la littérature, l'importance de la présence de tels atomes sur les structures des ligands σ₁. Enfin, en considérant l'originalité structurale, les meilleurs résultats ont été obtenus avec la 3-[3-(*N*-benzyl-*N*-méthylamino)propyl]-6-bromobenzothiazolin-2-one **35** qui s'est montré très affin envers σ₁ (K_i = 0,6 nM), sélectif envers σ₂ (ratio σ₂/σ₁ de 48) et peu toxique (IS = 23 250).

Tableau 6 : Constantes d'affinité, de sélectivité et IC₅₀ (SY5Y) pour les dérivés bicycliques.
* % inh de la prolifération cellulaire à 100 μM.

Het	K _i (nM)			IS	K _i (nM)			IC ₅₀ (μM) SY5Y	Réf.	K _i (nM)			IC ₅₀ (μM) SY5Y			
	σ ₁	σ ₂	σ ₁		σ ₁	σ ₂	σ ₁			σ ₂						
	29	> 50	-	> 100	-	> 50	-	30%*	50	> 50	-	30%*	59	1,45	-	38,7
	30	1,2	15,9	14,2	11463	1,2	15,9	-	51	210,1	-	13.8%*	53	5,7	-	31,4
	31	0,9	34,9	58,9	63399	0,9	34,9	-	52	30,3	-	-	60	-	-	77,2
	32	6,4	100,5	100,0	15500	6,4	100,5	-	53	5,7	-	31,4	59	1,45	-	38,7
	33	10,3	-	10,0	973	10,3	-	-	54	> 50	-	0%	60	-	-	77,2
	34	3,1	110,5	26,5	8417	3,1	110,5	-	55	> 50	-	19,9	59	1,45	-	38,7
	35	0,6	27,3	13,2	23250	0,6	27,3	-	56	> 50	-	27%*	59	1,45	-	38,7
	36	4,7	165,4	10,0	2124	4,7	165,4	-	56	> 50	-	27%*	59	1,45	-	38,7
	37	> 50	-	13,4	-	> 50	-	-	54	> 50	-	0%	60	-	-	77,2
	38	2,2	47,7	18,7	8631	2,2	47,7	-	55	> 50	-	19,9	59	1,45	-	38,7
	39	> 50	-	52,3	-	> 50	-	-	56	> 50	-	27%*	59	1,45	-	38,7
	40	3,2	-	69,7	22138	3,2	-	-	55	> 50	-	19,9	59	1,45	-	38,7
	42	5,1	-	33,9	6709	5,1	-	-	56	> 50	-	27%*	59	1,45	-	38,7
	45	65,4	-	73,9	1079	65,4	-	-	56	> 50	-	27%*	59	1,45	-	38,7

2. Famille des dérivés tricycliques

La première génération de ligands σ_1 conçue au laboratoire possédait une structure tricyclique : le noyau Tic-hydantoïne. D'autre part, certains ligands σ_1 bien connu comme le rimcazole possèdent également des hétérocycles de structure tricyclique. C'est pourquoi il a été envisagé de remplacer le noyau Tic-hydantoïne par d'autres structures tricycliques originales telles que les β - et γ -carbolines ou encore les phénoxazines et phénothiazines. Le motif benzoxazolinone ayant montré des résultats très intéressants dans la famille précédente, des dérivés tricycles de ce motif ont également été sélectionnés. Afin d'étudier l'encombrement stérique du centre hydrophobe principal des ligands σ_1 , deux modes de liaisons de la chaîne latérale sur l'hétérocycle ont été envisagés pour cette famille : une liaison sur le cycle latéral et une liaison sur le cycle central (Figure 72).

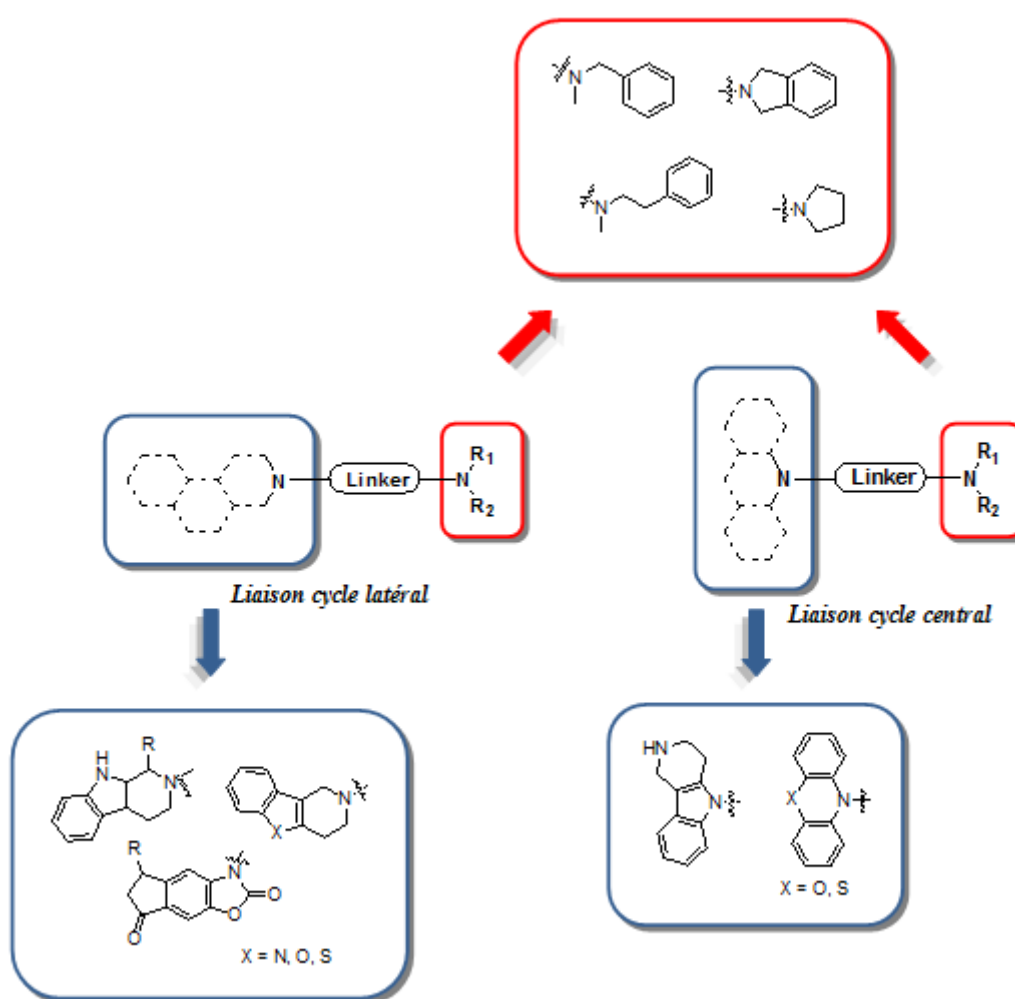


Figure 72 : Famille des dérivés tricycliques : deux modes de liaison.

2.1 Synthèse des tricycles

Même si un certain nombre d'hétérocycles utilisés au cours de cette étude étaient accessibles dans le commerce ou au laboratoire, les autres ont fait l'objet d'une synthèse au cours de ce projet.

Les dérivés benzoxazolinones ayant montré des résultats très intéressants sur σ_1 , ce motif bicyclique a été sélectionné et fonctionnalisé avec un cycle supplémentaire afin d'obtenir des dérivés tricycliques et d'explorer l'encombrement stérique toléré par la protéine. Si cette famille montre des résultats intéressants, des modulations supplémentaires pourront être envisagées grâce à la présence d'une fonction cétone notamment. Ces composés tricycliques dérivés de la benzoxazolinone étaient accessibles au laboratoire et avaient été préparés selon une synthèse en trois étapes décrite par Delot *et al.*²⁵⁶ (Figure 73). Une acylation de la benzoxazolinone **20** par le chlorure d'éthanoyle dans le DMF en présence de chlorure d'aluminium avait permis d'obtenir le composé **61**. La seconde étape correspondait à une réaction de crotonisation entre le composé **61** et les dérivés benzaldéhydes commerciaux correspondants. Les composés **64** et **65** ainsi obtenus avaient été ensuite cyclisés dans l'acide polyphosphorique pour donner les dérivés tricycliques **66** et **67**.

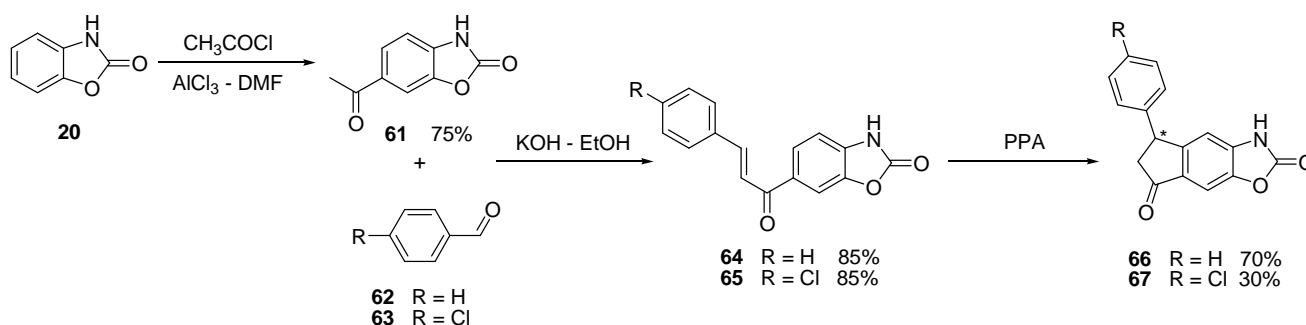


Figure 73 : Synthèse des dérivés tricycliques **66** et **67**.

La 1-phényl- β -carboline **69** avait été préparée par une réaction de Pictet-Spengler.²⁵⁷ La tryptamine **68** avait été mise en réaction avec le benzaldéhyde dans un mélange de dichlorométhane et d'acide trifluoroacétique pour donner le composé désiré **69** (Figure 74). Les hétérocycles **66**, **67** et **69** présentent un carbone asymétrique et ont été obtenus sous forme racémique. Une résolution possible par HPLC chirale ou par synthèse énantiosélective sera envisagée par la suite si nécessaire.

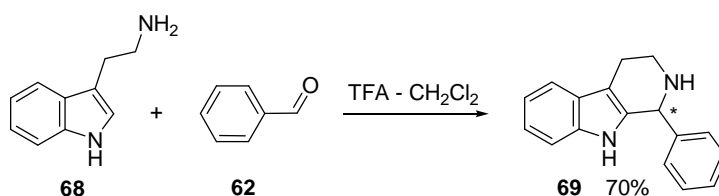


Figure 74 : Synthèse de la 1-phényl- β -carboline **69**.

Cette famille de tricycles a été complétée par la synthèse de deux nouveaux hétérocycles. Dans un premier temps, la γ -carboline **72** a été préparée selon une réaction de Fischer décrite par Bridoux *et*

²⁵⁶ M. Delot *et al.*, *Synthesis*, **2009**, 2009, 3819-3822

²⁵⁷ F. Hadjaz *et al.*, *Tetrahedron*, **2008**, 64, 10004-10008

al.²⁵⁸ en 2006 (Figure 75). Un mélange équimolaire de *N*-phénylhydrazine et de 4-pipéridone dans de l'éthanol anhydre est chauffé à reflux sous atmosphère inerte. Le composé **72** a ainsi été obtenu après précipitation dans l'éthanol à température ambiante avec un rendement de 64%. Afin d'améliorer le rendement de réaction, des essais de purification par colonne chromatographique ont été réalisés. Cependant, une importante dégradation du composé sur la colonne n'a pas permis d'obtenir un résultat satisfaisant.

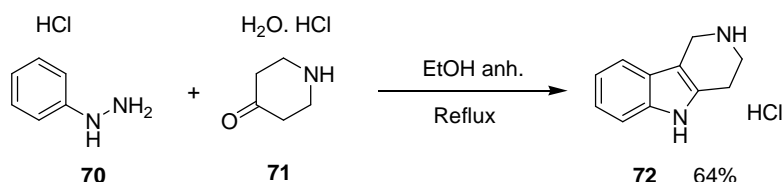


Figure 75 : Synthèse de la γ -carboline **72**.

Le dérivé benzofuopyridine **76** a été obtenu grâce à une synthèse en deux étapes (Figure 76). Une réaction de Fischer par catalyse acide a permis de former l'hétérocycle à partir d'un mélange équimolaire de *O*-phénylhydroxylamine et de 4-pipéridone protégée. Le composé **75** a été isolé après purification par colonne chromatographique avec un bon rendement de 84%. Cette étape a été suivie par une étape de déprotection en milieu basique pour donner le composé tricyclique désiré **76** avec un rendement de 94%. Cette voie de synthèse en deux étapes a été privilégiée à la précédente pour des raisons de purification. En effet, le composé **75** est stable sur silice contrairement à son analogue déprotégé **76**.

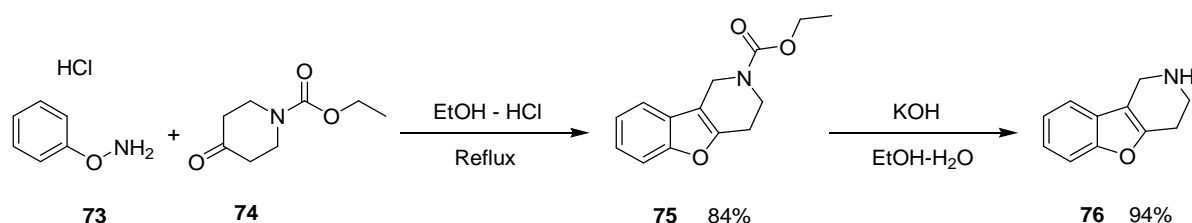


Figure 76 : Synthèse de la 1,2,3,4-tétrahydrobenzofuro[3,2-*c*]pyridine **76**.

2.2 Synthèse des dérivés de la benzylméthylamine

Dans un premier temps, les dérivés issus de la benzoxazolinone ainsi que les dérivés β - et γ -carboline substitués sur l'atome d'azote latéral ont été synthétisés. Une stratégie, identique à celle utilisée pour les dérivés bicycliques, a été employée pour l'obtention des composés **77** à **82**. Le dérivé chloropropylé **28**, précédemment synthétisé, a été engagé dans une substitution nucléophile avec les différents hétérocycles. Une purification par chromatographie sur couche épaisse ou par colonne chromatographique a été nécessaire à l'obtention des composés finaux purs.

²⁵⁸ A. Bridoux *et al.*, *J. Heterocyclic Chem.*, **2006**, 43, 571-578

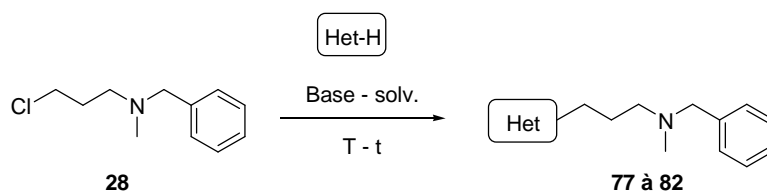
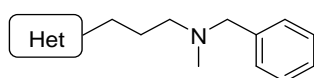


Figure 77 : Synthèse des composés finaux tricycliques avec la chaîne *N*-benzyl-*N*-méthylpropylamine.

Pour certains composés, une optimisation des conditions expérimentales était indispensable pour éviter la dégradation du milieu réactionnel qui pouvait se produire. Ces conditions ainsi que les rendements de réactions pour chacun des hétérocycles sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Conditions expérimentales et rendements de synthèses des composés finaux tricycliques avec la chaîne *N*-benzyl-*N*-méthylpropylamine.



Réf.	Het	Base	Solvant	T (°C)	t (h)	Rdt
77		K ₂ CO ₃	DMF	70	24	39%
78		K ₂ CO ₃	DMF	70	24	27%
79		K ₂ CO ₃	CH ₃ CN	70	48	47%
80		K ₂ CO ₃	CH ₃ CN	70	96	35%
81		K ₂ CO ₃	CH ₃ CN	70	72	3%
82		K ₂ CO ₃	CH ₃ CN	70	48	57%

L'ensemble des composés a été obtenu avec des puretés HPLC supérieures à 96%. Les composés tricycliques dérivés de la benzoxazolinone **77** et **78** ont été synthétisés dans les mêmes conditions expérimentales que les dérivés bicycliques. Malgré les faibles rendements de réactions (respectivement 39% et 27%), les composés finaux ont été obtenus dans des quantités suffisantes pour

les études biologiques. Les résultats de ces dernières étant peu concluants, aucune optimisation de réaction n'a été réalisée sur ces dérivés et aucun analogue synthétisé.

D'autre part, pour les dérivés des β - et γ -carbolines, des problèmes de dégradation du milieu réactionnel ainsi que du composé lors de la purification ont été observés. Il semblerait qu'un temps de réaction supérieur à 48 heures et un solvant tel que l'acétonitrile ne soient pas des conditions optimales. Les substitutions nucléophiles dans l'eau étant de plus en plus décrites en chimie verte^{259, 260, 261}, le remplacement de l'acétonitrile par l'eau a donc été envisagé. Une étude des conditions expérimentales par suivi HPLC a été réalisée afin de déterminer le temps de réaction, la température ainsi que la base à utiliser (Figure 78). Ces études ont montré une dégradation plus importante dans l'acétonitrile que dans l'eau dès 24 heures de réaction. Toutefois, afin d'assurer la solubilité de l'hétérocycle dans le milieu réactionnel, un mélange eau/acétonitrile (2 :1, v/v) sera privilégié. Ainsi, il a été établi que les meilleures conditions pour cette réaction sont un mélange eau/acétonitrile en tant que solvant, la soude comme base et une température de 50°C. Ces conditions ont donc été utilisées pour les réactions suivantes engageant la γ -carboline comme hétérocycle.

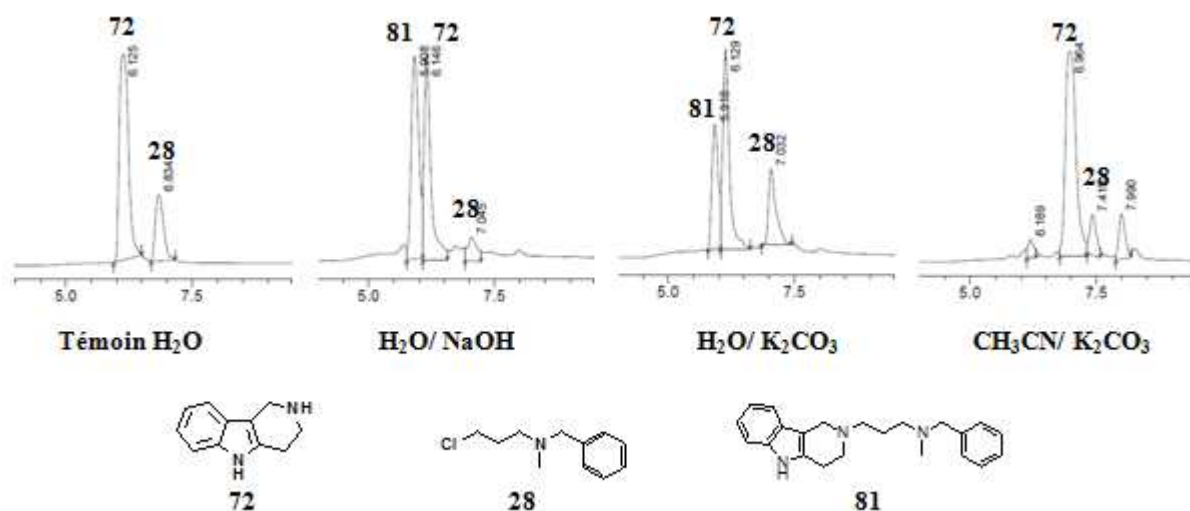


Figure 78 : Etude HPLC des conditions expérimentales de la substitution nucléophile dans différents milieux. Représentation des profils HPLC obtenus après 24h de réaction à 50°C en présence de différentes bases (K_2CO_3 ou NaOH) dans différents solvants (H_2O ou CH_3CN). Chaque produit est identifié par sa référence sur les chromatogrammes.

D'autre part, dans le but d'étudier l'encombrement stérique toléré par le premier centre hydrophobe des ligands σ_1 , il a été envisagé de substituer la chaîne latérale sur l'atome d'azote indolique du dérivé γ -carboline. Pour cela, une synthèse en trois étapes a été réalisée (Figure 79). Une réaction de Fischer a permis de former l'hétérocycle à partir d'un mélange équimolaire de phénylhydrazine et de 4-pipéridone protégée. Le composé **84** a ainsi été isolé après purification par colonne chromatographique avec un rendement de 45%. Cette étape a été suivie par une substitution

²⁵⁹ P. G. Cozzi *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 4162-4166

²⁶⁰ V. K. Tandon *et al.*, *Tet. Lett.*, **2009**, 50, 5896-5902

²⁶¹ J. Li *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 2011, 229-233

nucléophile réalisée dans le THF en présence d'hydrure de sodium. Les conditions précédemment décrites ne permettent pas de substituer l'atome d'azote indolique. Une base forte a donc été nécessaire pour arracher ce proton faiblement acide. Le dérivé **85** a été obtenu après purification avec un rendement de 30%. La dernière étape est une étape de déprotection en milieu basique qui permet d'obtenir le composé tricyclique désiré **86** avec un rendement de 82%.

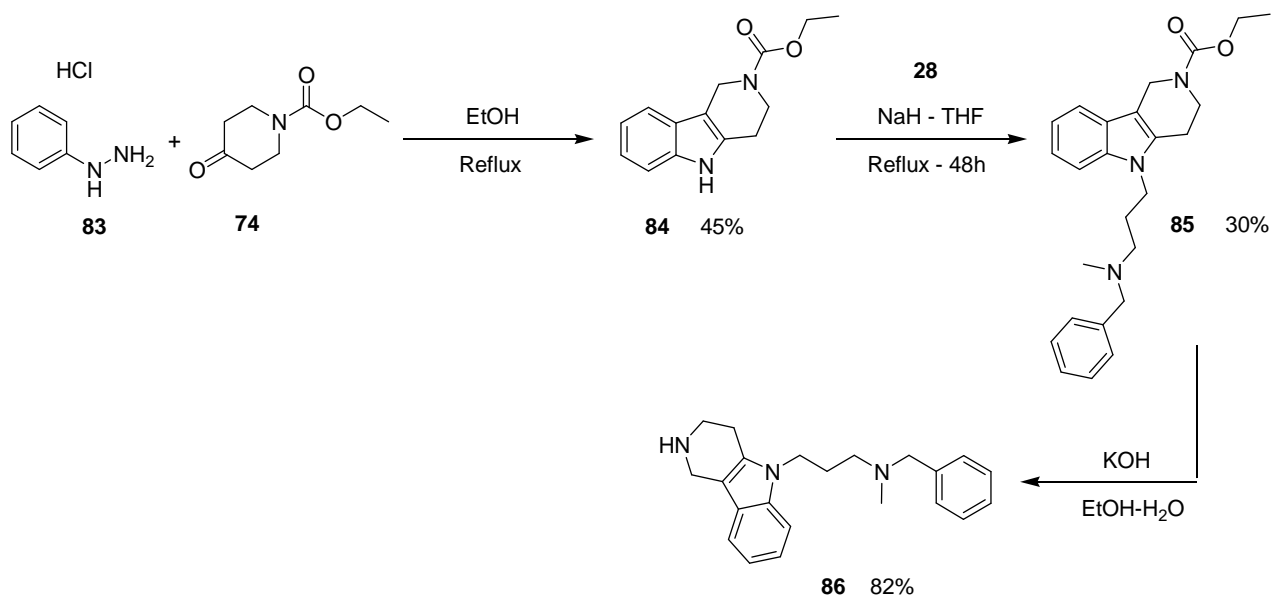


Figure 79 : Synthèse du dérivé **88** : substitution nucléophile sur l'atome d'azote indolique de la γ -carboline.

Cette série de composés substitués sur le cycle central a été complétée par des dérivés de phénothiazine et phénoxazine. Dans la littérature, les substitutions nucléophiles sur de tels tricycles sont décrites généralement dans le THF en présence d'hydrure de sodium à reflux.²⁶² Ces conditions appliquées dans un premier temps, ont permis d'isoler les composés **89** et **90** avec des rendements faibles d'environ 40%. Des modifications des conditions expérimentales telles que l'abaissement de la température ou le changement de solvant ont permis d'obtenir des réactions plus propres et par conséquent plus facile à purifier. Ainsi, une réaction dans le DMF en présence d'hydrure de sodium à température ambiante a permis d'isoler les composés **89** et **90** avec des rendements améliorés de 66% et 58% respectivement. Ces conditions ont été utilisées par la suite pour la synthèse des dérivés impliquant la phénoxazine ou la phénothiazine en tant qu'hétérocycle.

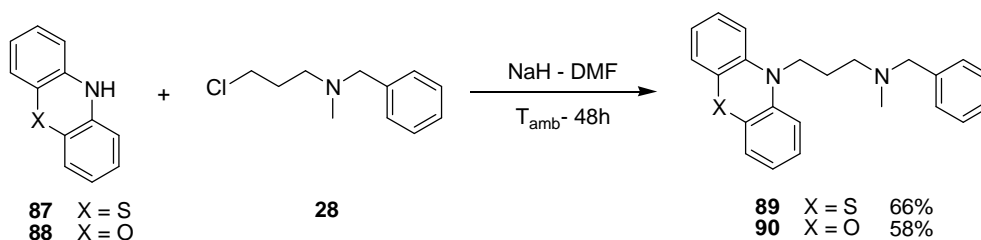


Figure 80 : Synthèse des dérivés phénothiazine et phénoxazine.

²⁶² P. J. Deuss *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 5315-5317

2.3 Synthèse des dérivés de l'isoindoline et de la phényléthylamine

Les chaînes propylisoindoline et *N*-méthyl-*N*-phényléthylpropylamine ont également été introduites sur ces dérivés tricycliques. Pour cela, une stratégie identique à celle employée pour les dérivés bicycliques a été utilisée. Les dérivés chloropropylés **49** et **58**, précédemment synthétisés, ont été engagés dans une substitution nucléophile avec les différents hétérocycles. Seuls les dérivés tricycliques de la benzoxazolinone **66** et **67** n'ont pas été utilisés dans cette série de part leur résultats biologiques préliminaires peu concluants. Une purification par chromatographie sur couche épaisse ou par colonne chromatographique a été nécessaire à l'obtention des composés finaux purs.

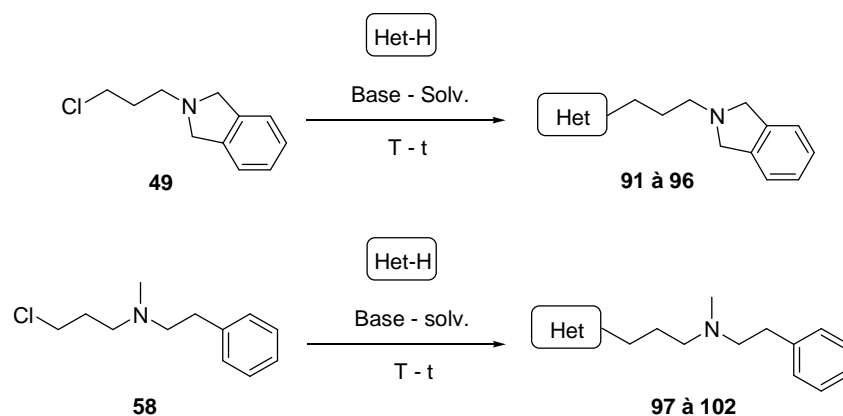
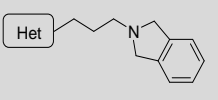
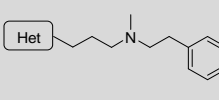
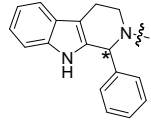
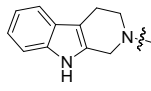
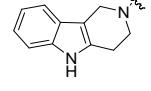
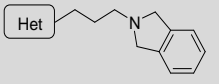
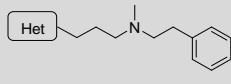
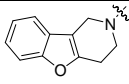
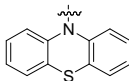
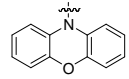


Figure 81 : Synthèse des composés finaux tricycliques avec les chaînes propylisoindoline (**91 à 96**) et *N*-méthyl-*N*-phényléthylpropylamine (**97 à 102**).

Pour l'ensemble des composés synthétisés, les mêmes conditions expérimentales que pour les analogues précédents ont été utilisées. Ces conditions ainsi que les rendements de réactions pour l'ensemble des hétérocycles sont présentés dans Tableau 8.

Tableau 8 : Conditions expérimentales et rendements de synthèses des composés finaux tricycliques avec les chaînes propylisoindoline (**91 à 96**) et *N*-méthyl-*N*-phényléthylpropylamine (**97 à 102**).

Het	Base	Solvant	T (°C)	t (h)				
					Réf.	Rdt	Réf.	Rdt
	K ₂ CO ₃	CH ₃ CN	70	96	91	59%	97	38%
	K ₂ CO ₃	CH ₃ CN	70	96	92	36%	98	51%
	NaOH	H ₂ O:CH ₃ CN	50	48	93	26%	99	15%

Het	Base	Solvant	T (°C)	t (h)				
					Réf.	Rdt	Réf.	Rdt
	K ₂ CO ₃	CH ₃ CN	70	48	94	58%	100	60%
	NaH	DMF	T _{amb}	48	95	56%	101	40%
	NaH	DMF	T _{amb}	24	96	83%	102	51%

L'ensemble des dérivés a été obtenu avec des rendements corrects (40-83%) et des puretés HPLC supérieures à 96%. Encore une fois, les rendements les plus faibles ont été obtenus pour les dérivés de la γ -carboline (26% et 15%). Un suivi HPLC a été effectué et il a été démontré qu'au-delà de 48 heures, le milieu réactionnel commençait à se dégrader pour ces hétérocycles. La réaction a donc été stoppée après 48 heures malgré une conversion incomplète. Même si aucune solution acceptable n'a été trouvée afin d'optimiser cette réaction, les modifications des conditions expérimentales ont tout de même permis de limiter la dégradation et d'obtenir des réactions beaucoup plus propres et par conséquent plus facile à purifier.

D'autre part, les dérivés phénothiazine **95** et **101** ainsi que le dérivé phénoxazine **102** ont été obtenus avec des rendements plus faibles que l'analogue **96**. Malgré les modifications des conditions de purification effectuées, une impureté n'a pu être séparée des composés. Ainsi, afin de garantir la pureté nécessaire aux tests biologiques, seule la fraction la plus pure a été conservée pour ces trois composés au détriment du rendement de réaction.

2.4 Synthèse des dérivés de la pyrrolidine

Enfin, une dernière modification de la chaîne latérale a été envisagée pour cette famille afin d'avoir une étude des relations structure-activité complète. Ainsi, le motif *N*-méthyl-*N*-benzylamine a également été remplacé par un motif pyrrolidine, analogue de l'isoindoline.

De la même façon que pour les séries précédentes, ces dérivés ont été obtenus grâce à une synthèse en deux étapes (Figure 82). Dans un premier temps, le 1-bromo-3-chloropropane et la pyrrolidine sont engagés dans une substitution nucléophile réalisée dans le DMF en présence de carbonate de potassium. Le dérivé chloropropylé **104** isolé est ensuite engagé dans une seconde substitution nucléophile en présence des hétérocycles. Une purification par colonne chromatographique a permis d'isoler les composés finaux purs.

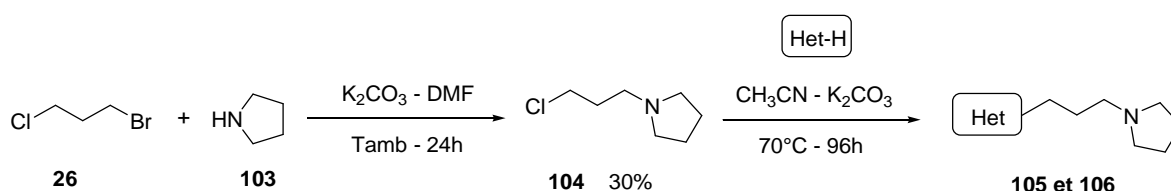


Figure 82 : Synthèse des composés finaux tricycliques avec la chaîne propylpyrrolidine.

Les composés **105** et **106** ont été obtenus avec des rendements respectivement de 12% et 20% (Tableau 9). Ces faibles rendements s'expliquent facilement par une dégradation du dérivé chloropropylé **104** dans les conditions de réaction (K_2CO_3 , CH_3CN). Toutefois, les composés finaux ont été obtenus dans des quantités suffisantes pour les analyses biologiques. Les résultats d'affinité σ_1 obtenus pour ces dérivés étant peu concluants, la série a été arrêtée. Par conséquent, aucune optimisation de réaction n'a été effectuée afin d'améliorer les rendements de synthèse et limiter la dégradation.

Tableau 9 : Rendements de synthèse pour les dérivés tricycliques avec la chaîne propylpyrrolidine.

Réf.	Het	Rdt
105		12%
106		20%

2.5 Etude des propriétés biologiques

De même que pour la famille de composés bicycliques, les propriétés biologiques de l'ensemble des dérivés tricycliques synthétisés ont été évaluées afin d'étudier les relations structure-activité. Ainsi, des études d'affinité σ_1 , de sélectivité envers σ_2 pour les meilleurs composés et de cytotoxicité sur des cellules neuronales ont été réalisées au sein de la Faculté de Pharmacie de Lille ou par la société CEREP. Il est important de préciser que l'ensemble de ces analyses n'a pas été effectué sur les bases libres des composés mais sur les sels de chlorures correspondants.

2.5.1 Affinité et sélectivité

Comme précédemment, l'évaluation des affinités σ_1 et σ_2 a été réalisée par la société CEREP, d'après une procédure décrite par Ganapathy *et al.*²⁵⁵

Cette étude a été menée en duplicate avec moins de 10% de déviation sur des membranes Jurkat (cellules lymphocytaires humaines). Les constantes d'affinité σ_1 (K_i) ont été déterminées à partir des valeurs d'IC₅₀ correspondantes pour chacun des composés finaux **77** à **106**. Des études complémentaires seront réalisées afin de préciser les constantes d'affinité pour les composés présentant des constantes supérieures à 50 nM. Pour les composés possédant une bonne affinité σ_1 , la sélectivité envers σ_2 a également été déterminée ou est en cours de détermination.

D'après les résultats présentés dans le Tableau 10, le remplacement du noyau Tic-hydantoïne par des hétérocycles tricycliques semblent affecter l'affinité envers la protéine σ_1 . En effet, même si un ensemble de modulations entraîne une perte d'affinité comparé au composé de référence **A₅**, certaines ont permis de maintenir des valeurs de K_i (σ_1) intéressantes (Figure 83).

Le pharmacophore de Glennon et Ablordeppey décrit le centre hydrophobe principal comme un groupement aromatique tolérant bien l'encombrement stérique. Toutefois, une influence de cet encombrement et du positionnement de l'hétérocycle par rapport à la chaîne propylaminée a été observée pour les dérivés tricycliques. En effet, tous les dérivés substitués sur le cycle central tels que les composés **77**, **78**, **85**, **89** et **90** présentent une faible affinité envers la protéine σ_1 ($K_i > 50$ nM). En comparaison, une bonne affinité a été maintenue pour les dérivés **79**, **80** et **82** substitués sur le cycle latéral comme le composé de référence **A₅**. Seul le composé γ -carboline **81** montre une constante d'affinité faible ($K_i = 70,2$ nM).

En ce qui concerne la nature de l'hétérocycle, des différences d'affinité ont été observées pour les dérivés benzofuopyridine, β - et γ -carbolines. La position de l'atome d'azote en β ou γ de l'hétérocycle semble influencer l'affinité des ligands. En effet, le dérivé β -carboline **80** ($K_i = 5,8$ nM) s'est montré 12 fois plus affiné que son analogue γ -carboline **81** ($K_i = 70,2$ nM). L'amélioration est même 20 fois plus importante lorsque le dérivé β -carboline est substitué en position 1 par un groupement phényle (**79**, $K_i = 3,4$ nM). D'autre part, la nature de l'hétéroatome (O, N) sur le cycle à 5 central module également l'affinité σ_1 . Le dérivé oxygéné **82** présente une très bonne affinité avec une constante de 2,3 nM contrairement à son analogue azoté **81** ($K_i = 70,2$ nM).

Comme pour la première génération de ligands σ_1 , la modification de la chaîne latérale sur la famille de dérivés tricycliques n'a provoqué aucune modification significative de l'affinité dans la majeure partie des cas. Ainsi, les dérivés β -carbolines avec les chaînes *N*-benzyl-*N*-méthylpropylamine (**79** et **80**), propylisoindoline (**91** et **92**), et *N*-méthyl-*N*-phényléthylpropylamine (**97** et **98**) ont tous montré des constantes d'affinité inférieures à 11 nM. Toutefois, une diminution d'affinité a été observée lorsque la *N*-méthyl-*N*-benzylamine a été remplacée par la pyrrolidine. En comparaison aux dérivés **79** et **80** présentant des bonnes affinités, les dérivés pyrrolidines **105** et **106** possèdent des constantes supérieures à 50 nM. Ces résultats montrent l'importance du second centre hydrophobe pour l'affinité σ_1 , ce qui est en accord avec le modèle pharmacophorique de Glennon et Ablordeppey.

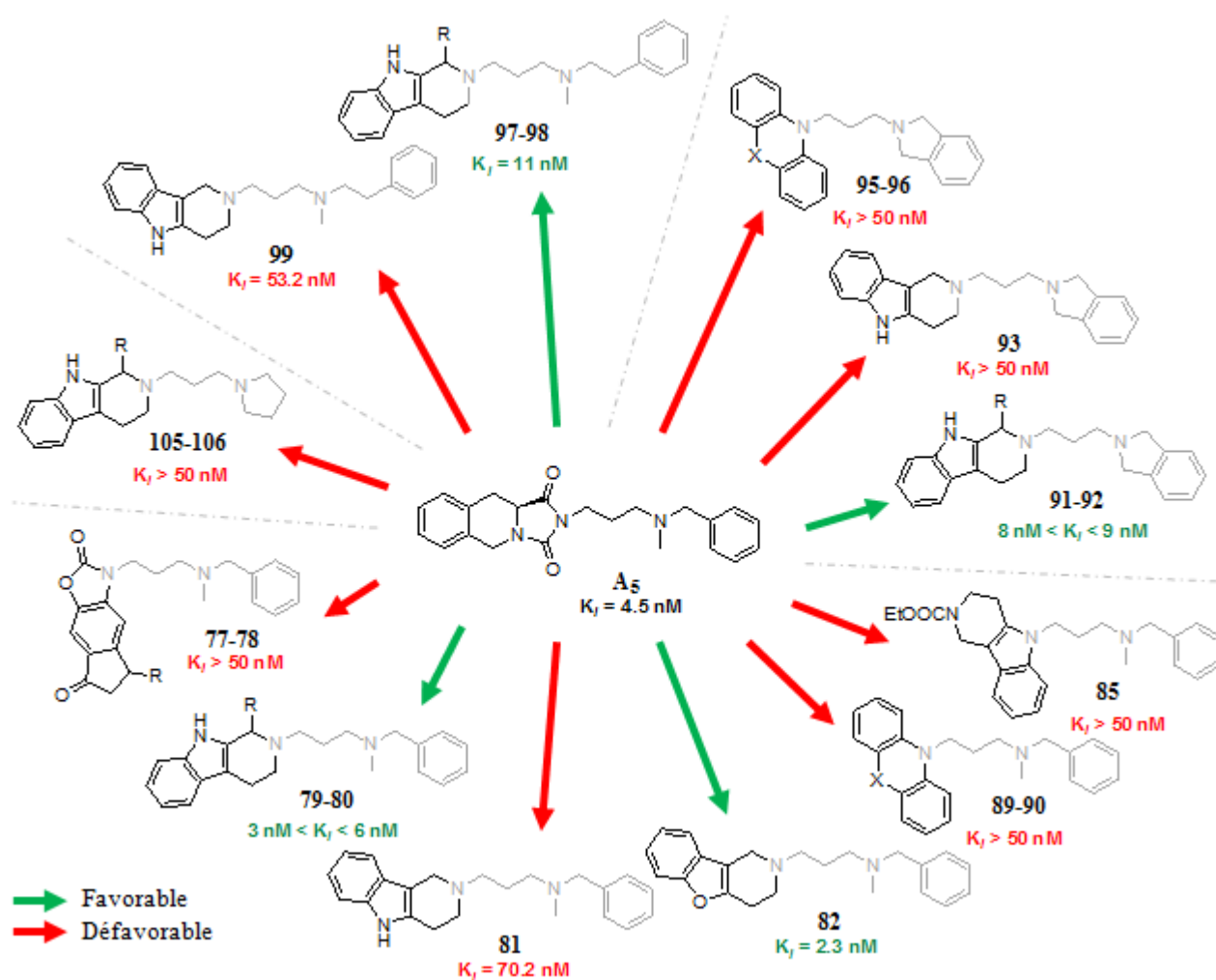


Figure 83 : Relations structure-activité de la famille des dérivés tricycliques.

Enfin, en plus de l'étude de l'affinité σ_1 , la sélectivité envers la protéine σ_2 des meilleurs ligands a également été examinée ou est en cours détermination. D'après les résultats préliminaires obtenus, cette famille de composés présente des affinités σ_2 plus faibles ($20,8 \text{ nM} < K_i < 100 \text{ nM}$), ce qui indique une certaine sélectivité des dérivés tricycliques (Tableau 10). Il semblerait que la chaîne propylisoindoline soit plus favorable à la sélectivité que la chaîne *N*-benzyl-*N*-méthylpropylamine. En effet, alors que les dérivés **79** et **80** présentent une faible sélectivité avec des ratios σ_2/σ_1 respectifs de 6 et 5, le dérivé isoindolique **91** possède une constante d'affinité σ_2 de 100 nM, ce qui lui confère un ratio σ_2/σ_1 de 11. Ces résultats préliminaires sont à confirmer avec les sélectivités de l'ensemble des dérivés tricycliques.

2.5.2 Cytotoxicité

Comme précédemment, l'évaluation de la cytotoxicité des composés a été réalisée par le Dr Delphine LE BROCC, au sein de la plateforme de binding de la Faculté de Pharmacie de Lille.

La mesure de la prolifération cellulaire s'effectue *via* l'activité enzymatique de la succinyl déshydrogénase mitochondriale (Test au MTT). Cette étude a été réalisée en triplicate avec moins de

10% de déviation sur une lignée cellulaire de neuroblastome humain SY5Y. Les constantes d'inhibition de la prolifération cellulaire ont été déterminées pour tous les composés finaux **77** à **106**.



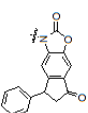
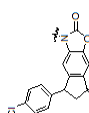
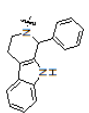
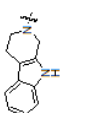
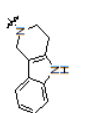
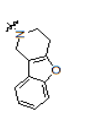
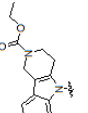
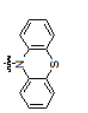
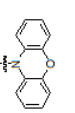
D'après les résultats présentés dans le Tableau 10, l'ensemble des composés tricycliques synthétisés présentent une cytotoxicité modérée voire faible. Quatre composés (**82**, **93**, **94** et **95**) montrent des IC_{50} supérieures à 50 μ M. Les autres dérivés possèdent des effets cytotoxiques plus modérés mais toujours raisonnables, avec des constantes comprises entre 10 μ M et 50 μ M. Seul le composé **78** montre une cytotoxicité un peu plus importante ($IC_{50} = 5,0 \mu$ M).

De plus, on remarque que le passage du dérivé azoté **81** ($IC_{50} = 16,9 \mu$ M) au dérivé oxygéné **82** ($IC_{50} = 68,9 \mu$ M) est favorable pour la toxicité puisqu'il permet de diminuer cette dernière d'un facteur 4. En ce qui concerne la chaîne latérale, la chaîne propylpyrrolidine entraîne une diminution de la cytotoxicité des dérivés carbolines **105** et **106** en comparaison à la chaîne *N*-benzyl-*N*-méthylpropylamine. Pour les chaînes propylisoindoline et *N*-méthyl-*N*-phényléthylpropylamine aucune amélioration n'a été observée.

Enfin, parmi ces 23 nouveaux ligands σ_1 , le composé **82** ($IC_{50} = 68,9 \mu$ M) montre des résultats très intéressants avec un index de sélectivité ($IS = IC_{50}(\text{SY5Y})/K_i(\sigma_1)$) de 30 339. En comparaison, les meilleurs composés bicycliques **31** et **35** possèdent des IS de respectivement 63 291 et 23 250.

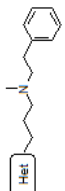

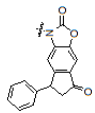
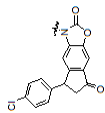
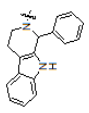
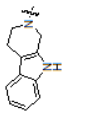
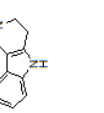
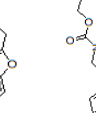
Pour conclure, plusieurs ligands avec une affinité intéressante ont été identifiés dans cette famille de composés. La sélectivité envers σ_2 de certaines molécules reste encore à déterminer. Toutefois, il semblerait qu'un encombrement trop important du centre hydrophobe principal soit défavorable à l'affinité σ_1 , à la sélectivité et à la cytotoxicité. De plus, il a également été démontré que la présence du second centre hydrophobe était importante pour l'affinité, ce qui est en accord avec le modèle de Glennon et Ablordepey. Enfin, en considérant l'originalité structurale, les meilleurs résultats ont été obtenus pour les composés β -carbolines **79** et **80**, ainsi que le composé benzofuopyrrolidine **82**. Même si des analyses complémentaires sont actuellement en cours, ces composés ont montré de bonnes affinités ainsi qu'une sélectivité et cytotoxicité acceptable.

Tableau 10 : Constante d'affinité σ_1 et IC_{50} (SY5Y) pour les dérivés tricycliques.

Het										
	Réf.	σ_1	K_i (nM)	IC_{50} (μ M) SY5Y	IS	Réf.	σ_1	K_i (nM)	IC_{50} (μ M) SY5Y	IS
	77	43,7	-	4,3%***	-					
	78	-	-	5,0	-					
	79	3,4	20,8	9,3	2730	91	9,1	100	18,3	2014
	80	5,8	27,2	19,7	3378	92	7,9	82%*	24,9	3130
	81	70,2	22%*	16,9	240	93	> 50	-	50,0	-
	82	2,3	92%*	68,9	30339	94	***	87%*	78,9	-
	85	> 50	-	19,1	-					
	89	53,2	-	17,1	321	95	> 50	-	83,3	-
	90	> 50	-	71,9	-	96	> 50	-	0%***	-

* % inh σ_2 à 100 nM ; ** % inh de la prolifération cellulaire à 10 μ M ; *** Etudes en cours

Tableau 11 (suite) : Constantes d'affinité σ_1 et IC_{50} (SY5Y) pour les dérivés tricycliques.

Het								
	Réf.	K_i (nM) σ_1	IC_{50} (μ M) SY5Y	IS	Réf.	K_i (nM) σ_1	IC_{50} (μ M) SY5Y	IS
	97	10,9	11,8	1078	105	52,6	47,8	908
	98	11,5	11,6	1211	106	> 50	32,9	-
	99	53,2	25%**	> 2000				
	100	93%*	25,4	-				
	101	***	***	-				
	102	***	4,8%**	-				

* % inh σ_1 à 100 nM ; ** % inh de la prolifération cellulaire à 10 μ M ; *** Etudes en cours

3. Famille des dérivés monocycliques

De nombreux ligands σ_1 présentent des structures peu contraintes et de simples cycles aromatiques en tant que centres hydrophobes (Figure 42, Chapitre 2). D'autre part, le premier pharmacophore σ_1 présenté par Gilligan, décrivait la présence d'un accepteur de liaison hydrogène entre l'atome d'azote protonable et le centre hydrophobe principal. Cet accepteur de liaison hydrogène est d'ailleurs présent sur un grand nombre de ligands σ_1 connus tel que l'halopéridol. Tenant compte de ces éléments, une nouvelle famille de molécules monocycliques a été conçue. Une simplification extrême du motif Tic-hydantoïne a ainsi été envisagée et le noyau benzamide sélectionné (Figure 84). Ce noyau, présent sur le 4-IPB, est connu comme favorable à l'affinité σ_1 . Le centre hydrophobe principal a été substitué par différents groupements que ce soient des halogènes ou un groupement méthoxy. Des pharmacomodulations au niveau de la chaîne latérale et de la fonction amide ont également été envisagées. Ainsi une rigidification a été assurée par l'introduction de groupement pipérazine ou homopipérazine.

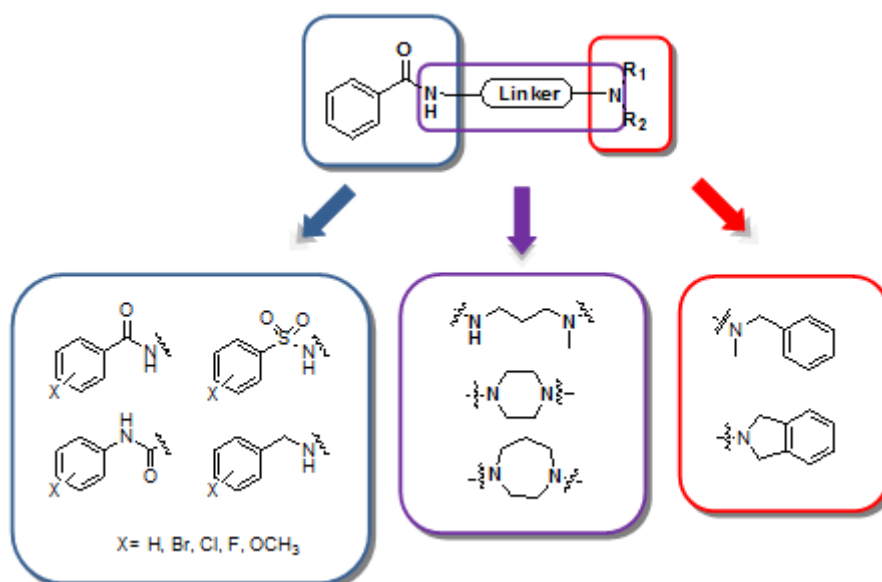


Figure 84 : Famille des dérivés monocycliques.

3.1 Stratégies de synthèse

Deux stratégies de synthèse ont été envisagées afin d'obtenir les nouveaux dérivés suivant la position de la fonction amide sur la chaîne latérale (Figure 85).

La stratégie A est une synthèse linéaire qui permet d'introduire le groupement fonctionnel lors de la dernière étape. Ainsi la fonction amide est formée grâce à une réaction de Schotten-Baumann entre la *N*-benzyl-*N*-méthylpropanediamine et des dérivés carbonyles substitués. L'intermédiaire diaminé provient d'une substitution nucléophile entre la 3-bromopropanamine et la *N*-benzyl-*N*-méthylamine.

La stratégie B a été envisagée afin de faire varier la position de la fonction amide sur la chaîne latérale et d'obtenir les composés rétro-amides. Une synthèse en deux étapes permet d'obtenir les

composés finaux. Une substitution nucléophile entre un dérivé amide chloré et la *N*-benzyl-*N*-méthylamine permet d'obtenir les composés désirés. Le dérivé amide chloré est précédemment formé par une réaction de Schotten-Baumann entre un dérivé aminé aromatique et un chlorure d'acide.

Les composés obtenus par chacune de ces stratégies ainsi que les optimisations des conditions expérimentales sont présentés dans les paragraphes suivants.

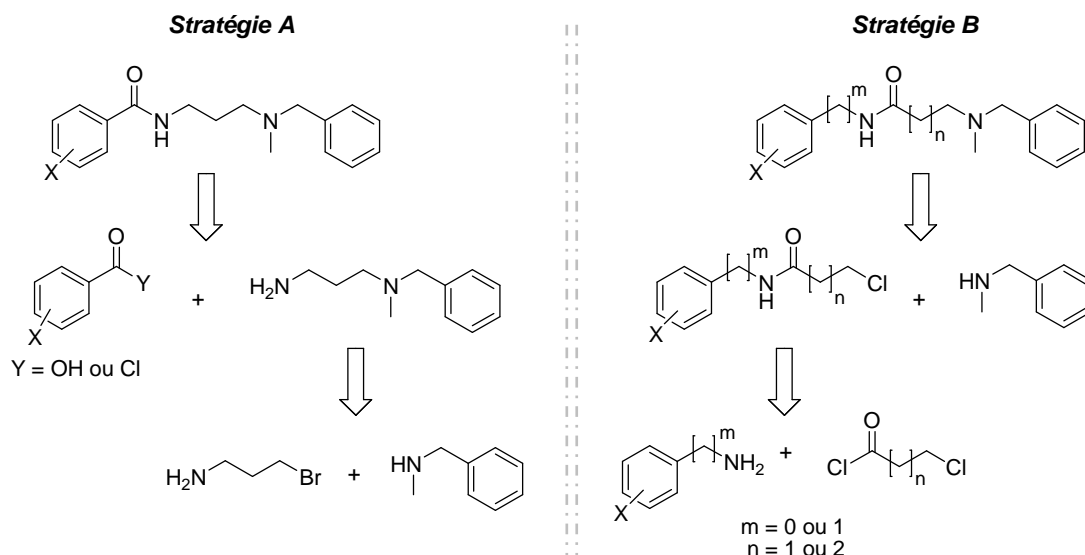


Figure 85 : Schéma rétro-synthétique des stratégies A et B.

3.2 Etude de la stratégie A

La synthèse du dérivé *N*-benzyl-*N*-méthylpropane-1,3-diamine **113** avait précédemment été décrite par le laboratoire (Figure 86, bleu).²⁶³ Toutefois, cette synthèse présentait une étape limitante en termes de temps de réaction et de rendement qui correspondait à la substitution du dérivé mésylate **109**. Une modification de cette voie de synthèse a donc été réalisée afin de s'affranchir de cette étape. Ainsi, la *N*-benzyl-*N*-méthylpropane-1,3-diamine **113** a été obtenue grâce à une synthèse optimisée en trois étapes (Figure 86, noir). La 3-bromopropylamine hydrobromide a tout d'abord été protégée à l'aide d'un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc). Le Boc est un des groupements protecteurs les plus utilisés en chimie organique qui s'introduit et se clive sans grande difficulté. Le dérivé **111** résultant de cette protection a ensuite été engagé dans une substitution nucléophile avec la *N*-méthyl-*N*-benzylamine. Une purification par colonne chromatographique a permis d'isoler le composé **112** avec un rendement de 74%. Finalement, une réaction de déprotection réalisée dans le dioxane saturé en HCl gaz a permis d'obtenir le composé désiré **113** sous forme de chlorhydrate et suffisamment pur pour être utilisé sans purification.

²⁶³ J. Charton *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 7081-7085

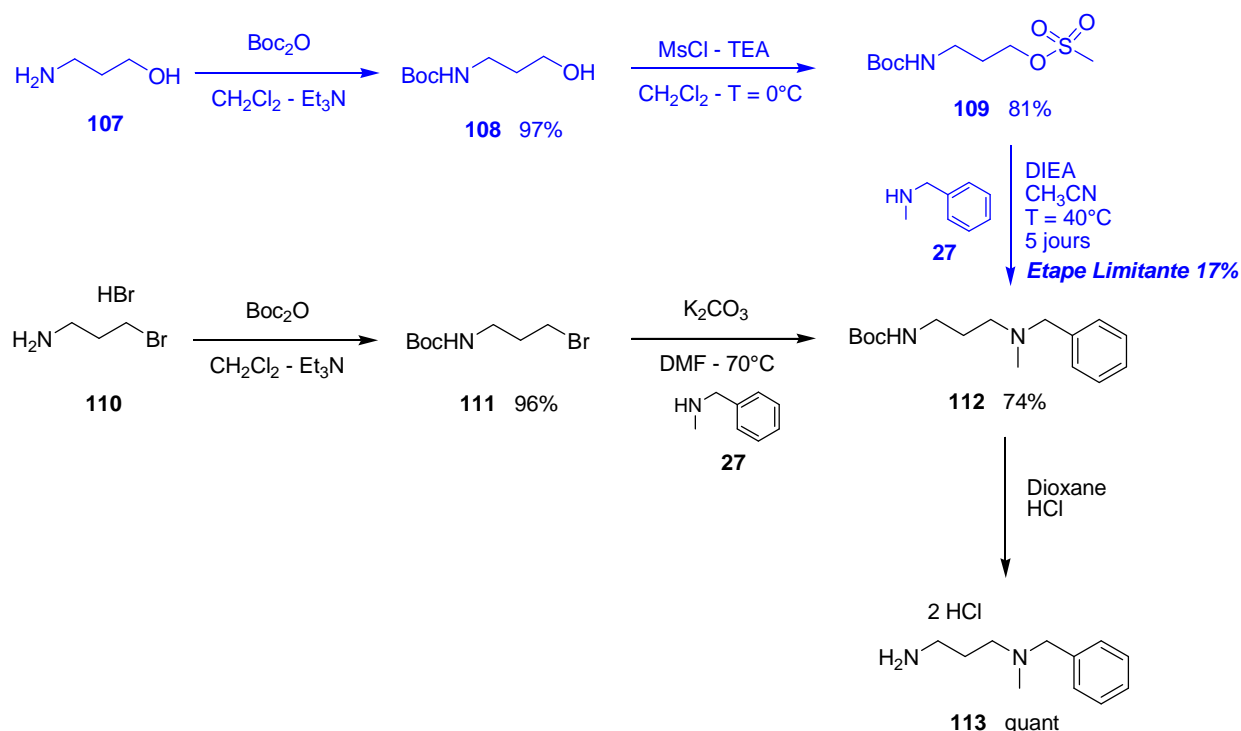


Figure 86 : Synthèses de la *N*-benzyl-*N*-méthylpropane-1,3-diamine dihydrochloride **113**. En bleu : ancienne voie de synthèse. En noir : voie de synthèse optimisée.

Le premier composé de la série a été obtenu grâce à une réaction de Schotten-Baumann entre le 4-chlorobenzoyl chloride et le dérivé diaminé **113** (Figure 87). Afin d'avoir une bonne réactivité, la base du composé diaminé a été libérée en présence de triéthylamine avant l'ajout du chlorure d'acide. Réalisée en milieu anhydre, cette réaction permettait d'obtenir le composé chlorobenzamide **115** avec un rendement de 65%.

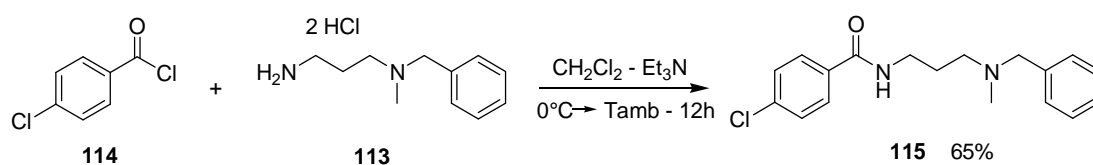


Figure 87 : Synthèse du *N*-[3-(*N*-benzyl-*N*-méthylamino)propyl]-4-chlorobenzamide **115**.

Afin d'étudier l'influence du groupement en position 4, une série d'analogues du composé **115** a été synthétisée. Une diversité d'acides carboxyliques étant accessible au laboratoire, une amidification a donc été envisagée afin d'obtenir les composés **122** à **127**. Cette stratégie permettait d'obtenir les composés finaux en une étape de synthèse sans passer par les chlorures d'acides correspondants. D'autre part, le composé **113** étant un sel de chlorhydrate très hygroscopique, une amidification permettait de s'affranchir du milieu anhydre qui évite l'hydrolyse du chlorure d'acide dans la réaction de Schotten-Baumann. Les acides carboxyliques ont donc été mis réaction avec la diamine **113** en présence d'agents de couplages (HOBt et HBTu) et de la DIEA dans du dichlorométhane (Figure 88).

Après 12 heures de réaction, une purification par colonne chromatographique a permis d'isoler les différents dérivés avec de bons rendements et des puretés HPLC supérieures à 98%. Seuls les dérivés dichlorés **124** et **125** ont été obtenus avec des rendements plus faibles.

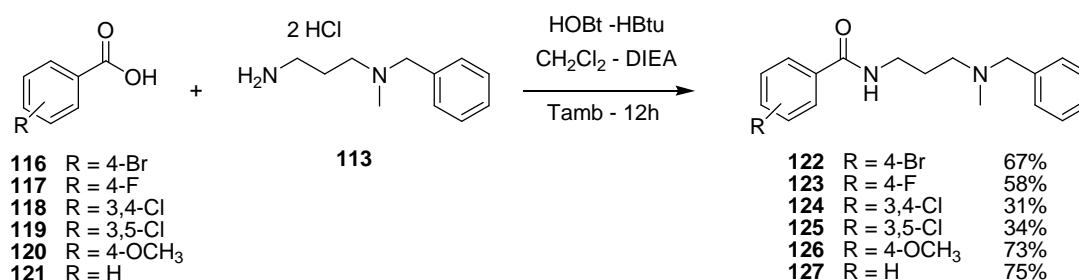


Figure 88 : Synthèse des dérivés du benzamide **122** à **127** par amidification.

Des études biologiques préliminaires menées sur ces dérivés ont permis de mettre en évidence le composé chlorobenzamide **115** comme bon ligand des récepteurs σ_1 . Par conséquent, l'ensemble des modulations envisagées par la suite sur cette famille a été réalisé à partir de ce dérivé chloré.

L'influence de la rigidification de la chaîne latérale a été étudiée en insérant des motifs cycliques tels que la pipérazine, l'homopipérazine et la pipéridine. Ces groupements, présents sur de nombreux ligands σ_1 dont le BMY-14802¹⁷⁶, le SA-4503²¹⁴ et le 4-IPB¹⁹³ (Chapitre 1), sont décrits comme éléments pharmacophoriques σ_1 dans le modèle de Glennon et Ablordeppey. Les composés finaux **131** à **133** ont été obtenus à partir du 4-chlorobenzoyl chloride et des dérivés aminés cycliques correspondants *via* une réaction de Schotten-Baumann (Figure 89). Les produits ont été isolés avec de très bons rendements et des puretés HPLC supérieures à 98%.

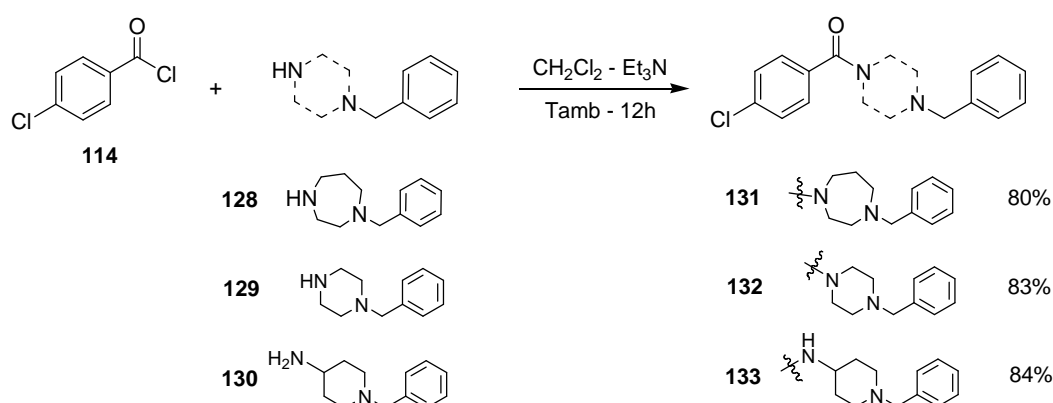


Figure 89 : Synthèse des dérivés chlorobenzamide avec une chaîne latérale cyclique.

3.3 Etude de la stratégie B

Afin d'étudier l'influence de la fonction amide sur l'affinité des ligands, deux composés rétro-amides ont été conçus et obtenus grâce à une synthèse en deux étapes.

Dans un premier temps, la fonction amide a été formée grâce à une réaction de Schotten-Baumann (Figure 90). Le dérivé chloré **138** a ainsi été obtenu à partir de la 4-chloroaniline **134** et du 4-

chlorobutryryl chloride **136** avec un très bon rendement de 87%. Il a ensuite été engagé dans une substitution nucléophile avec la *N*-méthyl-*N*-benzylamine. Cette étape a nécessité une optimisation afin d'obtenir le composé désiré **141**. En effet, dans des conditions normales de substitution nucléophile (K_2CO_3 , DMF, 70°C), une réaction intramoléculaire a été observée et le dérivé cyclisé **140** a été isolé. Le solvant et la base ont donc été modifiés et notamment remplacés par l'acétonitrile et la triéthylamine. La température de réaction a également été abaissée à 50°C ou à 25°C. Ces modifications n'ont apporté aucune amélioration puisque le même composé cyclisé a été obtenu. Finalement, l'utilisation de la *N*-méthyl-*N*-benzylamine comme base, solvant et réactif a permis de limiter la réaction intramoléculaire et ainsi obtenir le composé désiré **141** avec bon rendement (70%) et une pureté HPLC supérieure à 98%

La fonction amide a ensuite été déplacée d'un carbone sur la chaîne latérale afin d'obtenir le composé **142**. La même stratégie de synthèse en deux étapes a été adoptée (Figure 90). Le dérivé chloré **139** a donc été obtenu à partir de la 4-chlorobenzylamine et du 3-chloropropionyl chloride avec un rendement de 60%. Il est ensuite engagé dans une réaction de substitution nucléophile en présence de *N*-méthyl-*N*-benzylamine pour donner le composé désiré **142** avec un bon rendement (67%) et une pureté HPLC supérieure à 98%.

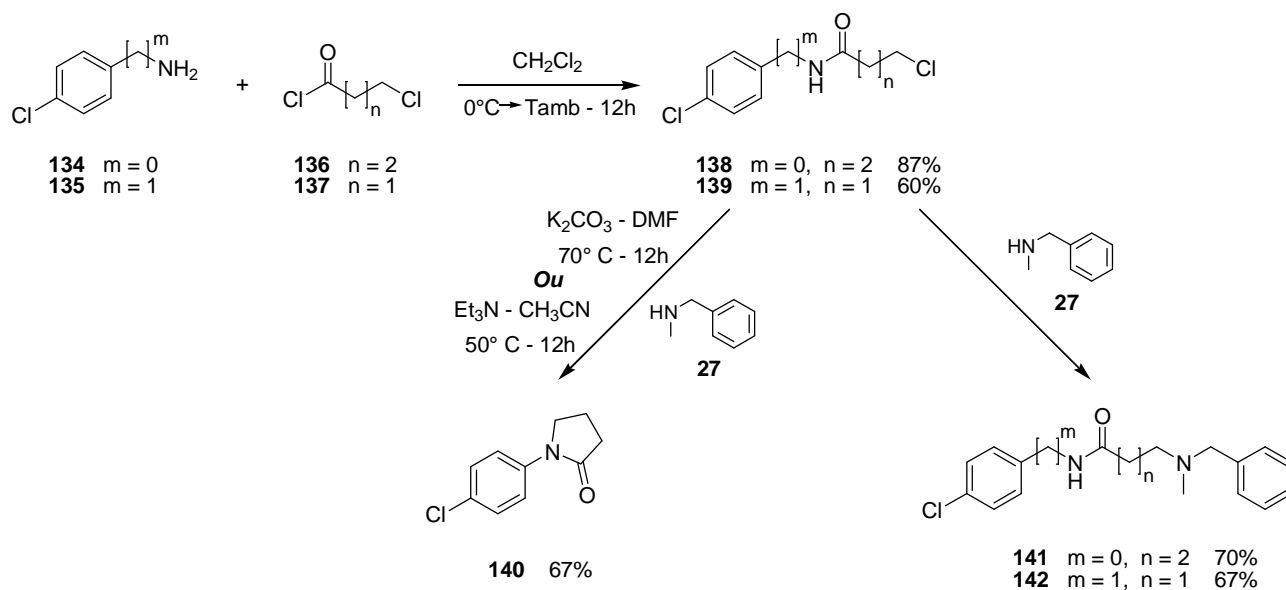


Figure 90 : Synthèse des dérivés rétro-amides **141** et **142**.

3.4 Autres modulations

Une série de modulation autour de la fonction amide et de la chaîne latérale a également été envisagée afin de compléter les relations structure-activité de cette famille. Ainsi, la fonction amide a été remplacée par une fonction sulfonamide ou bien substituée par un groupement méthyle. D'autre part, le groupement *N*-benzyl-*N*-méthylamine terminal a été remplacé par l'isoindoline. Les synthèses de ces différents dérivés sont présentées dans ce paragraphe.

Le dérivé sulfonamide **144** a été synthétisé selon la même stratégie que son analogue **115** (Figure 91). La base correspondante du composé diaminé **113** a été libérée en présence de triéthylamine avant l'ajout du 4-chlorobenzosulfonamide chloride. Après 12 heures de réaction, le dérivé **144** a été isolé par chromatographie sur couche épaisse avec un rendement de 60%.

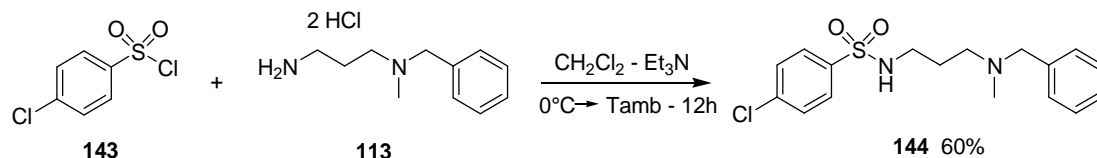


Figure 91 : Synthèse du dérivé sulfonamide **144**.

La méthylation de la fonction amide a, dans un premier temps, été réalisée directement sur le composé **115** (Figure 92). Un excès d'hydrure de sodium et d'iodométhane a été utilisé afin de réaliser cette substitution. Toutefois, dans ces conditions une double substitution conduisant à l'ammonium quaternaire **145** a été observée. Une modification des conditions expérimentales, notamment de la température de réaction et du nombre d'équivalent des réactifs a été effectuée sans succès.

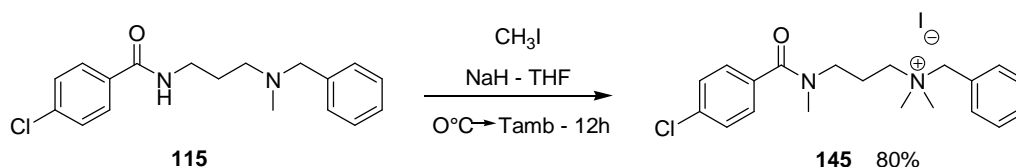


Figure 92 : Synthèse du composé di-méthylé : formation de l'ammonium quaternaire **145**.

Finalement, afin de s'affranchir de la formation de l'ammonium quaternaire, il a été envisagé d'introduire le groupement méthyle lors de la synthèse de la chaîne latérale diaminée. La *N*-benzyl-3-chloro-*N*-méthylpropylamine **28**, précédemment synthétisée (Partie 1.2, Figure 62) et la *N*-méthylamine ont donc été mises en réaction dans l'acétonitrile pour donner le composé diaminé **146**. Cet intermédiaire **146**, isolé avec un bon rendement (88%), est ensuite engagé dans une réaction de Schotten-Baumann avec le chlorure d'acide **114**. Cette dernière étape est actuellement en cours.

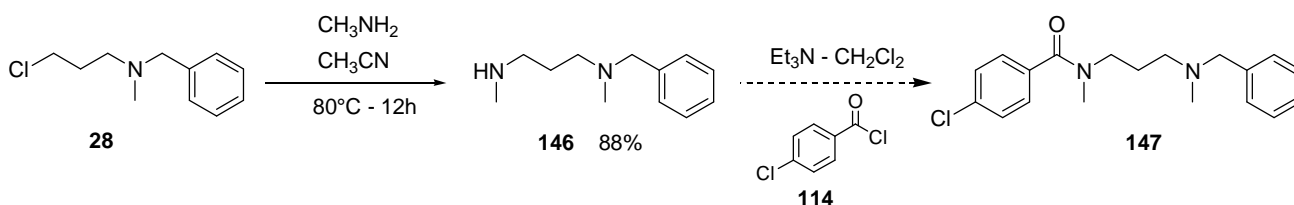


Figure 93 : Seconde stratégie de synthèse du composé di-méthylé **147**.

La dernière modulation envisagée sur cette famille concernait le motif *N*-benzyl-*N*-méthylamine terminal et notamment son remplacement. La stratégie de synthèse adoptée permettait d'obtenir les composés finaux en introduisant la modulation lors de la dernière étape. Dans un premier temps, cette

stratégie a été appliquée à la synthèse du composé chlorobenzamide avec la chaîne propylisoindoline **150** (Figure 94). Une réaction de Schotten-Baumann a permis d'obtenir l'intermédiaire **148** avec un bon rendement. Cet intermédiaire a ensuite été engagé dans une substitution nucléophile avec l'isoindoline. Une purification par colonne chromatographique a permis d'isoler un composé ne correspondant pas au dérivé **150** attendu. Différentes analyses ont été réalisées afin d'élucider la structure de ce dérivé. La masse obtenue par analyse LCMS indiquait un composé de structure $C_{10}H_{10}ClNO$ assez proche de la matière première **148**. Les analyses RMN du dérivé isolé ont donc été comparées aux analyses RMN de la matière première. Les spectres protons se sont avérés assez proches avec des signaux identiques dans la zone des protons aromatiques. Au niveau des protons aliphatiques, il a été observé l'absence du proton de l'amide ainsi que la présence de deux signaux déblindés par la présence d'hétéroatomes pour le dérivé isolé contre seulement un pour la matière première. De plus, l'analyse RMN ^{13}C a montré la disparition du signal du carbonyle à 167 ppm au profit d'un signal aux alentours de 155 ppm correspondant à un carbone quaternaire. L'ensemble de ces résultats a permis d'identifier le dérivé **149** dont les analyses sont en accord avec la littérature.²⁶⁴ La formation de ce dérivé oxazine peut s'expliquer par une réaction intramoléculaire correspondant à l'attaque nucléophile de l'oxygène sur le carbone terminal conduisant à la formation d'un cycle à 6 favorable.

Comme précédemment, l'utilisation de l'isoindoline comme solvant, base et réactif a permis d'éviter cette réaction intramoléculaire. Toutefois, il est très difficile d'éliminer ce réactif introduit en fort excès à cause de sa faible stabilité. En effet, une forte dégradation de l'isoindoline a été observée au cours des différents essais de purification. La formation du composé **150** a été confirmée par analyse LC-MS, mais aucune condition de purification n'a permis jusqu'à maintenant d'isoler le composé pur.

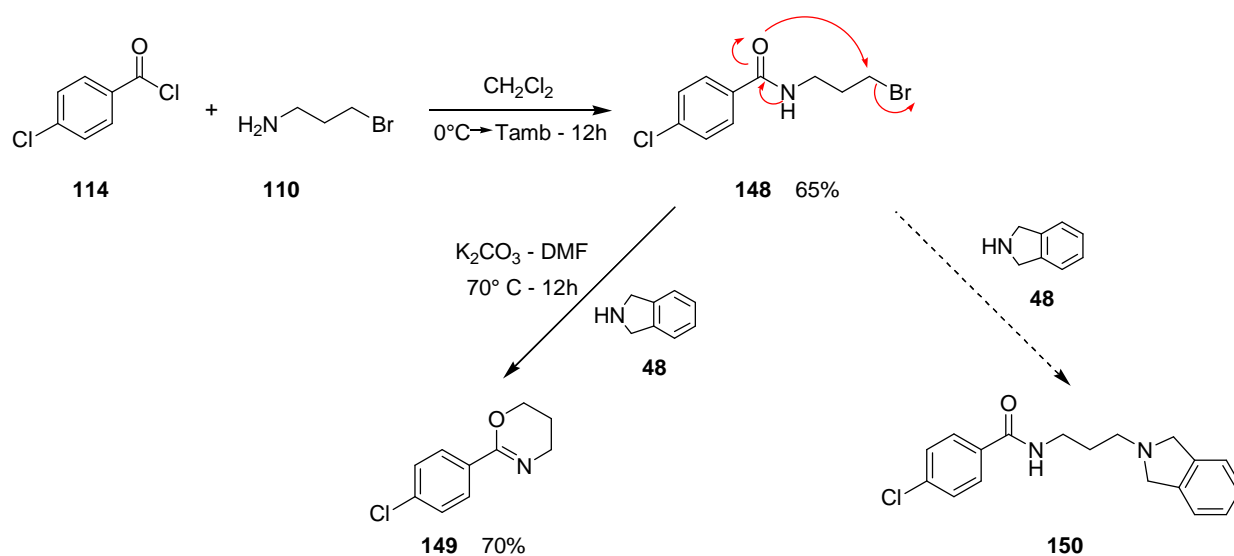


Figure 94 : Synthèse du dérivé chlorobenzamide avec la chaîne propylisoindoline.

²⁶⁴ A. R. Katritzky *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 811-814

3.5 Etude des propriétés biologiques

De même que pour les familles précédentes, les propriétés biologiques de l'ensemble des dérivés monocycliques synthétisés ont été évaluées afin d'étudier les relations structure-activité. Ainsi, des études d'affinité σ_1 , de sélectivité envers σ_2 pour les meilleurs composés et de cytotoxicité sur des cellules neuronales ont été réalisées au sein de la Faculté de Pharmacie de Lille ou par la société CEREP. Il est important de préciser que l'ensemble de ces analyses n'a pas été effectué sur les bases libres des composés mais sur les sels de chlorhydrates correspondants.

3.4.1 Affinité et sélectivité

Comme précédemment, l'évaluation des affinités σ_1 a été réalisée par la société CEREP, d'après une procédure décrite par Ganapathy *et al.*²⁵⁵ Cette étude a été menée en duplicate avec moins de 10% de déviation sur des membranes Jurkat (cellules lymphocytaires humaines).

Les constantes d'affinité σ_1 (K_i) ont été déterminées à partir des valeurs d'IC₅₀ correspondantes. Pour certains composés, les évaluations biologiques sont encore en cours, c'est pourquoi les résultats sont présentés sous forme de pourcentages d'inhibition à 100 nM (Tableau 11). Des études complémentaires seront réalisées par la suite pour déterminer la sélectivité des meilleurs composés.

D'après les premiers résultats rassemblés dans le Tableau 11, la simplification du noyau Tic-hydantoïne par un simple cycle permet de conserver une bonne affinité envers la protéine σ_1 pour un certain nombre de dérivés.

En ce qui concerne la substitution du noyau benzamide en position 4, il semblerait que la présence d'un halogène soit favorable à l'affinité. En effet, les dérivés chloré **115** ($K_i = 4.6$ nM) et bromé **122** ($K_i = 3,8$ nM) présentent des constantes 12 fois plus importantes que leur analogue non substitué **127** ($K_i = 50$ nM). Toutefois, la nature de l'halogène semble également être importante. Une chute de l'affinité est observée si l'halogène est un atome de fluor (**123**, %inh (100nM) = 56 %). En comparaison, les analogues chloré (**115**, $K_i = 4,6$ nM), bromé (**122**, $K_i = 3,8$ nM) présentent une affinité 25 fois plus importante. La présence d'un atome d'iode semble également favorable puisque le 4-IPB (Figure 35, p70) présente une très bonne affinité σ_1 ($K_i = 3,3$ nM). La présence de deux halogènes a également été étudiée et les évaluations biologiques sur les composés **124** et **125** sont en cours. Les résultats préliminaires semblent indiquer le maintien d'une bonne affinité. D'autre part, la présence d'un groupement méthoxy en position 4 (**126**, %inh (100 nM) = 34%) ne serait pas favorable et entraînerait une diminution de l'affinité comparé au composé non substitué **127** et halogénés **115** et **122**.

Le modèle pharmacophorique de Glennon et Ablordeppey décrit l'atome d'azote protonable comme un élément important pour l'affinité σ_1 . Cet élément peut être intégré dans des structures cycliques telles que des pipérazines et des pipéridines. Toutefois, une influence de tels groupements

cycliques a été observée pour les dérivés monocycliques. En effet, tandis que des groupements pipéridine (**133**, %inh (100 nM) = 86%) et homopipérazine (**131**, %inh (100 nM) = 76%) permettrait de maintenir une bonne affinité, la cyclisation en pipérazine de la chaîne latérale entraînerait une perte importante d'affinité (**132**, %inh (100 nM) = 0%). Des études complémentaires afin de déterminer les constantes d'affinités de ces composés permettront de confirmer ou non ces résultats.

De plus, d'après les résultats préliminaires obtenus, une modification de la fonction amide aurait peu d'influence sur l'affinité σ_1 . En effet, les dérivés sulfonamide **144** (%inh (100 nM) = 73%) et rétro-amide **141** et **142** (%inh (100 nM) = 76% et %inh (100 nM) = 79%) possèdent de bons pourcentages d'inhibition à 100 nM. Des études complémentaires afin de déterminer les constantes d'affinités de ces composés permettront également de confirmer ou non ces premiers résultats.

Enfin, la sélectivité envers la protéine σ_2 a été déterminée seulement pour le composé **115**. Celui-ci a montré une affinité plus faible pour le récepteur σ_2 ($K_i = 100$ nM) que pour le récepteur σ_1 ($K_i = 4.3$ nM), ce qui indique une certaine sélectivité (ratio $\sigma_2/\sigma_1 = 21$). Des études de binding sont en cours sur les autres composés de cette famille afin de déterminer leur sélectivité.

3.4.2 Cytotoxicité

Comme précédemment, l'évaluation de la cytotoxicité des composés a été réalisée par le Dr Delphine LE BROCC, au sein de la plateforme de binding de la Faculté de Pharmacie de Lille.

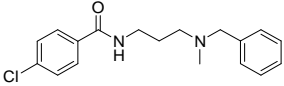
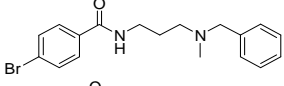
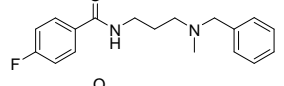
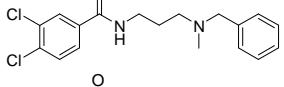
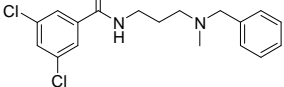
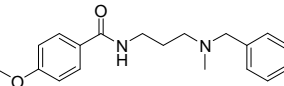
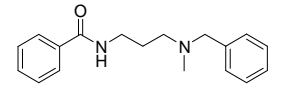
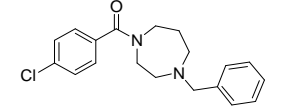
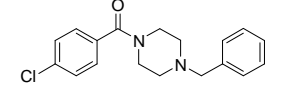
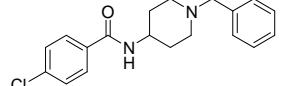
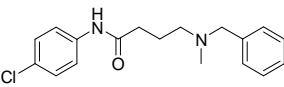
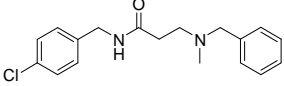
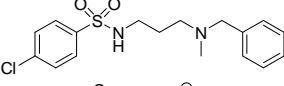
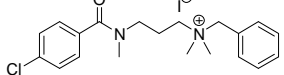
La mesure de la prolifération cellulaire s'effectue *via* l'activité enzymatique de la succinyl déshydrogénase mitochondriale (Test au MTT). Cette étude a été réalisée en triplicate avec moins de 10% de déviation sur une lignée cellulaire de neuroblastome humain SY5Y. Les constantes d'inhibition de la prolifération cellulaire ont été déterminées pour tous les composés finaux **115** à **145**.

D'après les résultats présentés dans le Tableau 11, l'ensemble des dérivés monocycliques synthétisés présente une faible cytotoxicité. Trois composés (**124**, **125** et **145**) présentent des effets cytotoxiques modérés mais toujours raisonnables avec des IC_{50} de respectivement 56 μ M, 60 μ M et 10 μ M. Les autres dérivés montrent tous des IC_{50} supérieures à 100 μ M.

De plus, la présence d'un halogène en position 4 sur le noyau benzamide ne semble pas grandement affecter la cytotoxicité. En effet, les dérivés **115**, **122** et **123** présentent des IC_{50} supérieures à 100 μ M. Cependant, on remarque que l'addition d'un chlore en position 3 entraîne une petite augmentation des effets cytotoxiques (**124** : $IC_{50} = 56$ μ M, et **125** : $IC_{50} = 60$ μ M). En ce qui concerne la chaîne latérale, une faible cytotoxicité a été conservée après cyclisation (**131**, **132** et **133** : $IC_{50} > 100$ μ M). Enfin, parmi ces 14 nouveaux ligands σ_1 , les composés chlorobenzamide **115** ($IC_{50} > 100$ μ M) et bromobenzamide **122** ($IC_{50} = 60,2$ μ M) montrent des résultats très intéressants avec des index de sélectivité supérieurs à 15 000.

Pour conclure, plusieurs ligands σ_1 avec de bonnes affinités ont été identifiés dans cette famille. La sélectivité vis-à-vis du récepteurs σ_2 reste encore à déterminer pour l'ensemble des composés. La présence d'un atome de chlore ou de brome en position 4 semble plus favorable à l'affinité que la présence d'un atome de fluor ou un groupement méthoxy. Les résultats préliminaires semblent également indiquer la conservation d'une bonne affinité après modulation de la chaîne latérale. Même si des analyses complémentaires sont actuellement en cours, cette famille de composés présente des résultats intéressants avec de bonnes affinités et une faible cytotoxicité.

Tableau 11 : Constante d'affinité σ_1 et IC_{50} (SY5Y) pour les dérivés monocycliques.

Réf.	Compounds	K_i (nM) σ_1	IC_{50} (μ M) SY5Y	IS
115		4,6	28% **	> 20000
122		3,8	60,2	15783
123		56% *	30% **	-
124		89% *	56,6	-
125		-	60,0	-
126		34% *	100,0	-
127		50	30% **	> 2000
131		76% *	100,0	-
132		0% *	23% **	-
133		86% *	10% **	-
141		76% *	***	-
142		79% *	***	-
144		73% *	46% **	-
145		0% *	13,4	-

* % inh σ_1 à 100 nM

** % inh de la prolifération cellulaire à 100 μ M

*** Evaluation en cours

4. Conclusion

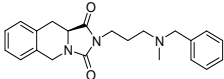
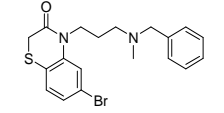
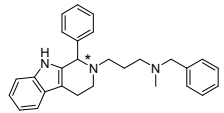
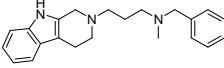
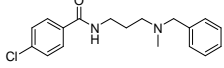
Ainsi, trois nouvelles familles de ligands σ_1 ont été conçues et synthétisées au cours de ce projet. Pour la majorité des composés, les modulations et fonctionnalisations ont été introduites lors de la

dernière étape de synthèse. Une optimisation des conditions expérimentales et de purification a permis de minimiser la dégradation ou les réactions secondaires observées pour certaines séries. Au total, un ensemble de 65 composés finaux a été obtenu dans des quantités suffisantes et avec une pureté satisfaisante.

Des études des propriétés biologiques ont été réalisées sur chacun des dérivés ou sont en cours de réalisation. L'affinité envers les récepteurs σ_1 et σ_2 ainsi que la cytotoxicité sur cellules neuronales ont été déterminées. En général, la majorité des composés dans chacune des séries possède une affinité envers la protéine σ_1 . En comparaison au dérivé Tic-hydantoïne de référence **A₅**, une bonne affinité a été maintenue pour une vingtaine de composés finaux ($K_i \leq 10$ nM). Les différents résultats obtenus ont permis de mettre en évidence des éléments pharmacophoriques importants. Ainsi, il semblerait que la présence d'un atome d'halogène sur le centre hydrophobe principal soit favorable. Par contre, un encombrement stérique trop important ou la perte du second centre hydrophobe entraînerait une diminution de l'affinité. En ce qui concerne la sélectivité envers la protéine σ_2 , les premiers résultats semblent indiquer une sélectivité modérée comparée au dérivé Tic-hydantoïne **A₅**. Enfin, l'ensemble des nouveaux ligands σ_1 synthétisés au cours de ce projet présente une cytotoxicité modérée voir faible ($IC_{50} \geq 10$ μ M).

Finalement, tenant compte de la totalité des résultats biologiques obtenus et de l'originalité structurale, quatre dérivés (**38**, **79**, **80** et **115**) appartenant aux trois familles ont été sélectionnés et engagés dans des études pharmacologiques afin de déterminer leur potentiel thérapeutique.

Tableau 12 : Propriétés biologiques des meilleurs composés (**A₅**, **38**, **79**, **80** et **115**).

Réf.	Structure	K_i (nM)		$K_i (\sigma_2) / K_i (\sigma_1)$	IC_{50} (μ M) SY5Y	IS
		σ_1	σ_2			
A₅		4,5	496*	110	> 100	> 20000
38		2,2	47,7	22	18.7	8631
79		3,4	20,8	6	9.3	2730
80		5,8	27,1	5	19.7	3378
115		4,6	100	21	>100	> 20000

* Etude réalisée sur des membranes de cellules de cortex de rat

BIBLIOGRAPHIE

246. Zampieri, D.; Grazia Mamolo, M.; Laurini, E.; Zanette, C.; Florio, C.; Collina, S.; Rossi, D.; Azzolina, O.; Vio, L., Substituted benzo[d]oxazol-2(3H)-one derivatives with preference for the σ_1 binding site. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 124-130.
247. Pirat, C.; Ulte, V.; Lebegue, N.; Berthelot, P.; Yous, S.; Carato, P., New Access to 5-Substituted 1,3-Benzothiazol-2(3H)-ones and Their N-Methyl Analogues by a Palladium Coupling Reaction. *Synthesis* **2011**, 3, 480-484.
248. Nugiel, D. A.; Jacobs, K.; Cornelius, L.; Chang, C.-H.; Jadhav, P. K.; Holler, E. R.; Klabe, R. M.; Bacheler, L. T.; Cordova, B.; Garber, S.; Reid, C.; Logue, K. A.; Gorey-Feret, L. J.; Lam, G. N.; Erickson-Viitanen, S.; Seitz, S. P., Improved P1/P1' Substituents for Cyclic Urea Based HIV-1 Protease Inhibitors: Synthesis, Structure-Activity Relationship, and X-ray Crystal Structure Analysis. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 1465-1474.
249. von Wantoch Rekowski, M.; Pyriochou, A.; Papapetropoulos, N.; Stöbel, A.; Papapetropoulos, A.; Giannis, A., Synthesis and biological evaluation of oxadiazole derivatives as inhibitors of soluble guanylyl cyclase. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 1288-1296.
250. Gabriele, B.; Salerno, G.; Costa, M.; Chiusoli, G. P., Recent developments in the synthesis of heterocyclic derivatives by PdI2-catalyzed oxidative carbonylation reactions. *J. Organomet. Chem.* **2003**, 687, 219-228.
251. Sonoda, N.; Yamamoto, G.; Natsukawa, K.; Kondo, K.; Murai, S., A new synthesis of heterocycles by the reaction of amino alcohols or amino thiols with carbon monoxide in presence of selenium. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 24, 1969-1972.
252. Kihlberg, T.; Langström, F. K. B., [¹³C] Carbon monoxide in selenium-mediated synthesis of ¹³C-carbamoyl compounds. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3687-3692.
253. Badarau, E.; Suzenet, F.; Bojarski, A. J.; Fînaru, A.-L.; Guillaumet, G., Benzimidazolone-based serotonin 5-HT1A or 5-HT7R ligands: Synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1600-1603.
254. Valdez, J.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Navarrete-Vázquez, G.; Tapia, A.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R., Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2221-2224.
255. Ganapathy, M. E.; Prasad, P. D.; Huang, W.; Seth, P.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V., Molecular and ligand-binding characterization of the sigma-receptor in the Jurkat human T lymphocyte cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 289, 251-260.
256. Delot, M.; Carato, P.; Furman, C.; Lemoine, A.; Lebegue, N.; Berthelot, P.; Yous, S., Synthesis of 1,11-Dihydro-2H-[1,3]oxazolo[4',5':5,6]indeno[1,2-b]quinolin-2-ones with Potential Topoisomerase I Inhibitory Activity. *Synthesis* **2009**, 2009, 3819-3822.
257. Hadjaz, F.; Yous, S.; Lebegue, N.; Berthelot, P.; Carato, P., A mild and efficient route to 2-benzyl tryptamine derivatives via ring-opening of β -carboline. *Tetrahedron* **2008**, 64, 10004-10008.
258. Bridoux, A.; Gossens, L.; Henichart, R. H. J.-P., Synthesis of 8-substituted tetrahydro- γ -carboline. *J. Heterocyclic Chem* **2006**, 43, 571-578.
259. Cozzi, P. G.; Zoli, L., A Rational Approach towards the Nucleophilic Substitutions of Alcohols "on Water". *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 4162-4166.
260. Tandon, V. K.; Maurya, H. K., 'On water': unprecedented nucleophilic substitution and addition reactions with 1,4-quinones in aqueous suspension. *Tet. Lett.* **2009**, 50, 5896-5902.
261. Li, J.; Cao, J.-j.; Wei, J.-f.; Shi, X.-y.; Zhang, L.-h.; Feng, J.-j.; Chen, Z.-g., Ionic Liquid Brush as a Highly Efficient and Reusable Catalyst for On-Water Nucleophilic Substitutions. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 229-233.

262. Deuss, P. J.; Popa, G.; Botting, C. H.; Laan, W.; Kamer, P. C. J., Highly Efficient and Site-Selective Phosphane Modification of Proteins through Hydrazone Linkage: Development of Artificial Metalloenzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 5315-5317.
263. Charton, J.; Gassiot, A. C.; Melnyk, P.; Girault-Mizzi, S.; Sergheraert, C., Optimized synthesis of tetrahydroisoquinoline-hydantoins. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7081-7085.
264. Katritzky, A. R.; Cai, C.; Suzuki, K.; Singh, S. K., Facile Syntheses of Oxazolines and Thiazolines with N-Acylbenzotriazoles under Microwave Irradiation. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 811-814.

CHAPITRE 4 :

Evaluations pharmacologiques

Pour pouvoir être envisagée comme médicament potentiel pour le traitement d'une pathologie, une molécule doit présenter un certain nombre de propriétés. Différentes évaluations ont donc été réalisées sur les quatre ligands σ_1 sélectionnés précédemment. Ainsi des études ADME ont permis d'évaluer leur potentiel pharmacologique en comparaison au composé Tic-hydantoïne de référence **A₅**. Le profil agoniste ou antagoniste a également été déterminé par des tests comportementaux. Enfin, les composés les plus prometteurs ont été évalués dans un modèle *in vitro* de la MA et dans un modèle *in vivo* de la SEP. L'ensemble des résultats obtenus est détaillé dans ce chapitre.

1. Activité anti-Alzheimer

La protéine σ_1 représente une cible thérapeutique innovante pour le traitement des maladies neurodégénératives et notamment la maladie d'Alzheimer. C'est pourquoi les quatre composés sélectionnés précédemment (**38**, **79**, **80** et **115**) ont dans un premier temps été testés dans un modèle *in vitro* de la maladie d'Alzheimer en comparaison avec la Tic-hydantoïne **A₅** (cellules SY5Y APPwt). L'évaluation de l'activité anti-Alzheimer a été réalisée par Sabiha Eddarkaoui au sein de l'unité UMR 837-1 à Lille.

1.1 Principe de l'étude

Le but de cette étude est de connaître l'impact de ces composés sur la production des peptides $A\beta$ d'une part et sur la production de fragments AICD et CTF α (carboxy-terminal fragment de type α) d'autre part. En effet, le peptide $A\beta$, issu du catabolisme de la protéine APP (Figure 95), est au centre de la pathologie Alzheimer (Chapitre 1). Beaucoup de recherches thérapeutiques sur la MA se focalisent sur la diminution de sa production, notamment *via* l'inhibition des deux sécrétases essentielles à la production de ces peptides. Une des stratégies serait d'orienter la production des fragments CTF α , AICD et sAPP connus pour avoir des propriétés neuroprotectrices et défavoriser la production des peptides $A\beta_{42}$ (le plus agrégeant et donc le plus toxique) et $A\beta_{40}$.

Un bon composé anti-Alzheimer serait donc un composé capable d'augmenter la production des fragments neuroprotecteurs tout en diminuant la production des peptides $A\beta$. Nous avons donc comparé les différents composés évalués en déterminant leur influence sur la production de chacun des métabolites de l'APP.

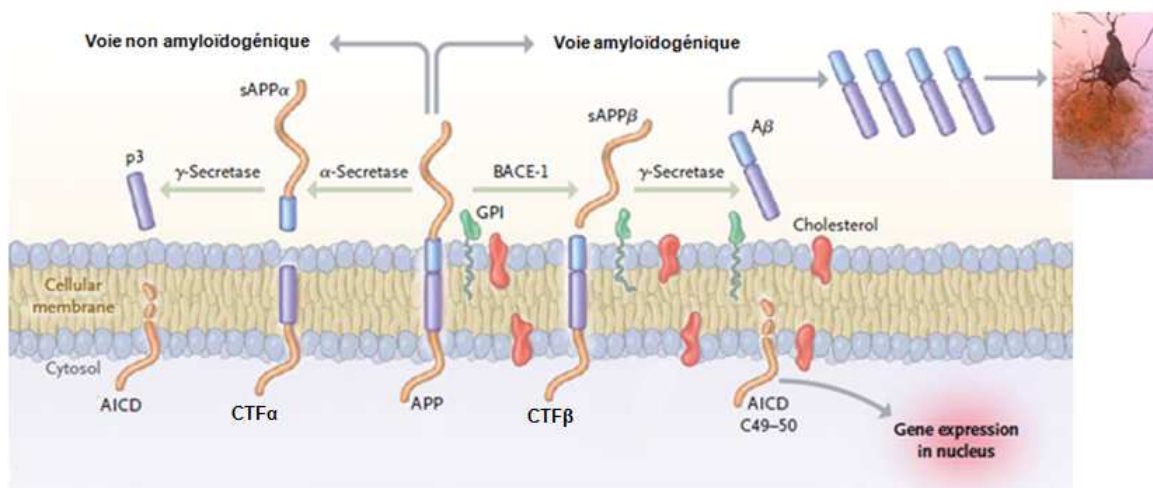


Figure 95 : Représentation de différentes voies de clivage de l'APP.

Des cellules SY5Y-APPwt sont incubées 24 heures en présence des composés évalués aux différentes concentrations (de 0,5 μM à 10 μM). Une lyse des cellules est ensuite réalisée et les métabolites de l'APP sont analysés par immuno-empreinte. La chloroquine (Figure 96) a été utilisée comme composé de référence puisque des études antérieures avaient montré son efficacité sur la régulation de la production de peptides $\text{A}\beta_{40-42}$ et l'augmentation des fragments AICD et $\text{CTF}\alpha$.²⁶⁵ Elle permet notamment de diviser par deux la production en peptide $\text{A}\beta_{42}$ à une concentration de 5 μM .

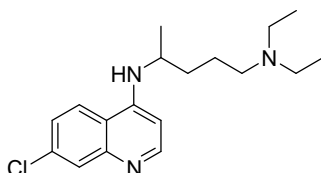


Figure 96 : Chloroquine : composé de référence utilisé dans l'évaluation de l'activité anti-Alzheimer.

1.2 Résultats et discussion

Les résultats de cette étude sont rassemblés dans les Figure 97 et Figure 98. Il a ainsi été démontré que le dérivé Tic-hydantoïne **A**₅ ne possédait aucun impact sur la production des différents fragments étudiés (Figure 97). Des résultats peu encourageants ont également été observés pour le composé **38** (Figure 98). Aucune activité n'a été mesurée sur la sécrétion de peptide $\text{A}\beta$. De plus, une activité inverse a été observée sur la sécrétion des fragments neuroprotecteurs ($\text{CTF}\alpha$ et AICD). En effet, à 10 μM , le composé **38** est capable de multiplier par deux la concentration en AICD alors qu'il engendre une diminution de 40% de la concentration en $\text{CTF}\alpha$.

²⁶⁵ V. Vingtdeux *et al.*, *Neurobiol. Dis.*, **2007**, 25, 686-696

Toutefois, des résultats intéressants ont été obtenus pour les composés **79**, **80** et **115**. Effectivement, une diminution d'un facteur 2 de la concentration en peptide $A\beta_{42}$ a été observée pour les composés **79** et **80** à 10 μ M. A cette même concentration, la sécrétion de peptide $A\beta_{40}$ ne diminue que de 25% pour le composé **79** et n'est pas affectée par le composé **80**. De plus, ces deux composés influent également sur la sécrétion des fragments neuroprotecteurs allant jusqu'à multiplier d'un facteur 4 la concentration en AICD (composé **80**, 10 μ M) et d'un facteur 2 la concentration en $CTF\alpha$.

Aucune activité sur les peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ n'a été observée pour le composé **115**. Il permettrait cependant, d'augmenter d'un facteur 2 la concentration en AICD et de 30% la concentration en $CTF\alpha$ à 10 μ M.

Finalement, ces études ont mis en évidence l'intérêt des composés **79** et **80** qui sont capables à la fois d'augmenter la concentration en AICD et $CTF\alpha$ et de diminuer la concentration en $A\beta_{42}$. L'impact de ces composés sur la production des différents métabolites de l'APP est proche de celui de la chloroquine, composé de référence.

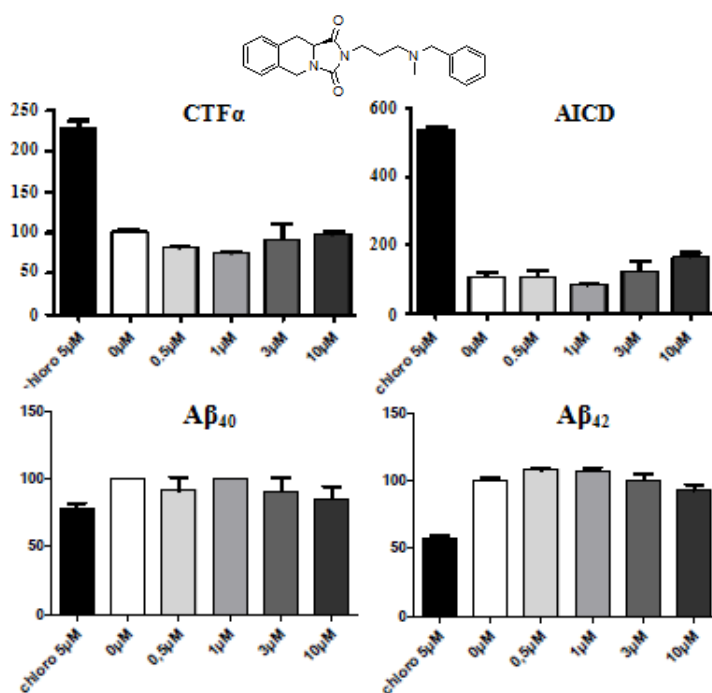


Figure 97 : Impact du composé Tic-hydantoïne A₅ sur la production de fragments $CTF\alpha$, AICD, $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$.

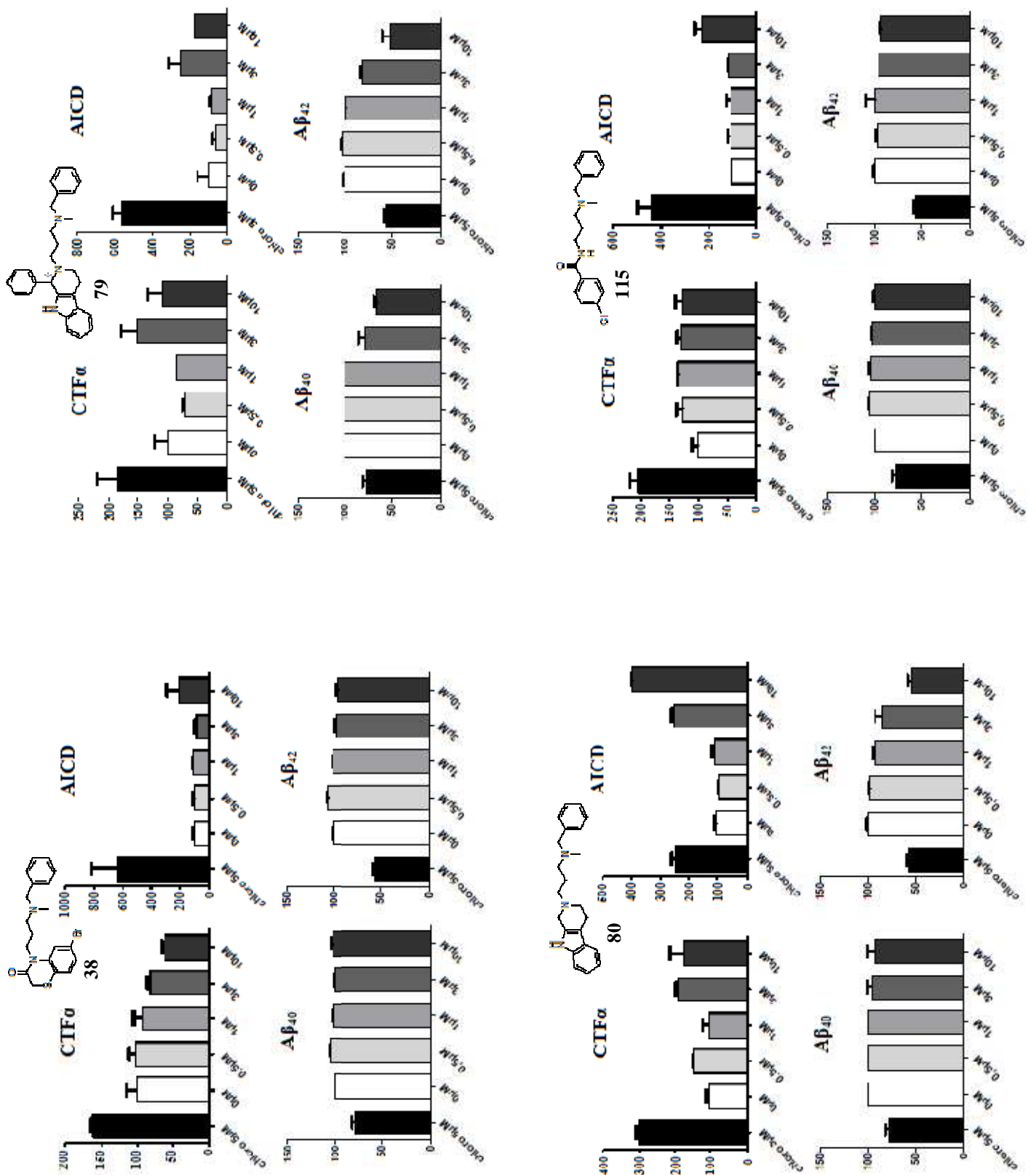


Figure 98 : Impact des composés 38, 79, 80 et 115 sur la production de fragments CTF α , AICD, A β ₄₀ et A β ₄₂.

2. ADME : études des propriétés physico-chimiques

Afin d'évaluer le potentiel comme médicament des composés les plus prometteurs (**38**, **79**, **80** et **115**), un profil préliminaire représentatif de leurs propriétés d'Absorption, Distribution, Métabolisation et Elimination a été réalisé par la société CEREP.

Cette étude a été divisée en trois parties :

- Analyse des propriétés en solution aqueuse : solubilité, coefficient de partition, liaison aux protéines plasmatiques
- Analyse des propriétés d'absorption intestinale : perméabilité
- Analyse du métabolisme : stabilité métabolique

2.1 Propriétés en solution aqueuse

Les propriétés en solution aqueuse permettent de prédire la bonne biodisponibilité d'une molécule. La solubilité des différents composés a été déterminée par HPLC en comparant les aires sous pic du composé étudié dans un mélange méthanol/eau (200 μM) et dans une solution tampon. Sur les quatre composés testés, les dérivés **80** et **115** ont montré une bonne solubilité aqueuse ($s_{80} = 161,3 \mu\text{M}$ et $s_{115} = 173,4 \mu\text{M}$). Ces résultats sont assez proches de ceux obtenus pour le composé de référence **A₅** ($s_{A5} = 198 \mu\text{M}$). Les deux autres composés ont montré des solubilités moyennes voir faibles pour le composé **79** ($s_{79} = 37,8 \mu\text{M}$).

D'autre part, le coefficient de partition permet d'estimer la distribution d'un médicament dans l'organisme en renseignant sur le degré de lipophilie, facteur clé pour déterminer le comportement *in vivo* de la substance. Il représente le ratio de la concentration du produit entre deux solvants non miscibles : le premier hydrophobe, généralement l'octanol et l'autre hydrophile, le PBS.²⁶⁶ L'octanol est utilisé pour ses propriétés assez proches de celles des couches lipidiques des membranes. Ce processus simulerait ainsi l'habilité de diffusion à travers les membranes. Une valeur expérimentale du log D comprise entre 2 et 2,5 peut être considérée comme optimale pour le passage de la barrière hématoencéphalique. Ainsi sur les quatre composés étudiés, les dérivés **80** et **115** ont montré un log D très intéressant de l'ordre de 2,5 (Tableau 13).

Enfin, l'étude des liaisons aux protéines plasmatiques permet de déterminer la distribution et l'activité du produit. Seules les molécules faiblement liées aux protéines plasmatiques auront une activité sur la cible. Ce taux de liaison est mesuré par une technique de dialyse équilibrée.²⁶⁷ Une solution de plasma plus les composés testés et une solution de tampon sont placées de part et d'autre d'une membrane de dialyse. Une fois l'équilibre atteint, les deux compartiments sont analysés par LC-MS pour déterminer la quantité de produit libre dans chaque compartiment. Pour les quatre composés testés, le taux de liaison aux protéines plasmatiques est supérieur à 90% (Tableau 13). Ce taux assez

²⁶⁶ J. Sangster, *Octanol-water partition coefficients: Fundamentals and physical chemistry*, Wiley, 1997

²⁶⁷ M. J. Banker *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 2003, 92, 967-974

élevé indique le faible volume de distribution qu'auront les différents dérivés dans l'organisme. Toutefois, la validité du test doit être confirmée par le taux de récupération du produit (% réc.). Ce chiffre indique l'erreur causée par l'absorption des composés sur la membrane ce qui interfère dans l'analyse. Plus le pourcentage de récupération est élevé, plus le taux d'erreur est faible rendant le test plus représentatif. Dans le cadre de cette étude, les pourcentages de récupération sont moyens pour les composés **38**, **79** et **80**. Ceci indique une certaine absorption de ces produits sur la membrane de dialyse. Pour le composé **115**, la moyenne de produit récupéré est de 75% ce qui valide le test.

Tableau 13 : Etude des propriétés en solution aqueuse.

Propriétés en solution aqueuse, C = 10 ⁻⁵ M					
Réf.	Structure	Solubilité (µM)	Log D	Liaison protéines plasmatiques	
				% lié	% réc.
A₅		198	2,12	72	78
38		93,2	3,43	99	50
79		37,8	> 4,7	> 99	48
80		161,3	2,60	96	61
115		173,4	2,51	94	75

2.2 Propriétés d'absorption intestinale

La perméabilité de la membrane intestinale envers nos composés a ensuite été étudiée. Ce critère informe du taux d'absorption de la substance, critère affectant ainsi la biodisponibilité d'un candidat médicament.

Afin de déterminer ce paramètre, un modèle *in vitro* d'absorption sur des cellules Caco-2 (Adénocarcinome colique humain) a été utilisé.²⁶⁸ Les composés, en solution dans un tampon pH = 6,5, sont ajoutés du côté apical des cellules Caco-2. Un tampon pH = 7,4 est placé du côté basolatéral. Le côté apical représente le lumen intestinal tandis que le côté basolatéral le sang. La perméabilité A-B (de l'apical vers le basolatéral) est ensuite mesurée. Les concentrations des

²⁶⁸ I. J. Hidalgo *et al.*, *Gastroenterology*, **1989**, 96, 736-749

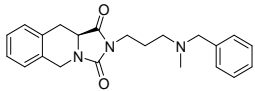
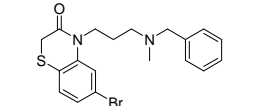
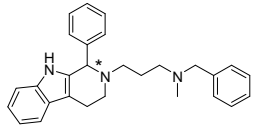
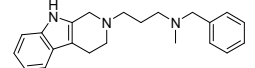
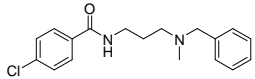
composés de chaque côté sont déterminées par LC-MS à $t = 0$ min et à $t = 60$ min. Ces valeurs permettent ensuite de calculer la perméabilité apparente en 10^{-6} cm.s⁻¹.

La société CEREP a établi une classification de la perméabilité pour leur test par l'étude de plusieurs composés de référence (colchicine, labetalol, propranolol, ranitidine) :

- Perméabilité faible : $P < 2.10^{-6}$ cm/s
- Perméabilité moyenne : 2.10^{-6} cm/s $< P < 20.10^{-6}$ cm/s
- Bonne perméabilité : 20.10^{-6} cm/s $< P$

D'après cette classification, les composés **79** ($P = 2,1.10^{-6}$ cm/s) et **80** ($P = 11,9.10^{-6}$ cm/s) montrent une perméabilité moyenne alors que les composés **38** ($P = 24,0.10^{-6}$ cm/s) et **115** ($P = 52,3.10^{-6}$ cm/s) montrent une bonne perméabilité. Toutefois, les pourcentages de récupération étant très faibles pour les composés **79** et **80** (Tableau 14), il se peut que des interactions avec la membrane interfèrent dans l'analyse. Pour le dérivé **115**, une forte récupération est observée (79%) et valide donc l'analyse. Ainsi, comme le dérivé Tic-hydantoïne de référence **A₅** ($P = 45,7.10^{-6}$ cm/s), le composé **115** possède une perméabilité très élevée ce qui semble indiquer un bon passage de la barrière intestinale.

Tableau 14 : Etude des propriétés d'absorption intestinale

Perméabilité A-B (Caco-2, pH 6,5/7,4), C = 10 ⁻⁵ M			
Réf.	Structure	P (10 ⁻⁶ cm.s ⁻¹)	% réc.
A₅		45,7	80
38		24,0	48
79		2,1	13
80		11,9	25
115		52,3	79

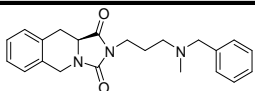
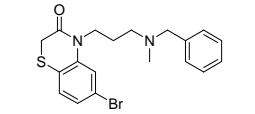
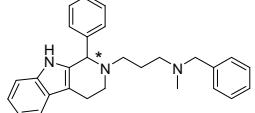
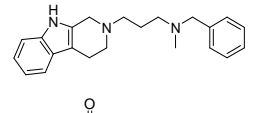
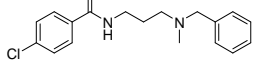
2.3 Métabolisme

La stabilité métabolique est le dernier paramètre évalué au cours de cette étude. Les composés étudiés sont placés en présence de microsomes hépatiques humains pendant 1 heure. L'évolution est

suivie par HPLC-MS/MS et le pourcentage apparent est calculé grâce à la comparaison entre les aires sous pic à la fin du temps d'incubation $t = 60$ min et au départ à $t = 0$ min.²⁶⁹

L'ensemble des dérivés étudiés (sauf **115**) a montré une faible stabilité métabolique, de l'ordre de celle obtenu pour le dérivé Tic-hydantoïne **A₅** (Tableau 15). Ainsi, le remplacement du noyau Tic-hydantoïne par des bi- ou tricycles, n'aura pas permis d'améliorer ce paramètre. Toutefois, il est intéressant de remarquer que pour le composé **115**, la stabilité métabolique a été multipliée par un facteur 5. En effet, après une heure, 77% du composé parent **115** a été détecté. Il semblerait donc que le meilleur motif pour remplacer le noyau Tic-hydantoïne afin d'améliorer la stabilité métabolique soit un simple cycle tel qu'un chlorobenzamide.

Tableau 15 : Etude de la stabilité métabolique.

Stabilité métabolique (microsomes hépatiques humains), $C = 10^{-6}$ M		
Réf.	Structure	Moyenne apparente (%)
A₅		15
38		0
79		13
80		10
115		77

Afin de mieux connaître le métabolisme du composé **115**, une étude de la cinétique de métabolisation a été réalisée au laboratoire de chimie analytique de la Faculté de Pharmacie de Lille par le Dr Emmanuelle Lipka.

Les mêmes conditions que CEREP, précédemment décrites, ont été utilisées. Dans un premier temps, la méthode par simple suivi HPLC a été validée sur des microsomes hépatiques humains. Puis une étude de la cinétique a été réalisée non seulement sur des microsomes hépatiques humains mais également sur des microsomes hépatiques murins (Figure 99). Une métabolisation plus importante et plus rapide a été observée chez la souris par rapport à l'homme. En effet, après une heure d'incubation en présence des microsomes hépatiques, il ne reste que 15% de composé **115** chez la souris contre 74% chez l'homme.

²⁶⁹ R. S. Obach *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, 283, 46-58

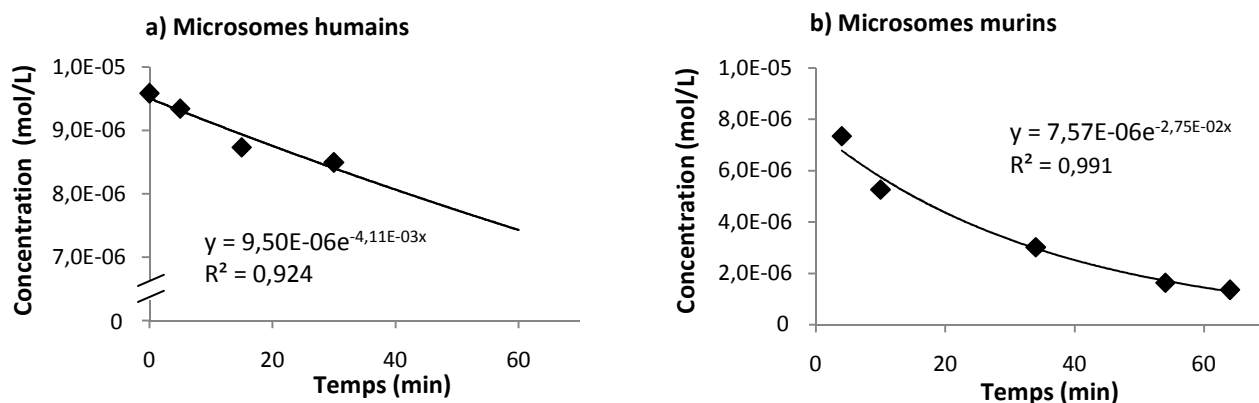


Figure 99 : Cinétique de métabolisation du composé **115**. a) Etude réalisée sur microsomes hépatiques humains. b) Etude réalisée sur microsomes hépatiques murins.

La cinétique de métabolisation observée au cours de cette étude correspond à une cinétique du premier ordre. Par conséquent, les différentes caractéristiques de métabolisation peuvent être calculées par les équations suivantes :

$$C(t) = C_0 \cdot e^{-k_{\text{métab}} \cdot t} \quad \text{et} \quad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{\text{métab}}}$$

Où $C(t)$ = concentration en **115** à un instant t

$k_{\text{métab}}$ = constante de métabolisation

C_0 = concentration en **115** à $t = 0$ min

$t_{1/2}$ = temps de demi-vie du composé **115**

Les propriétés de métabolisation du composé **115** ainsi déterminée sont présentées dans le Tableau 16. D'après les résultats obtenus, le composé est plus vite métabolisé chez la souris ($k_{\text{métab}} = 2,7 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) que chez l'homme ($k_{\text{métab}} = 4,1 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$). Il en résulte un temps de demi-vie 7 fois plus important chez l'homme. Ces résultats peuvent s'expliquer par une différence de composition des microsomes avec notamment la présence de plus de cytochrome P450 chez la souris. Des études complémentaires par LCMS/MS seront prochainement menées afin d'identifier les différents métabolites formés au cours des deux expériences (microsomes humains et de souris).

Tableau 16 : Propriétés de métabolisation du composé **115** chez l'homme et chez la souris.

	Humain	Souris
$k_{\text{métab}} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$4,1 \cdot 10^{-3}$	$2,7 \cdot 10^{-2}$
$t_{1/2} \text{ (min)}$	168,6	25,2
$Cl_{\text{int}} \text{ (}\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{)}$	28,8	242
Stabilité métabolique (60 min)	74,2%	14,5%

Finalement, cette étude préliminaire des propriétés ADME a montré que les composés **38** et **79** ne présentaient pas un profil idéal pour un développement thérapeutique. Même si leur faible solubilité aqueuse peut être contournée, leur faible stabilité métabolique pose un réel problème. Seuls les deux autres composés ont montré des résultats intéressants. En effet, les dérivés β -carboline **80** et benzamide **115** présentent un profil similaire au dérivé Tic-hydantoïne de référence **A₅**. Toutefois, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le composé **115** puisqu'en plus des bonnes propriétés en solution aqueuse et une bonne perméabilité, ce composé possède une excellente stabilité.

3. Etude comportementale : agoniste ou antagoniste ?

En parallèle des études ADME, une évaluation du profil agoniste ou antagoniste a été réalisée par la société Amylgen sur les dérivés **38**, **79** et **115**. Ces composés, appartenant chacun à une famille différente, ont été sélectionnés pour leurs bonnes propriétés biologiques (affinité, sélectivité et cytotoxicité).

L'activité des trois dérivés a été évaluée par leur capacité à renverser ou non les déficits d'apprentissage induits par la dizocilpine. En effet, un composé agoniste des récepteurs σ_1 serait capable de renverser ces déficits. Cet effet serait bloqué par un antagoniste de référence (NE-100).^{270,271} Au contraire, un composé antagoniste des récepteurs σ_1 serait inefficace sur ces déficits mais serait capable de bloquer les effets d'un agoniste de référence (PRE-084).²⁷² Des tests d'alternance spontanée et d'évitement passif ont été utilisés pour cette étude.

3.1 Test d'alternance spontanée

Le test d'alternance spontanée permet de mesurer la volonté des souris à explorer de nouveaux environnements. En effet, les rongeurs préfèrent généralement examiner un nouveau bras du labyrinthe plutôt que de retourner dans celui qui a précédemment été visité. Ainsi, l'apprentissage spatial et la mémoire de l'animal sont évalués.

Les souris sont placées dans un labyrinthe en forme de Y (Figure 100) pour une durée de 8 minutes. Elles sont alors autorisées à explorer librement les trois branches. Au cours de l'exploration, les souris doivent montrer une tendance à entrer dans un bras visité moins récemment. Toutes les entrées de bras sont successivement marquées de sorte que le nombre total d'entrées dans les branches, ainsi que la séquence des entrées sont enregistrées. Les données sont analysées pour déterminer le nombre d'entrées dans les branches sans répétition. Un taux d'alternance élevé indique que les animaux se rappellent quel bras a été exploré en dernier.

²⁷⁰ T. Maurice *et al.*, *Brain Res.*, **1994**, 647, 44-56

²⁷¹ T. Maurice *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **1997**, 328, 9-18

²⁷² T. Maurice *et al.*, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **1994**, 49, 859-869



Figure 100 : Labyrinthe en forme de Y utilisé pour le test d'alternance spontanée.

3.2 Test d'évitement passif

Le test d'évitement passif est utilisé pour évaluer l'apprentissage et la mémoire basé sur l'association d'un stimulus aversif (un choc aux pattes) avec un contexte environnemental spécifique. Les expériences sont menées dans une boîte à deux compartiments, l'un bien éclairé et l'autre sombre (Figure 101). Dans ce dispositif, l'animal apprend à refréner son envie naturelle de passer du compartiment lumineux vers le compartiment sombre afin de s'y réfugier (photophobie). Ainsi, pendant la phase d'entraînement, les souris sont placées dans le compartiment lumineux, et reçoivent un choc électrique doux aux pattes dès leur entrée dans le compartiment sombre. Après un jour, les animaux subissent un test de rétention. Ils sont à nouveau placés dans le compartiment éclairé et le temps de latence pour entrer dans le compartiment sombre associé à la punition est mesuré. Plus l'animal met du temps à entrer dans le compartiment sombre, plus le temps de latence mesuré sera long et permettra d'extrapoler quant à la capacité de l'animal à se souvenir qu'il a déjà reçu un choc électrique lors d'un précédent essai.

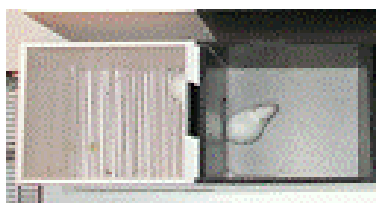


Figure 101 : Boîte à deux compartiments utilisée pour le test d'évitement passif.

3.3 Plan de l'étude

L'étude s'est déroulée sur trois jours dont le premier était consacré au test d'alternance spontanée et les deux derniers au test d'évitement passif. Pour chaque test, les composés **38**, **79** et **115** étaient administrés en *i.p* à différentes concentrations (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 et 10 mg/kg) 30 minutes avant le début de la session. La dizocilpine (0,15 mg/kg) ou le véhicule étaient ensuite administrée également en *i.p*. 20 minutes avant le début de la session lors des jours 1 et 2. Lors de la phase de rétention du test d'évitement passif (Jour 3), les souris ne recevaient que les composés étudiés (Figure 102).

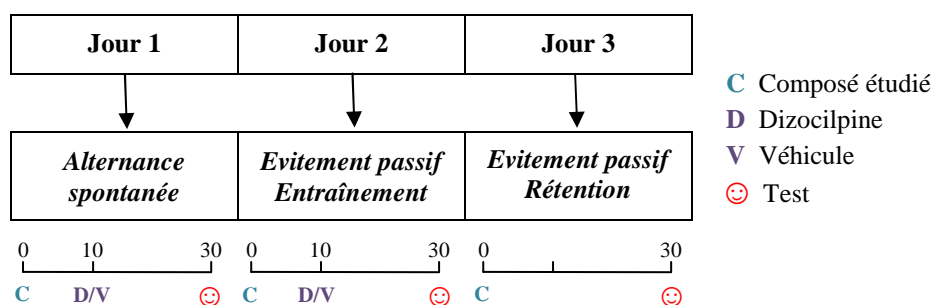


Figure 102 : Déroulement de l'étude comportementale.

3.4 Résultats et discussion

L'ensemble des résultats obtenus pour les trois composés au cours de cette étude sont présentés dans les Figure 103 et Figure 104.

Un pourcentage d'alternance élevé lors du test d'alternance spontanée traduit la capacité de l'animal à se rappeler quelle branche du labyrinthe a été explorée en dernier. Ainsi, lorsque la dizocilpine est administrée aux souris, on observe une diminution des performances d'alternance comparé au groupe témoin (Figure 103, témoins en blanc vs dizocilpine en rouge). Cette diminution traduit les déficits d'apprentissage et de mémoire induit par la drogue. Aucune diminution significative de ces déficits n'a été observée lorsque les composés **38** et **79** ont été co-administrés avec la dizocilpine à différentes concentrations (Figure 103, a et b). Dans les deux cas, une légère augmentation des performances d'alternance a été constatée à 0,1 mg/kg et 0,5 mg/kg. Toutefois, cet effet n'est pas assez significatif pour être considéré comme une amélioration des déficits d'apprentissage et de mémoire. Par contre, un effet sur les déficits induits par la dizocilpine a été constaté pour le dérivé **115** à 0,5 mg/kg (Figure 103, c). En effet, une augmentation significative des performances d'alternance a été observée à cette concentration pour ce composé.

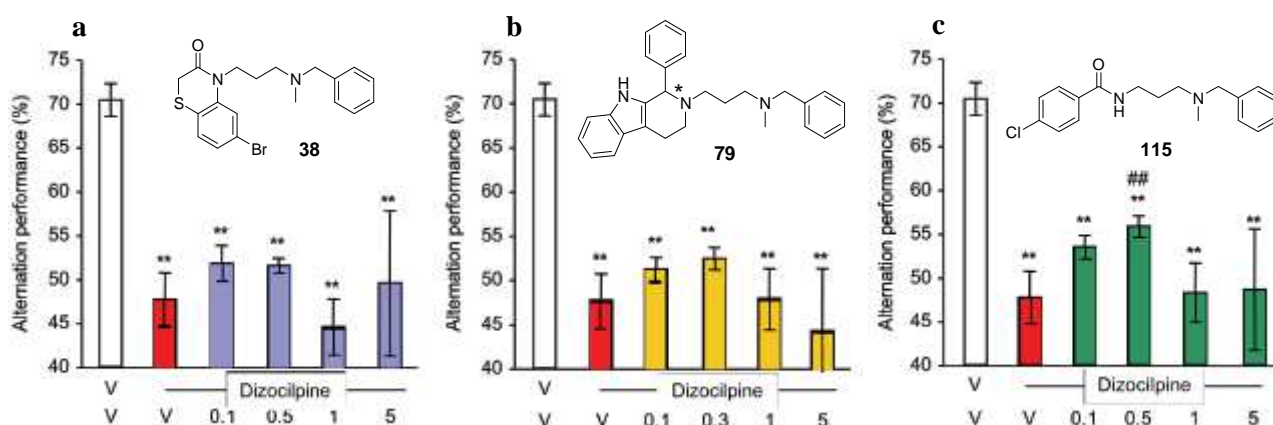


Figure 103 : Effets des composés **38**, **79** et **115** sur les déficits d'apprentissage induit par la dizocilpine : test d'alternance spontanée. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs groupe traité par (véhicule + véhicule). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs groupe traité (dizocilpine + véhicule).

D'autre part, un temps de latence important observé au cours du test d'évitement passif traduit la capacité de l'animal à se rappeler qu'une punition lui est infligée quand il entre dans le compartiment sombre. Ainsi, lorsque la dizocilpine est administrée aux souris, une diminution de ce temps de latence est observée comparé au groupe témoin (Figure 104, témoin en blanc vs dizocilpine en rouge). Cette diminution traduit, là encore, les déficits d'apprentissage et de mémoire induit par la drogue. Aucun effet significatif sur ces déficits n'a été observé lorsque le composé **38** a été co-administré avec la dizocilpine à différentes concentrations (Figure 104, a). Pour le dérivé **79**, une légère augmentation de ce temps de latence a été constatée à 0,1 mg/kg (Figure 104, b). Toutefois, cette augmentation n'est pas assez significative pour être considérée comme une réversion des déficits d'apprentissage et de mémoire induit par la drogue. En conclusion, seul le dérivé **115** s'est avéré efficace puis qu'il est capable d'améliorer le temps de latence significativement à des concentrations de 0,1 mg/kg et de 0,5 mg/kg (Figure 104, c). Ce composé permet de réduire les déficits d'apprentissage et de mémoire induits par la dizocilpine.

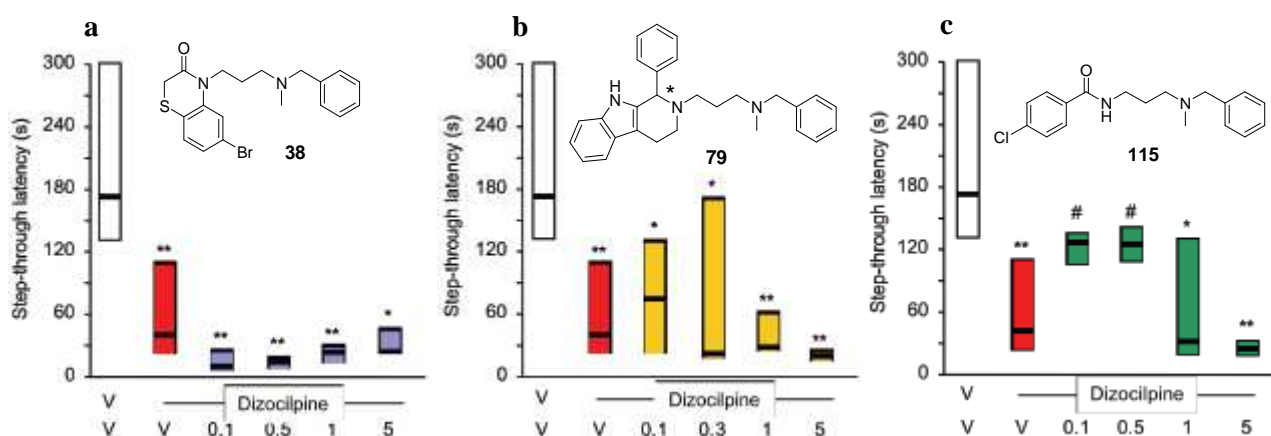


Figure 104 : Effets des composés **38**, **79** et **115** sur les déficits d'apprentissage induit par la dizocilpine : test d'évitement passif. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs groupe traité par (véhicule + véhicule). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs groupe traité (dizocilpine + véhicule).

Afin de confirmer le profil du composé **115**, une seconde analyse a été réalisée en présence d'un antagoniste de référence, le NE-100. Le but de cette étude est de confirmer que les effets anti-amnésiques observés à 0,5 mg/kg sont bien bloqués par l'injection d'un antagoniste du récepteur en quantité suffisante pour saturer les sites d'interaction. Les deux tests comportementaux ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites. Lorsque les souris sont traitées par la dizocilpine, une diminution des performances d'alternance et du temps de latence est observée par comparaison avec le groupe témoin (Figure 105). Ces résultats sont également constatés lorsque l'antagoniste NE-100 est co-administré avec la dizocilpine, ce qui prouve que ce composé ne possède aucun effet sur les déficits induit par la dizocilpine. Ces déficits sont renversés par l'administration du composé **115** à 0,5 mg/kg de manière significative. Enfin, si l'antagoniste NE-100 est co-administré

avec le composé **115** et la dizocilpine, une diminution des performances d'alternance et du temps de latence est à nouveau constatée. Ces résultats montrent un effet spécifique du composé **115** sur les récepteurs σ_1 , et une action agoniste du composé.

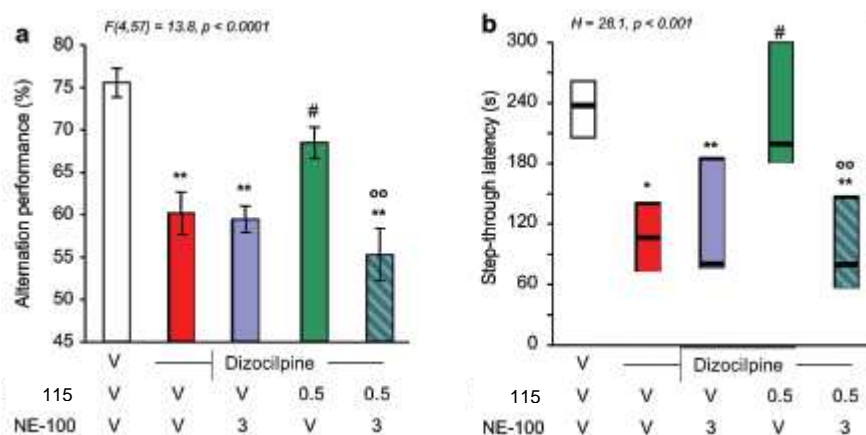


Figure 105 : Validation des effets anti-amnésiques du composé **115** par l'action de l'antagoniste de référence NE-100. a) test d'alternance spontanée. b) test d'évitement passif. $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs groupe traité par (véhicule + véhicule). # $p < 0.05$ vs groupe traité (dizocilpine + véhicule). oo $p < 0.01$ vs groupe traité par (dizocilpine + **115**).

Ainsi, cette étude a montré que sur les trois composés testés, deux composés (**38** et **79**) n'ont pas d'effets significatifs sur les déficits d'apprentissage et de mémoire induits par la dizocilpine. Ces composés ne présentent donc pas un profil agoniste σ_1 aux concentrations testées. Toutefois, ces résultats ne permettent pas de conclure quant à l'éventuel profil antagoniste qu'ils pourraient présenter. En effet, des tests complémentaires, notamment en présence d'un agoniste de référence, sont nécessaires. Finalement, seul le dérivé benzamide **115** présente un profil agoniste σ_1 . En effet, ce composé permet de réduire significativement les déficits d'apprentissage et de mémoire induit par la dizocilpine dans les deux tests comportementaux réalisés. Ce processus, observé pour des concentrations de 0,1 mg/kg et de 0,5 mg/kg, est inhibé par l'administration d'un antagoniste de référence, le NE-100.

4. Sclérose en plaques

Les différentes études menées sur ces nouveaux ligands σ_1 ont mis en évidence un composé possédant des propriétés biologiques et pharmacologiques compatibles avec un développement thérapeutique. En effet, le dérivé benzamide **115** présente non seulement une bonne affinité σ_1 , une sélectivité et une faible toxicité mais également des propriétés ADME très intéressantes avec une stabilité métabolique améliorée de façon très importante par rapport au composé **A5**. Ce composé au profil agoniste a donc naturellement été sélectionné pour des études *in vivo* sur un modèle de sclérose en plaques.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire d'immunologie de la Faculté de Médecine (EA 2686, Lille) par le Dr Bénédicte Oxombre-Vanteghem.

4.1 Modèle EAE

L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (ou EAE) est une pathologie du SNC induite expérimentalement. Cette pathologie auto-immune et démyélinisante constitue un modèle animal validé pour la SEP.

L'EAE présente des similitudes importantes avec des maladies humaines démyélinisantes telle que la SEP.²⁷³ En effet, elle est caractérisée non seulement par la destruction de la gaine de myéline et la présence d'antigène dans le tissu cérébral et le liquide cébrospinal des animaux, mais également par la présence de lésions multiples au sein du SNC. Différents éléments du système nerveux peuvent être impliqués dans l'induction d'une EAE. Toutefois, un grand intérêt a été porté sur la myéline dans la mesure où la démyélinisation représente la caractéristique principale de la maladie.²⁷⁴ Ainsi, une immunisation avec des extraits de myéline purifiés permet de multiplier par 5 l'incidence de la maladie chez les animaux. Par la suite, il a été démontré qu'une immunisation des animaux directement avec la MBP était plus efficace que lors de l'utilisation de la myéline complète.²⁷⁵ D'autres protéines composant la myéline ont également été identifiées comme encéphalitogènes telles que la MOG ou encore la protéine protéolipidique de la myéline (PLP).^{276, 277}

De nombreux modèles EAE ont été développés afin de mimer les divers aspects de la SEP. Le modèle le plus couramment utilisé est un modèle murin. Chez la souris, l'induction d'une EAE est un protocole standardisé consistant en une injection d'un peptide encéphalitogène (MBP, MOG, ou PLP) en émulsion dans du CFA (Adjuvant Complet de Freund) associé à une ou deux injections de toxine pertussique. L'utilisation d'un adjuvant permet de faciliter l'induction de la pathologie. D'autre part, l'administration de toxine pertussique permet d'augmenter la perméabilité de la BHE et par conséquent d'améliorer l'efficacité de l'induction. L'évolution de la pathologie varie en fonction de la souche de souris et du peptide utilisé. En général, les premières manifestations cliniques vont se traduire par une perte de poids puis par l'apparition d'une paralysie. Cette paralysie peut progressivement se transformer en une tétraplégie.

Au laboratoire d'immunologie (EA 2686), deux modèles murins ont été développés impliquant des peptides de la MOG ou de la PLP. Le modèle MOG présente une évolution clinique chronique, progressive et non rémittente. Au contraire, le modèle PLP présente une évolution clinique de type

²⁷³ A. Wolf *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **1947**, 6, 333-357

²⁷⁴ E. A. Kabat *et al.*, *J. Exp. Med.*, **1947**, 85, 117-130

²⁷⁵ R. H. Laatsch *et al.*, *J. Exp. Med.*, **1962**, 115, 777-788

²⁷⁶ C. L. Brunner, H. *et al.*, *J. Neurochem.*, **1989**, 52, 296-304

²⁷⁷ J. Folch *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1951**, 191, 807-817

RR-MS. La première poussée apparaît 12 à 14 jours après l'immunisation. Elle est suivie par des épisodes récurrents plus modérés dans la majorité des cas.

Dans le cadre de cette étude, le modèle PLP a été sélectionné pour ses similitudes avec la pathologie humaine. En effet, comme cela a été décrit dans le chapitre 1, 85% des cas de SEP débutent par une forme RR-MS.

4.2 Preuve de concept

L'évaluation des ligands σ_1 dans des modèles *in vivo* de SEP a démarré avec des études antérieures réalisées au laboratoire sur un agoniste σ_1 . En effet, l'action du dérivé Tic-hydantoïne de référence A_5 a été évaluée lors de l'initiation d'une EAE à poussée. Des souris femelles de souche SJL/J ont été activement immunisées par une injection sous-cutanée de peptide encéphalitogène de la protéine protéolipidique, PLP₁₃₉₋₁₅₁. Les animaux ont reçu une seule injection du composé A_5 à 1 ou 5mg/kg au moment de cette immunisation. L'évolution clinique de la pathologie a été appréciée durant 35 jours. D'après les résultats présentés dans la Figure 106, les souris (EAE + PBS) ont montré des scores cliniques plus élevés que les souris traitées (EAE + A_5) tout au long de l'étude. Il a ainsi été déterminé que le composé A_5 permettait de réduire la sévérité de l'EAE à des doses de 1 et 5 mg/kg.

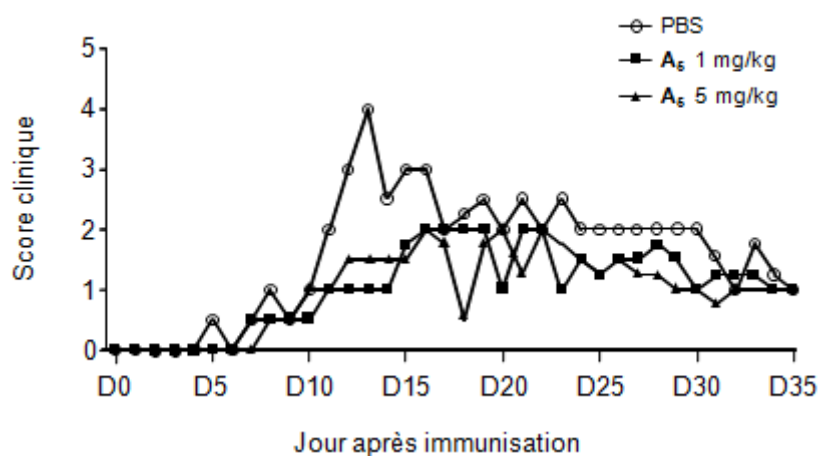


Figure 106 : Réduction de l'EAE chez la souris par administration du composé A_5 (agoniste σ_1). Score clinique : 0 = aucun symptôme ; 0,5 = légère hypotonie de la queue ; 1 = hypotonie modérée de la queue ; 1,5 = sévère hypotonie de la queue ; 2 = atonie de la queue et/ou démarche maladroite ; 2,5 = parésie des membres postérieurs modérée ; 3 = parésie des membres postérieurs sévère ; 3,5 = paralysie d'un des membres postérieurs ; 4 = paraplégie ; 4,5 = paralysie de 3 membres ; 5 = tétraplégie. Représentation de la médiane du score obtenu en fonction des jours.

D'autre part, il a également été démontré que le composé A_5 permettait de réduire significativement l'incidence de la pathologie et de retarder son apparition (Figure 107). En effet, 95% des souris (EAE + PBS) ont atteint un score clinique de 2 (atonie de la queue et/ou démarche maladroite) pendant l'étude contre seulement 80% pour les souris (EAE + A_5). De plus, 50% des souris (EAE + PBS) ont

atteint ce score à partir du 11^{ème} jour de l'étude, alors que seulement 20% des souris (EAE + A₅) présentaient des symptômes significatifs à ce même moment.

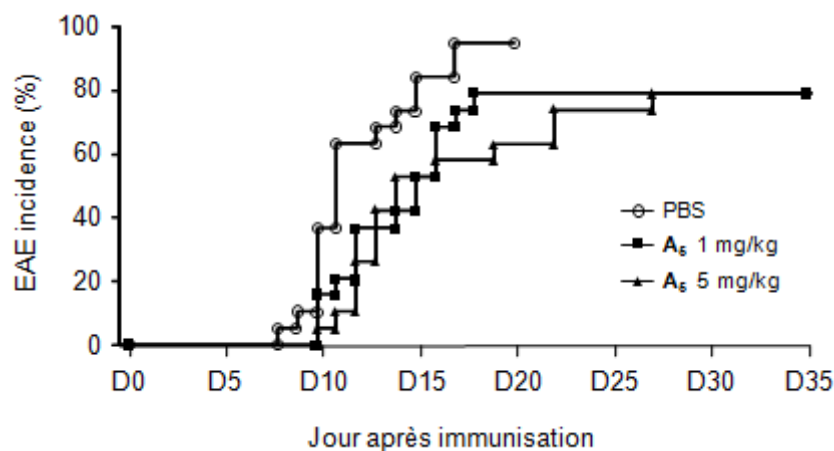


Figure 107 : Réduction de l'incidence de l'EAE chez la souris par administration du composé A₅ (agoniste σ_1).

De plus, il semblerait qu'une seule injection du composé A₅ soit suffisante pour réduire la mortalité des souris (Tableau 17). En effet, une mortalité de 42% a été observée dans le groupe de souris témoin (EAE + PBS) contre seulement 10% et 16% dans les groupes de souris (EAE + A₅). L'évaluation de la poussée a également révélé une réduction significative de l'intensité et de la durée chez les souris traitées par le dérivé Tic-hydantoïne A₅.

Tableau 17 : Effets du composé A₅ sur le développement de l'EAE.

	EAE + PBS	EAE + A ₅ 1 mg/kg	EAE + A ₅ 5 mg/kg	p*
Mortalité	42%	10%	16%	0,0020
Intensité de la poussée	4,5 (± 1,5) / J13 (±8)	3,5 (± 2,5) / J16 (±7)	3,0(± 2,0) / J15 (±5)	0,0234
Durée de la poussée (jour)	21 (±17)	11 (±16)	8 (±15)	0.0123

* groupe traité (EAE + PBS) vs groupe traité (EAE + A₅).

Intensité : médiane score clinique maximal / médiane du premier jour au score maximal

Durée : médiane du nombre de jour avec un score clinique ≥ 2

Enfin, il était important de savoir si la diminution de la sévérité de l'EAE observée lors de l'étude clinique se traduisait bien par une diminution des infiltrats cellulaires et de la démyélinisation. En effet, ces deux phénomènes sont caractéristiques de l'EAE. Ainsi des analyses histologiques ont été réalisées à des moments critiques tels que l'acmé de la première poussée (14 ± 1 jour) sur des souris témoins (EAE + PBS) et des souris traitées (EAE + A₅). En général, il a été observé une diminution de l'infiltration de cellules mononuclées dans le SNC (corps calleux/striatum, cervelet/tronc cérébral et

moelle épinière) chez les souris traitées en comparaison aux souris témoins. De même, une démyélinisation principalement dans la moelle épinière a été confirmée chez les souris (EAE + PBS) alors que les souris (EAE + **A₅**) n'ont présenté aucune démyélinisation (Figure 108).

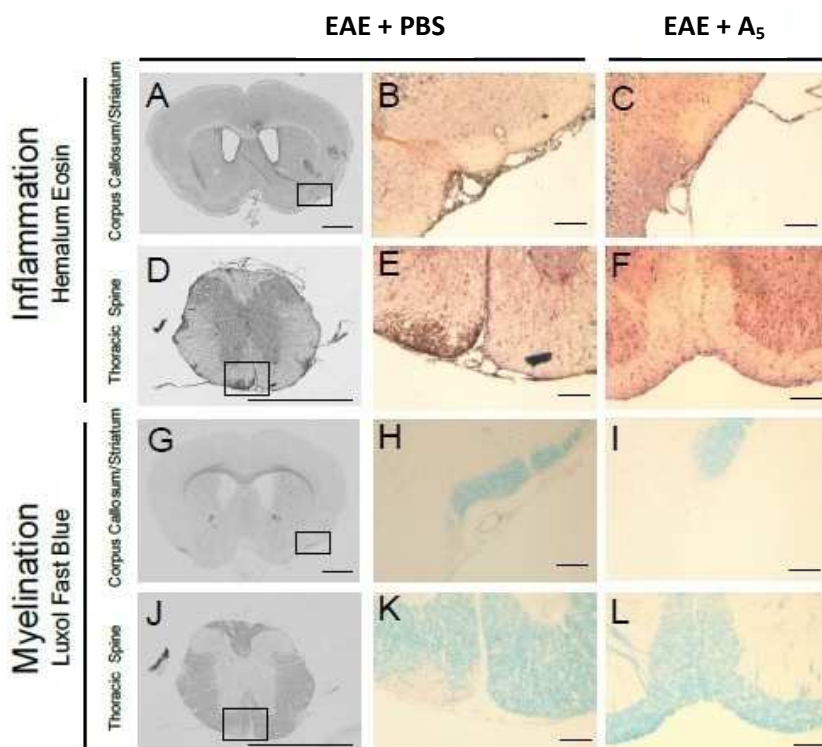


Figure 108 : Réduction de l'infiltration cellulaire et de la démyélinisation chez la souris EAE par administration du composé **A₅** (agoniste σ_1). Images par microscopie optique de sections de corps calleux (A-C, G-I) ou de moelle épinière (D-F, J-L) colorés avec H&E ou LFB. Barre d'échelle = 100 μ m ; grossissement = 10x.

Ainsi, il a été démontré par cette étude que le composé de référence **A₅** permettait non seulement de diminuer la sévérité de l'EAE mais aussi les lésions au niveau du SNC. Il semblerait donc que les agonistes σ_1 possèdent des propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires intéressantes pour le traitement de la sclérose en plaques.

Suite à ces résultats prometteurs, l'évaluation des propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires du dérivé benzamide **115** a donc été envisagée

4.3 Plan de l'étude

L'étude s'est déroulée sur 70 jours durant lesquels l'évolution de l'EAE a été déterminée (Figure 109). Une immunisation active des souris a été réalisée à J0 par une injection sous cutanée d'une émulsion de peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁ et de CFA. Afin d'augmenter la perméabilité de la BHE, deux injections en *i.p* de toxine pertussique ont été effectuées à J0 et à J2. Enfin, le composé **115** a été administré en *i.p* à J0 à deux concentrations (0,5 mg/kg et 1 mg/kg). Les souris témoins ont reçu une injection de solution saline en *i.p* à la place du composé étudié.

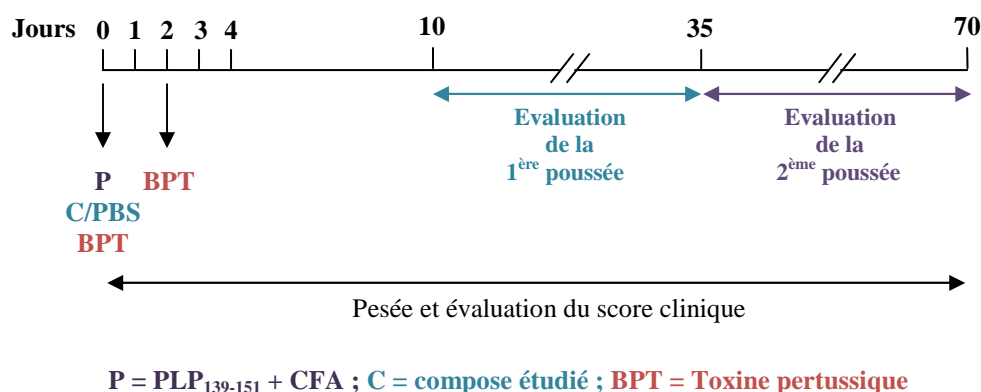


Figure 109 : Déroulement de l'étude EAE.

Au cours de l'étude, les animaux avaient accès librement à de la nourriture et de l'eau. Une pesée a été réalisée tous les jours afin de s'assurer qu'ils s'alimentaient correctement. Enfin, l'évolution de l'état clinique des souris a été déterminée tout au long de l'étude par une évaluation à l'aveugle d'un score clinique selon l'échelle suivante :

- | | |
|--|--|
| 0 = aucun symptôme | 3 = parésie des membres postérieurs sévère |
| 0,5 = hypotonie légère de la queue | 3,5 = paralysie d'un des membres postérieurs |
| 1 = hypotonie modérée de la queue | 4 = paraplégie |
| 1,5 = hypotonie sévère de la queue | 4,5 = paralysie de 3 membres |
| 2 = atonie de la queue et/ou démarche maladroite | 5 = tétraplégie |
| 2,5 = parésie des membres postérieurs modérée | |

4.4 Résultats et discussion

L'étude a été divisée en deux parties. Dans un premier temps, l'évolution de l'état clinique sur la première poussée (J0 à J35) a été déterminée pour l'ensemble des animaux. Dans un deuxième temps, les résultats obtenus pour le groupe de souris traitées avec 1 mg/kg de composé **115** étant peu concluants, l'évolution de l'état clinique sur la deuxième poussée (J35 à J70) a été déterminée uniquement pour les groupes (EAE + PBS) et (EAE + **115** ; 0,5 mg/kg). L'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans la Figure 110 et le Tableau 18.

Les observations cliniques réalisées au cours de la première poussée montrent que les souris (EAE + PBS) présentent un début de poussée, c'est-à-dire qu'elles atteignent un score de 2, au 12^{ème} jour de l'étude (Figure 110). L'effet maximal est observé aux alentours du 15^{ème} jour avec un score médian de 3. Des résultats similaires sont obtenus avec les souris (EAE + **115** ; 1 mg/kg). Pour les souris (EAE + **115** ; 0,5 mg/kg), le début de la poussée est constaté au 13^{ème} jour avec un score médian maximal de 2 conservé tout au long de la poussée. En ce qui concerne la deuxième poussée, les souris (EAE + PBS) présentent un score médian maximal de 3,5 entre le 49^{ème} et le 52^{ème} jour de l'étude. Sur cette même période, les souris traitées par le composé **115** présentent un effet maximal de seulement 2.

Globalement, une légère aggravation de l'état clinique des souris (EAE + PBS) est naturellement observée entre les deux poussées. L'état clinique des souris traitées (EAE + **115** ; 0,5 mg/kg), est par contre resté stable tout au long de l'étude ne dépassant jamais un score médian de 2. Ainsi une diminution de la sévérité de l'EAE, plus marquée sur la deuxième poussée que sur la première, est observée lorsqu'une unique injection du composé benzamide **115** à 0,5 mg/kg est réalisée le jour de l'immunisation des animaux. L'administration du composé à une concentration de 1 mg/kg n'entraîne aucun effet significatif comparé au groupe témoin (EAE + PBS) sur la première poussée.

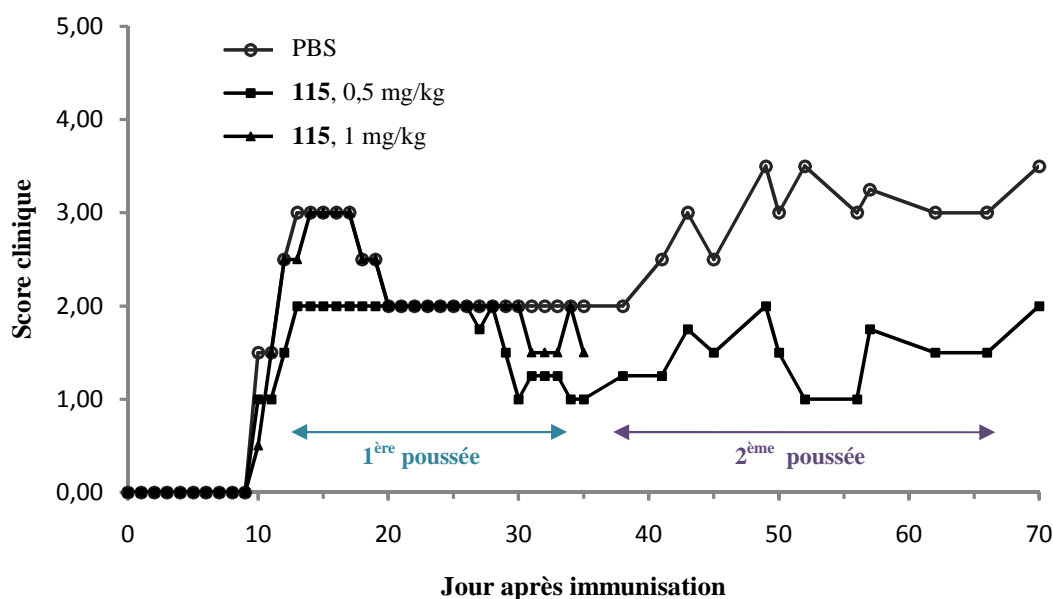


Figure 110 : Réduction de l'EAE chez la souris par administration du composé **115** (agoniste σ_1). Score clinique : 0 = aucun symptôme ; 0,5 = légère hypotonie de la queue ; 1 = hypotonie modérée de la queue ; 1,5 = sévère hypotonie de la queue ; 2 = atonie de la queue et/ou démarche maladroite ; 2,5 = parésie des membres postérieurs modérée ; 3 = parésie des membres postérieurs sévère ; 3,5 = paralysie d'un des membres postérieurs ; 4 = paraplégie ; 4,5 = paralysie de 3 membres ; 5 = tétraplégie. Représentation de la médiane du score obtenu en fonction des jours.

Toutefois, le composé benzamide **115** ne semble pas avoir d'influence sur l'incidence de la pathologie quelque soit la concentration d'administration, contrairement au composé Tic-hydantoïne de référence **A₅**. En effet, l'ensemble des souris, témoins et traitées, a atteint en score clinique de 2 au cours de l'étude (Figure 111). Ce score a été atteint par 50% des souris (EAE + PBS) et (EAE + **115** ; 0,5 mg/kg) à partir du 12^{ème} jour de l'étude. Au même moment, 80% des souris (EAE + **115** ; 1 mg/kg) présentaient déjà ce score.

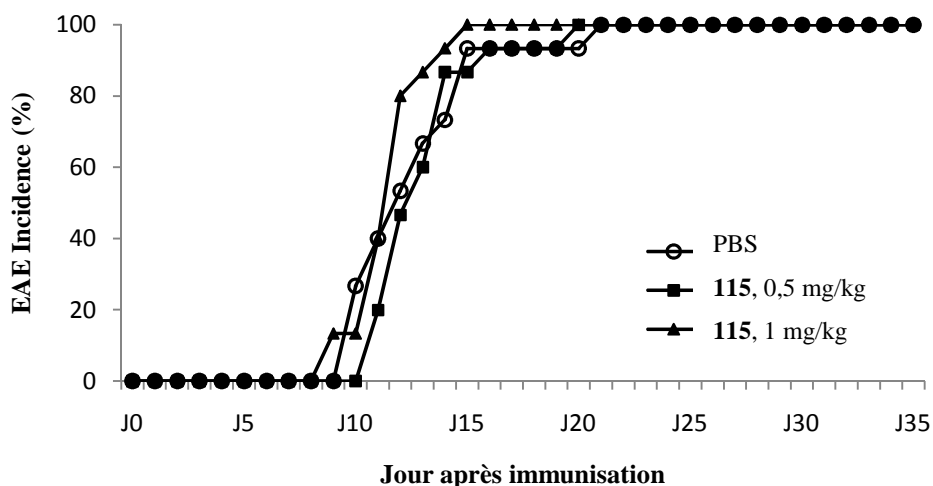


Figure 111 : Incidence de l'EAE chez la souris après administration du composé **115** (agoniste σ_1).

Enfin, il semblerait qu'une seule injection du composé **115** soit suffisante pour réduire la mortalité des souris (Tableau 18). En effet, une mortalité de 20% a été observée dans le groupe de souris témoin (EAE + PBS) contre seulement 13% et 0% dans les groupes de souris (EAE + **115**). L'évaluation de la première poussée a révélé une réduction de l'intensité et de la durée chez les souris traitées (EAE + **115** ; 0,5 mg/kg). Cet effet est encore plus significatif sur la deuxième poussée puisque les souris traitées présentent une intensité maximale médiane de 2,75 contre 4,5 chez les souris (EAE + PBS), et une durée de seulement 3 jours contre 12 pour les souris (EAE + PBS). Aucun effet significatif n'a été observé sur l'intensité ou la durée de la première poussée pour les souris (EAE + **115** ; 1 mg/kg) comparées aux souris témoins.

Tableau 18 : Effets du composé **115** sur le développement de l'EAE.

		EAE + PBS	EAE + 115 0,5 mg/kg	EAE + 115 1 mg/kg	p*
Mortalité		20%	13%	0%	0,3146
1^{ère} poussée	Intensité	3,5 (± 1,5) / J15 (±5)	2,5 (± 2,5) / J14 (±6)	4,0 (± 2) / J13 (±3)	0,4531
	Durée (jour)	16 (±7)	13 (±10)	17 (±10)	0,1498
2^{ème} poussée	Intensité	4,5 (± 2) / J43 (±22)	2,75 (± 2) / J40 (±17)	nd	0,0484
	Durée (jour)	12 (±5)	3 (±9)	nd	0,0076

p* : groupe traité (EAE + PBS) vs groupe traité (EAE + **115** ; 0,5 mg/kg) vs groupe traité (EAE + **115** ; 1 mg/kg)
 Intensité : médiane du score clinique maximal /médiane du premier jour au score maximal
 Durée : médiane du nombre de jour avec un score clinique ≥ 2
 nd: non déterminé

L'ensemble des résultats montre que le composé **115** ne semble pas avoir d'effet sur l'incidence de l'EAE quelque soit la concentration d'administration. Toutefois, une seule injection de ce composé au profil agoniste à une concentration de 0,5 mg/kg présente un effet inhibiteur sur le développement de l'EAE. La diminution de la sévérité a été observée non seulement lors de la première poussée mais également lors de la deuxième poussée.

Il est envisagé, par la suite, d'effectuer des analyses histologiques afin de savoir si ces résultats cliniques se traduisent bien par une diminution de la démyélinisation et des infiltrats cellulaires comme cela avait été observé pour le dérivé Tic-hydantoïne **A₅**. D'autre part, la démyélinisation étant un phénomène caractéristique de l'EAE et de la SEP, un modèle murin de démyélinisation toxique par la cuprizone pourra également être utilisé. En effet, la cuprizone induit une démyélinisation chez l'animal se caractérisant par une dégénérescence oligodendrocytaire plutôt qu'une attaque directe de la myéline.²⁷⁸ Ce modèle permet une étude des lésions du SNC sans perméabilisation de la BHE, avec une inflammation très restreinte comparé aux modèles EAE. Il pourra plus particulièrement être associé aux techniques d'imagerie IRM chez le petit animal qui permettront un suivi longitudinal des animaux.

Enfin, le composant **115** ayant montré des résultats intéressants sur la sévérité de l'EAE lors de la deuxième poussée, une étude curative est actuellement en cours. Ainsi, les souris ne recevront pas le composé **115** en préventif à J0 comme précédemment mais une injection journalière au moment où apparaîtront les premiers signes cliniques annonciateurs de la première poussée (Score 2) et ce pendant 20 jours. Les résultats de cette étude permettront de déterminer le potentiel thérapeutique du composé **115** dans le traitement de la SEP.

²⁷⁸ M. Kipp *et al.*, *Acta Neuropathol.*, **2009**, 118, 723-736

BIBLIOGRAPHIE

265. Vingtdeux, V.; Hamdane, M.; Bégard, S.; Loyens, A.; Delacourte, A.; Beauvillain, J.-C.; Buée, L.; Marambaud, P.; Sergeant, N., Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. *Neurobiol. Dis.* **2007**, *25*, 686-696.
266. Sangster, J., *Octanol-water partition coefficients: Fundamentals and physical chemistry*. Wiley: Chichester, UK, **1997**; Vol. 2.
267. Banker, M. J.; Clark, T. H.; Williams, J. A., Development and validation of a 96-well equilibrium dialysis apparatus for measuring plasma protein binding. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 967-974.
268. Hildalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt, R. T., Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model transport system of the intestinal epithelium. *Gastroenterology* **1989**, *96*, 736-749.
269. Obach, R. S.; Baxter, J. G.; Liston, T. E.; Silber, B. M.; Jones, B. C.; Macintyre, F.; Rance, D. J.; Wastall, P., The Prediction of Human Pharmacokinetic Parameters from Preclinical and In Vitro Metabolism Data. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *283*, 46-58.
270. Maurice, T.; Hiramatsu, M.; Itoh, J.; Kameyama, T.; Hasegawa, T.; Nabeshima, T., Behavioral evidence for a modulating role of σ ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. *Brain Res.* **1994**, *647*, 44-56.
271. Maurice, T.; Privat, A., SA4503, a novel cognitive enhancer with σ_1 receptor agonist properties, facilitates NMDA receptor-dependent learning in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *328*, 9-18.
272. Maurice, T.; Su, T.-P.; Parish, D. W.; Nabeshima, T.; Privat, A., PRE-084, a σ selective PCP derivative, attenuates MK-801-induced impairment of learning in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1994**, *49*, 859-869.
273. Wolf, A.; Kabat, E. A.; Bezer, A. E., The pathology of acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in the rhesus monkey and its resemblance to human demyelinating disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1947**, *6*, 333-357.
274. Kabat, E. A.; Wolf, A.; Bezer, A. E., The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J. Exp. Med.* **1947**, *85*, 117-130.
275. Laatsch, R. H.; Kies, M. W.; Gordon, S.; Alvord, E. C., The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation. *J. Exp. Med.* **1962**, *115*, 777-788.
276. Brunner, C. L., H.; Waehneltd, T. V.; Matthieu, J. M.; Linington, C., Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendrial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the SNC of adults rats. *J. Neurochem.* **1989**, *52*, 296-304.
277. Folch, J.; Lees, M., Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. *J. Biol. Chem.* **1951**, *191*, 807-817.
278. Kipp, M.; Clarner, T.; Dang, J.; Copray, S.; Beyer, C., The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol.* **2009**, *118*, 723-736.

CONCLUSION GENERALE

Depuis sa découverte la protéine σ_1 a été impliquée dans de nombreuses pathologies et notamment dans les maladies neurodégénératives. Ces troubles neurologiques touchent des millions de personnes à travers le monde et ne présentent à l'heure actuelle aucun traitement curatif. Ainsi, il existe un intérêt particulier à étudier cette protéine et à concevoir de nouveaux ligands σ_1 afin de développer de nouvelles thérapeutiques pour ces maladies.

Des études antérieures réalisées au laboratoire avaient permis d'identifier la famille des Tic-hydantoïnes comme très affine et sélective envers la protéine σ_1 . Le composé **A₅**, chef de file de cette famille, présente une affinité nanomolaire, une bonne sélectivité et une faible cytotoxicité. Évalué dans différents modèles dont un modèle *in vivo* de SEP, ce composé a montré des propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires très intéressantes. Toutefois, même si une efficacité et une affinité importantes sont des prérequis essentiels pour un candidat médicament, le profil ADME est également important dans la perspective d'un développement thérapeutique. Le composé **A₅** présente toutes les propriétés ADME compatibles avec un développement à l'exception d'une faible stabilité métabolique. Une étude de la métabolisation a permis de mettre en évidence les différents éléments de la molécule susceptibles d'être métabolisés.

Le projet consistait donc à concevoir, synthétiser et évaluer de nouveaux ligands σ_1 afin de pallier ce problème de stabilité métabolique des dérivés Tic-hydantoïnes. Trois familles de molécules ont été conçues par modification de deux éléments du composé **A₅**: le motif hétérocyclique et la chaîne latérale. Différentes stratégies de synthèse ont été mises au point et optimisées pour conduire à la préparation de 65 nouveaux composés. Les produits ont été obtenus dans des quantités suffisantes et des puretés satisfaisantes pour les évaluations biologiques.

L'affinité envers la protéine σ_1 a été déterminée pour l'ensemble des composés. Les efforts de pharmacomodulations ont permis de mettre en évidence de nouveaux ligands σ_1 avec des affinités nanomolaires voire subnanomolaires. Comparé au dérivé Tic-hydantoïne de référence **A₅**, l'affinité σ_1 a été conservée ou améliorée ($K_i \leq 10$ nM) pour une vingtaine de composés. La sélectivité σ_2 a été déterminée et les nouveaux ligands se sont montrés moins sélectifs que le dérivé **A₅**. Toutefois, les dérivés évalués présentent quand même une bonne sélectivité. La cytotoxicité sur des cellules neuronales a également été déterminée. L'ensemble des composés présente une cytotoxicité modérée voire faible ($IC_{50} \geq 10$ μ M).

L'évaluation des propriétés biologiques a permis de mettre en évidence 4 composés (**38**, **79**, **80** et **115**) possédant une bonne affinité σ_1 , une bonne sélectivité, une faible cytotoxicité et une bonne diversité structurale représentative des composés synthétisés au cours de ce projet. Des études pharmacologiques complémentaires ont donc été réalisées sur ces composés afin de déterminer leur potentiel en tant que médicament. Dans un premier temps, l'activité anti-Alzheimer a été évaluée dans un test *in vitro* dont le but était de connaître l'impact des composés sur la production des peptides A β d'une part et des fragments neuroprotecteurs (AICD et CTF α) d'autre part. Cette étude a mis en

évidence les composés tricycliques **79** et **80** qui sont capables à la fois d'augmenter la concentration en facteur neurotrophiques (AICD et CTF α) et de diminuer la concentration en peptide pro-agrégatif A β ₄₂. L'impact de ces composés sur la production des différents métabolites de l'APP est proche de celui de la chloroquine, un composé de référence.

Une évaluation préliminaire du profil ADME a également été effectuée afin de connaître les propriétés pharmacologiques des 4 composés sélectionnés. Il a ainsi été démontré que les composés **38** et **79** ne présentaient pas un profil idéal pour un développement thérapeutique. Par contre, les dérivés **80** et **115** possèdent un profil similaire au dérivé Tic-hydantoïne de référence **A₅**. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le composé **115** puisqu'en plus des bonnes propriétés en solution aqueuse et une bonne perméabilité, ce composé possède une bonne stabilité métabolique. Ainsi, les efforts de pharmacomodulations réalisés sur le chef de file auront permis de conserver l'ensemble des propriétés biologiques tout en améliorant la stabilité métabolique pour un composé. L'évaluation des propriétés biologiques des analogues du composé **115** est en cours.

En parallèle de cette étude ADME, une évaluation du profil agoniste ou antagoniste a été réalisée sur un représentant de chaque famille : **38**, **79** et **115**. Les résultats ont montré que les composés **38** et **79** ne présentaient pas un profil agoniste aux concentrations testées. Toutefois, des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ou non leur profil antagoniste. Finalement, seul le composé **115** présente bien un profil agoniste σ_1 à faible dose. En effet, il est capable de renverser les déficits d'apprentissage et de mémoire induit par la dizocilpine dans des tests comportementaux à des doses de 0,5 mg/kg et 1 mg/kg. Ces effets sont bloqués par un antagoniste σ_1 de référence (NE-100).

Les premières évaluations pharmacologiques étant encourageantes, le potentiel thérapeutique des nouveaux ligands σ_1 a été évalué sur une seconde pathologie d'intérêt : la sclérose en plaques. L'ensemble des résultats ADME et agoniste/antagoniste, a orienté la sélection du composé testé. Le dérivé chlorobenzamide **115**, seul composé présentant un profil agoniste parmi les quelques composés évalués, a donc été évalué dans un modèle EAE. Les résultats ont montré qu'une seule injection du composé à 0,5 mg/kg permettait d'inhiber le développement de l'EAE chez la souris. La diminution de la sévérité a été observée non seulement lors de la première poussée mais également lors de la deuxième poussée.

En conclusion, ce projet a permis de mettre en évidence deux familles nouvelles de ligands σ_1 possédant un intérêt dans le traitement des maladies neurodégénératives dont notamment la MA et la SEP. Les résultats prometteurs obtenus incitent à continuer les investigations sur ces nouveaux dérivés. Des analyses complémentaires sont en cours afin de déterminer et préciser l'ensemble des constantes d'affinité σ_1 et σ_2 .

D'autre part, la détermination du profil agoniste/antagoniste n'est actuellement possible que par des tests *in vivo*. Un test *in vitro* va donc être mis au point dans les prochains mois afin de faciliter la

détermination du profil d'activité des molécules synthétisées. Ce test sera basé sur la dissociation du complexe Bip/ σ_1 provoquée par l'action d'un ligand agoniste.

La famille des dérivés tricycliques ayant montré un intérêt dans le traitement de la MA, une fonctionnalisation des hétérocycles ainsi qu'une exemplification de la famille sont donc envisagées. Les propriétés biologiques et thérapeutiques seront déterminées pour les composés les plus prometteurs.

Les résultats obtenus avec le dérivé du benzamide **115** incitent également à continuer les recherches sur cette famille des dérivés monocycliques que ce soit d'un point de vue chimique que biologique. Ainsi, de nouvelles pharmacomodulations ont été envisagées afin d'exemplifier la famille. De nouveaux composés sont en cours de synthèse avec des modifications sur la nature des substituants et leur position sur le noyau benzamide ainsi que la nature de la chaîne latérale. Le composé **115** ayant montré des effets intéressants sur la sévérité de l'EAE chez la souris après une seule injection, une étude curative est actuellement en cours sur le même modèle. Les propriétés en tant que potentiel médicament pour la sclérose en plaques seront ainsi déterminées. Des études complémentaires seront également réalisées par la suite telles que des analyses histologiques et une étude de démyélinisation dans un modèle murin de démyélinisation toxique par la cuprizone.

Ces deux familles de nouveaux ligands σ_1 font l'objet d'un projet de valorisation par la SATT Nord de France qui devrait aboutir au dépôt d'un ou plusieurs brevets.

PARTIE EXPERIMENTALE

Abbreviations

CDCl₃	Deuterated chloroform
CD₃OD	Deuterated methanol
br	Broad
CycloHex	Cyclohexane
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DCM	Dichloromethane
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide
DMSO-d₆	Deuterated dimethylsulfoxide
eq	Equivalent
ESI	Electrospray mass analysis
EtOAc	Ethyle acetate
HBtu	O-benzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
LCMS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
m	Multiplet
MeOH(NH₃)	Methanol saturated with NH ₃ (gas)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
p	Pentet
PE	Petroleum Ether
P_{HPLC}	Purity determined by HPLC
ppm	Parts per million
q	Quartet
Rf	Retention factor
s	Singlet
t	Triplet
TLC	Thin Layer Chromatography
t_R	HPLC retention time

I. Chemical synthesis

1. Material and instrumentation

Chemicals and solvents were obtained from commercial sources, and used without further purification unless otherwise noted. Reactions were monitored by TLC performed on Macherey-Nagel Alugram® Sil 60/UV₂₅₄ sheets (thickness 0.2mm).

Purification of products was carried out by either column chromatography or thick layer chromatography. Column chromatography was carried out on using Macherey-Nagel silica gel (230-400 mesh). Thick layer chromatography was performed on glass plates coated with Macherey-Nagel Sil/UV₂₅₄ (thickness 2 mm), from which the pure compounds were extracted with the following solvent system: DCM/MeOH(NH₃), 9:1.

NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 300 spectrometer (operating at 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C). Chemical shifts are expressed in ppm relative to either tetramethylsilane (TMS) or to residual proton signal in deuterated solvents. Chemical shifts are reported as position (δ in ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, p = pentet, dd = doublet of doublet, br = broad and m = multiplet), coupling constant (J in Hz), relative integral and assignment. The attributions of protons and carbons were achieved by analysis of 1D and 2D experiments (¹H, ¹³C, COSY, HSQC and HMBC).

Mass spectra were recorded on a Varian triple quadrupole 1200W mass spectrometer equipped with a non-polar C18 TSK-gel Super ODS (4.6 x 50 mm) column, using electrospray ionization and a UV detector (diode array).

The purity of final compounds was verified by two types of high pressure liquid chromatography (HPLC) columns: C18 Interchrom UPTISPHERE and C4 Interchrom UPTISPHERE. Analytical HPLC was performed on a Shimadzu LC-2010AHT system equipped with a UV detector set at 254 nm and 215 nm. Compounds were dissolved in 50 μ L methanol and 950 μ L buffer A, and injected into the system. The following eluent systems were used: buffer A (H₂O/TFA, 100:0.1) and buffer B (CH₃CN/H₂O/TFA, 80:20:0.1). HPLC retention times (HPLC t_R) were obtained at a flow rate of 0.2 mL/min for 35 min using the following conditions: a gradient run from 100% of buffer A over 1 min, then to 100% of buffer B over the next 30 min.

The melting point analyses were performed on Barnstead Electrothermal Melting Point Series IA9200 and are uncorrected.

2. General procedure

Many reactions were performed using similar procedures. These procedures are described as general procedures in this part.

2.1 Procedure A

One equivalent of appropriate heterocyclic derivative was dissolved in appropriate solvent (DMF, acetonitrile). Three equivalents of potassium carbonate and 1.2 equivalents of appropriate 3-chloropropan-1-amine hydrochloride derivative were added. The resulting mixture was heated at 70°C until the disappearance of starting material. The reaction was monitored by TLC. After 24 to 96 hours, the solvent was removed under reduced pressure and a 60 mL amount of water added to the residue. The crude product was extracted with dichloromethane. The combined organic fractions were washed with water and dried over magnesium sulphate. Purification by thick layer chromatography or column chromatography was performed.

2.2 Procedure B

One equivalent of appropriate heterocyclic derivative and 1.2 equivalents of appropriate 3-chloropropan-1-amine hydrochloride derivative were dissolved in a mixture of water:acetonitrile (2:1, v/v). Three equivalents of sodium hydroxide were added. The resulting mixture was heated at 50°C until the disappearance of starting material. The reaction was monitored by TLC. After 24 to 48 hours, the product was extracted with ethyl acetate. The combined organic fractions were washed with water and dried over magnesium sulphate. Purification by thick layer chromatography or column chromatography was performed.

2.3 Procedure C

One equivalent of appropriate heterocyclic derivative was dissolved in acetonitrile. Three equivalents of potassium carbonate, 5 equivalents of sodium iodide and 1.2 equivalents of appropriate 3-chloropropan-1-amine hydrochloride derivative were added. The resulting mixture was heated at 70°C until the disappearance of starting material. The reaction was monitored by TLC. After 24 to 48 hours, the solvent was removed under reduced pressure and a 20 mL amount of water added to the residue. The crude product was extracted with dichloromethane. The combined organic fractions were washed with water and dried over magnesium sulphate. Purification by thick layer chromatography or column chromatography was performed.

2.4 Procedure D

Reaction was carried out under nitrogen atmosphere. One equivalent of benzoic acid, 1.2 equivalents of HOBt and 1.2 equivalents of HBTu were stirred at room temperature for 10 minutes in dichloromethane. A solution of one equivalent of *N*-benzyl-*N*-methylpropan-1,3-diamine dihydrochloride and 15 equivalents of DIEA in dichloromethane was added to the reacting mixture. After stirring at room temperature for 24 hours, the solvent was removed under reduced pressure and

dichloromethane was added to the residue. The solution was washed with a solution of NaHCO_3 (5%) then saturated NaCl solution. The organic layer was dried over magnesium sulfate. The crude product was purified by thick layer chromatography or column chromatography.

2.5 Procedure E

Reaction was carried out under nitrogen atmosphere. One equivalent of 4-chlorobenzoylchloride was added to a solution of amine (1 eq), triethylamine (2.5 eq) and DMSO (cat) in anhydrous DMF. The resulting mixture was stirred at room temperature for 12 hours. Then the solution was diluted with DCM and washed successively with HCl (2M) solution, NaHCO_3 saturated solution and NaCl solution. The organic layer was dried over magnesium sulfate and evaporated. The crude product was purified by column chromatography.

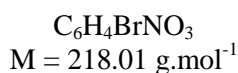
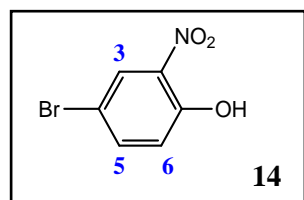
2.6 Procedure F

The reaction was carried out under a nitrogen atmosphere. One equivalent of appropriate heterocyclic derivative was dissolved in anhydrous DMF. Four equivalents of sodium hydride were added carefully and the resulting mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. Then 1.2 equivalents of appropriate 3-chloropropan-1-amine hydrochloride derivative were added. The reacting mixture was stirred at room temperature until the disappearance of starting material. The reaction was monitored by TLC. The reaction was quenched with 50 mL of water and the crude product extracted with ethyl acetate. The combined organic fractions were washed with water and dried over magnesium sulfate. Purification by column chromatography or thick layer chromatography was performed.

3. Synthesis of bicyclic derivatives

3.1 Heterocycles

3.1.1 4-bromo-2-nitrophenol (14)²⁴⁸



A suspended solution of Macherey-Nagel silica in 150 mL of nitric acid (69%) was stirred at room temperature for 2 hours. The mixture was then filtered and dried on a Buchner funnel. The solid was left to air dry in a crystallizing dish for 3 days. The loading level was determined by titration with sodium hydroxide solution (0.1 M) to be $4.35 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ nitric acid. This nitric acid impregnated silica gel (34.68 mmol, 7.95 g) was suspended in 50 mL of dichloromethane and cooled to 0°C . The suspension was treated with 4-bromophenol (17.3 mmol, 3g) in several portions. After 20 minutes, the mixture was filtered, and the silica gel cake was washed with dichloromethane. The solvent was removed under

reduced pressure. Purification by filtration on silica gel (DCM:petroleum ether, 8:2, v/v, + 0.1 % MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: Yellow solid. **Yield:** 3.5 g (91%)

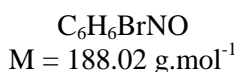
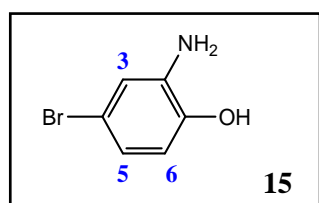
TLC (DCM:PE, 8:2, v/v): R_f = 0.8

Melting point: 88°C

LCMS (ESI⁻): Calc. for [M-H]: 215.9; 217.9; Found: 216.0; 218.0

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 10.50 (s, br, 1H, OH); 8.28 (d, ⁴J_{3,5} = 2 Hz, 1H, H₃); 7.69 (dd, ³J_{5,6} = 9 Hz, ⁴J_{5,3} = 2 Hz, 1H, H₅); 7.11 (d, ³J_{6,5} = 9 Hz, 1H, H₆).

3.1.2 2-amino-4-bromophenol (**15**)²⁴⁹



A mixture of stannous chloride dihydrate (36.7 mmol, 7g) and concentrated hydrochloric acid (30 mL) in methanol (100 mL) was cooled to 0°C. A 2 g (9.17 mmol) amount of 4-bromo-2-nitrophenol **14** was added in one portion. After the complete addition, the cooling bath was removed and the reaction was allowed to stir at room temperature overnight. The resulting mixture was diluted with ethyl acetate and the pH adjusted at 7 with saturated sodium bicarbonate solution. The white precipitate was filtered and washed with ethyl acetate. The organic layer was collected and the aqueous layer extracted with ethyl acetate. The combined organic fractions were dried over magnesium sulphate and concentrated to give the desired product of sufficient purity for use without purification in the next step.

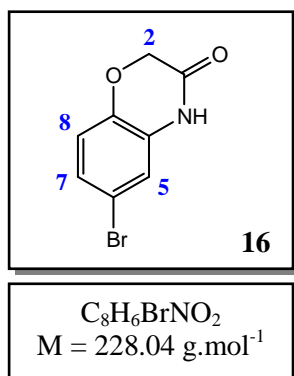
Aspect: Brown solid. **Yield:** 1.3 g (76%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 85:15, v/v): R_f = 0.7

Melting point: 130°C

LCMS (ESI⁻): Calc. for [M-H]: 185.9; 187.9; Found: 186.0; 188.0

¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆), δ(ppm): 9.24 (br s, 1H, OH); 6.70 (d, ⁴J_{3,5} = 2 Hz, 1H, H₃); 6.55 (d, ³J_{6,5} = 9 Hz, 1H, H₆); 6.48 (dd, ³J_{5,6} = 9 Hz, ⁴J_{5,3} = 2 Hz, 1H, H₅); 4.77 (br s, 2H, NH₂).

3.1.3 6-bromobenzoxazin-3-one (**16**)

The reaction was performed under nitrogen atmosphere. A 500 mg (2.65 mmol) amount of 2-amino-4-bromophenol **15** was dissolved in 10 mL of DMSO. After successive addition of potassium ethoxide (2.65 mmol, 223 mg) and ethylbromoacetate (2.65 mmol, 295 μL), the resulting mixture was stirred at room temperature for 16 hours. The solution was poured into an ice-water mixture. The product precipitated out of the solution and was isolated by filtration. The desired product was collected as beige solid of sufficient purity for use without purification in the next step.

Aspect: beige solid. **Yield:** 177 mg (30%)

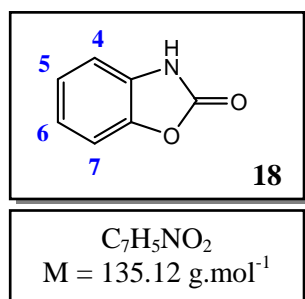
TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.5

Melting Point: 219°C

LCMS (ESI⁻): Calc. for [M-H]: 225.9; 227.9; Found: 226.0; 228.0

¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆), δ(ppm): 10.79 (br s, 1H, NH); 7.07 (dd, ³J₇₋₈ = 9 Hz, ⁴J₇₋₅ = 2 Hz, 1H, H₇); 7.01 (d, ⁴J₅₋₇ = 2 Hz, 1H, H₅); 6.90 (d, ³J₈₋₇ = 9 Hz, 1H, H₈); 4.58 (s, 2H, H₂).

¹³C NMR (75MHz, DMSO-d₆), δ(ppm): 164.6 (CO); 142.6 (C_{aro}); 129.0 (C_{aro}); 125.3 (C_{aro}); 118.0 (C_{aro}); 113.2 (C_{aro}); 66.6 (C₂).

3.1.4 Benzoxazolin-2-one (**18**)²⁵⁰

Oxidative carbonylation reaction was performed in a 40 mL stainless steel autoclave with magnetic stirring. The autoclave was charged in the presence of air with PdI₂ (0.004 mmol, 1.65 mg) and a solution of 2-amino-4-bromophenol **15** (9.17 mmol, 1g) in 5 mL of DME. The autoclave was pressurized at room temperature with stirring with CO (20 bar), and air (4 bar) and then heated at 100°C overnight. After cooling, the autoclave was slowly degassed and the solvent removed under reduced pressure.

Compounds **18** and **19** was separated by flash chromatography (petroleum ether: ethyl acetate, 7:3 to 1:1 (v/v)).

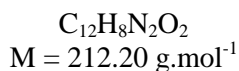
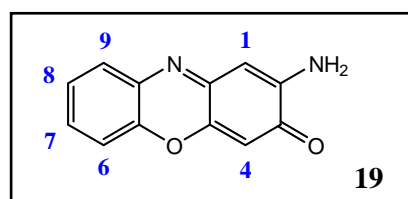
Aspect: Orange solid. **Yield:** 520 mg (42%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 7:3, v/v): R_f = 0.4

Melting point: 138°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 136.0; Found: 136.0.

¹H NMR (300MHz, CH₃OD), δ(ppm): 7.20-7.03 (m, 4H, H_{aro}); 5.11 (br s, 1H, NH).

3.1.5 2-aminophenoxazin-3-one (19)²⁵⁰

This compound was obtained as secondary product of previous reaction.

Aspect: Brown solid. **Yield:** 447 mg (23%)

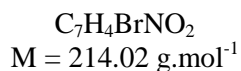
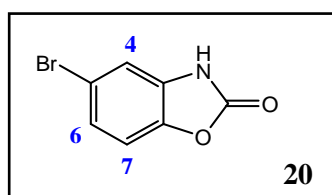
TLC (CycloHex:EtOAc, 7:3, v/v): R_f = 0.3

Melting point: 255°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 213.0; Found: 213.0.

¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 7.74-7.70 (m, 1H, H_{aro}); 7.56-7.38 (m, 3H, H_{aro}); 6.85 (br s, 2H, NH₂); 6.36 (s, 1H, H_{aro}); 6.35 (s, 1H, H_{aro}).

3.1.6 5-bromobenzoxazolin-2-one (20)



A 150 mg (0.80 mmol) amount of 2-amino-4-bromophenol **15** was dissolved in 5 mL of dimethylformamide. After addition of triphosgene (0.96 mmol, 284 mg) and potassium carbonate (1.60 mmol, 221 mg), the resulting mixture was heated at 70°C for 12 hours. Then, the solvent was removed under reduced pressure and 15 mL of water was added to the residue. The product was extracted with 3 x 30 mL of ethyl acetate.

The combined organic fractions were dried over anhydrous sodium sulphate. After evaporation, purification by column chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 1:1 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH₃)) was performed.

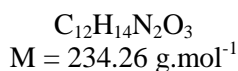
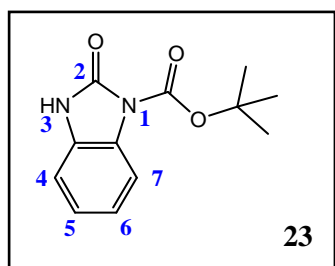
Aspect: Orange solid. **Yield:** 134 mg (80%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.4

Melting point: 146°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 213.95; 215.95; Found: 214.85; 215.88.

¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 8.29 (br s, 1H, NH); 7.50 (d, ⁴J₄₋₆ = 2 Hz, 1H, H₄); 7.22 (dd, ³J₆₋₇ = 9 Hz, ⁴J₆₋₄ = 2 Hz, 1H, H₆); 6.89 (d, ³J₇₋₆ = 9 Hz, 1H, H₇).

3.1.7 *Tert-butyl-2-oxo-2,3dihydrobenzimidazole-1-carboxylate (23)*²⁵³

The reaction was performed under nitrogen atmosphere. A 1.00 g (7.5 mmol) amount of benzimidazolone was dissolved in 40 mL of DMF. After addition of sodium hydride (8.2 mmol, 328 mg), the resulting mixture was stirred at room temperature for one hour. Then, a 1.64 g (7.5 mmol) amount of di-*tert*-butyl dicarbonate was added to the reacting mixture. The reacting mixture was stirred at room temperature for 24 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was hydrolysed with 30 mL of saturated solution of NH_4Cl . The product was extracted with 3 x 30 mL ethyl acetate. The combined organic fractions were washed with water and dried over magnesium sulfate. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was collected as brown oil. Purification by column chromatography (DCM: MeOH(NH_3), 97:3, v/v) was performed.

Aspect: Pale yellow solid. **Yield:** 1.48 g (84%)

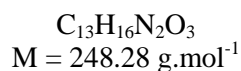
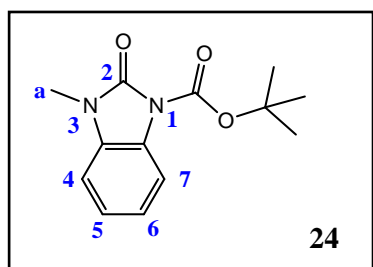
TLC (PE:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.7

Melting point: > 250°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 235.1; Found: 235.0; 178.0 [M – *tert*But + H]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 9.94 (br s, 1H, NH); 7.78-7.09 (m, 4H, H_{aro}); 1.72 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 153.2 (CO); 148.6 (CO); 127.7 (C_{aro}); 126.9 (C_{aro}); 124.2 (C_{aro}); 122.2 (C_{aro}); 114.6 (C_{aro}); 109.9 (C_{aro}); 85.1 (C(CH₃)₃); 28.1 (C(CH₃)₃).

3.1.8 *Tert-butyl-3-methyl-2-oxo-benzimidazole-1-carboxylate (24)*

The reaction was performed under nitrogen atmosphere. A 200 mg (0.86 mmol) amount of *tert*-butyl 2-oxo-benzimidazole-1-carboxylate **23** and 103 mg (4.3 mmol) of sodium hydride were dissolved in 15 mL of THF. The solution was cooled to 0°C with an ice bath. A 266 μL (4.3 mmol) of iodomethane was added and the resulting mixture was stirred at room temperature for 24 hours. Then the reaction was quenched with 20ml of water and the product extracted with 3 x 20 mL of DCM. The combined organic fractions were washed with water and dried over magnesium sulfate. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was collected as brown oil. Purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH_3), 97:3, v/v) was performed.

Aspect: Pale green solid. **Yield:** 102 mg (48%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.8

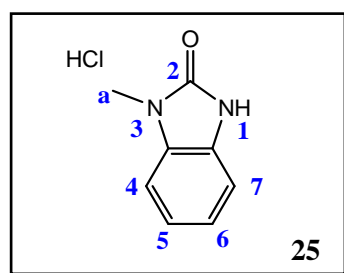
Melting point: > 250°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 249.1; Found: 249.0; 193.0 [M – tertBut + H]

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.86-6.92 (m, 4H, H_{aro}); 3.38 (s, 3H, H_a); 1.68 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 151.3 (CO); 148.9 (CO); 130.1 (C_{aro}); 126.2 (C_{aro}); 123.9 (C_{aro}); 122.2 (C_{aro}); 114.4 (C_{aro}); 107.4 (C_{aro}); 84.6 (C(CH₃)₃); 28.1 (C(CH₃)₃); 27.0 (C_a).

3.1.9 3-methylbenzimidazol-2-one hydrochloride (25)



C₈H₈N₂O.HCl
M = 184.62 g.mol⁻¹

A 286 mg (1.15 mmol) amount of tert-butyl 3-methyl-2-oxo-benzimidazole-1-carboxylate **24** was dissolved in a mixture of 1,4-dioxane:HCl_{gas} (3M, 11.5 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 48 hours. Then the solvent was evaporated under reduced pressure and the product was collected as pale yellow oil.

Aspect: Pale yellow oil. **Yield:** 212 mg (quant)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 97:3, v/v): R_f = 0.2

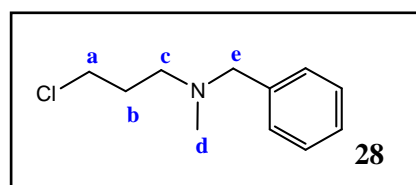
LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H] free base: 149.0; Found: 149.0

¹H NMR (300MHz, MeOD), δ(ppm): 7.19-7.02 (m, 4H, H_{aro}); 3.37 (s, 3H, H_a).

¹³C NMR (75MHz, MeOD), δ(ppm): 151.5 (CO); 130.8 (C_{aro}); 128.0 (C_{aro}); 121.4 (C_{aro}); 121.1 (C_{aro}); 108.9 (C_{aro}); 107.6 (C_{aro}); 25.6 (C_a).

3.2 Benzylmethylamine derivatives

3.2.1 N-benzyl-3-chloro-N-methylpropan-1-amine (28)²⁷⁹



C₁₁H₁₆ClN
M = 197.71 g.mol⁻¹

A 2.00 g (16.9 mmol) amount of N-methylbenzylamine was dissolved in 50 mL DMF. After addition of potassium carbonate (4.56 g, 33 mmol), the resulting mixture was heated at 70°C. After 30 minutes, the solution was allowed to cool to room temperature. A 4.9 mL (49.5 mmol) amount of 1-bromo-3-chloropropane was added and the reacting mixture was stirred at room temperature for 24 hours. Then the excess potassium carbonate was filtered off and the solvent removed under reduced pressure. Purification by column chromatography (DCM) was performed and enabled collection of the product as a colourless oil.

Aspect: Colourless oil. **Yield:** 3.17g (95%)

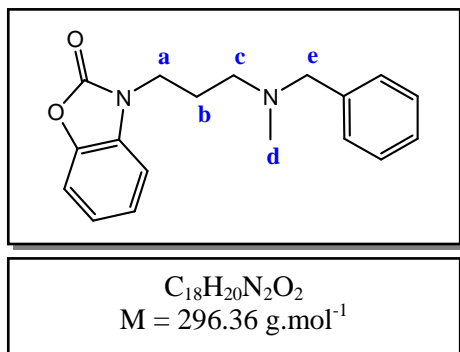
TLC (DCM:MeOH(NH₃), 99:1, v/v): R_f = 0.4

²⁷⁹ R. J. Altenbach *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 7869-7873

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 198.09; 200.09; Found: 198.01; 199.96

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.40-7.22 (m, 5H, H_{aro}); 3.65 (t, ³J = 7Hz, 2H, H_a); 3.52 (s, 2H, H_e); 2.55 (t, ³J = 7Hz, 2H, H_c); 2.21 (s, 3H, H_d); 1.98 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

3.2.2 3-[3-(N-benzyl-N-methylamino)propyl]benzoxazolin-2-one (29)



Procedure A (DMF):

A 200 mg (1.48 mmol) amount of benzoxazolinone, 415 mg (1.77 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 613 mg (4.44 mmol) of potassium carbonate and 15 mL of DMF were used. After 24 hours of reaction, purification by column chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 3:2 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: yellowish oil. **Yield:** 346 mg (79%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 297.1; Found: 297.0

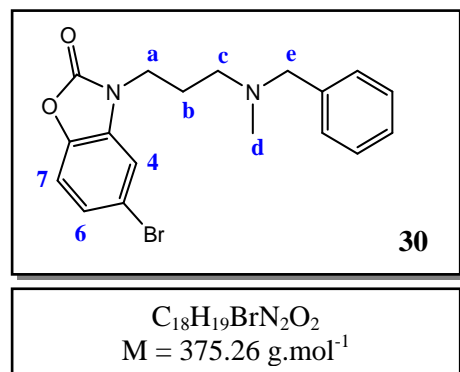
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 9.6 min; P_{HPLC} > 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 17.1 min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.40-7.25 (m, 5H, H_{aro}); 7.23-6.98 (m, 4H, H_{aro}); 3.93 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.51 (s, 2H, H_e); 2.50 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.22 (s, 3H, H_d); 2.00 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 154.6 (CO); 142.7 (C_{aro}); 138.9 (C_{aro}); 131.4 (C_{aro}); 129.0 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 123.8 (C_{aro}); 122.2 (C_{aro}); 110.0 (C_{aro}); 108.4 (C_{aro}); 62.3 (C_e); 54.2 (C_c); 42.1 (C_d); 40.3 (C_a); 25.6 (C_b).

3.2.3 3-[3-(N-benzyl-N-methylamino)propyl]-5-bromobenzoxazolin-2-one (30)



Procedure A (DMF):

A 150 mg (0.70 mmol) amount of 5-bromobenzoxazolinone **20**, 200 mg (0.84 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 290 mg (2.10 mmol) of potassium carbonate and 15 mL of DMF were used. After 48 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 1:1 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: Brown oil. **Yield:** 150 mg (57%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 375.1; 377.1; Found: 375.2; 377.2.

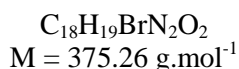
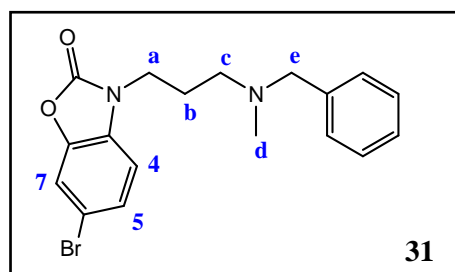
HPLC (C₄, 35 min): *t_R* = 13.9 min; P_{HPLC} = 96%

HPLC (C₁₈, 35 min): *t_R* = 17.5 min; P_{HPLC} = 98%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.35-7.19 (m, 6H, H_{aro} and H₄); 7.16 (dd, ³J₆₋₇ = 9 Hz, ⁴J₆₋₄ = 2 Hz, 1H, H₆); 6.76 (d, ³J₇₋₆ = 9 Hz, 1H, H₇); 4.08 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.55 (s, 2H, H_c); 2.57 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.29 (s, 3H, H_d); 1.96 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 153.9 (CO); 146.3 (C_{aro}); 138.9 (C_{aro}); 131.7 (C_{aro}); 129.2 (2 C_{aro}); 128.2 (2 C_{aro}); 127.4 (C_{aro}); 126.7 (C_{aro}); 114.2 (C_{aro}); 113.6 (C_{aro}); 112.2 (C_{aro}); 62.4 (C_e); 53.6 (C_c); 42.4 (C_d); 42.0 (C_a); 26.8 (C_b).

3.2.4 3-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-6-bromobenzoxazolin-2-one (31)



Procedure A (DMF):

A 300 mg (1.40 mmol) amount of 6-bromobenzoxazolinone, 401 mg (1.68 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 580 mg (4.20 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of DMF were used. After 24 hours of reaction, purification by column chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 1:1 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: Yellow oil. **Yield:** 500 mg (95%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.5

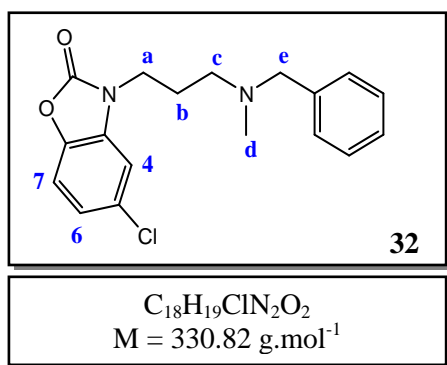
LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 375.1; 377.1; Found: 375.1; 377.0

HPLC (C₄, 35 min): *t_R* = 20.5 min; P_{HPLC} = 96%

HPLC (C₁₈, 35 min): *t_R* = 20.2 min; P_{HPLC} = 96%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.37-7.17 (m, 7H, H₅, H₇ and H_{aro}); 6.88 (d, ³J₄₋₅ = 8 Hz, 1H, H₄); 3.89 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.48 (s, 2H, H_c); 2.45 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.19 (s, 3H, H_d); 1.96 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 154.0 (CO); 143.1 (C_{aro}); 138.9 (C_{aro}); 130.6 (C_{aro}); 128.9 (C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 127.1 (2 C_{aro}); 126.7 (C_{aro}); 114.4 (C_{aro}); 113.5 (C_{aro}); 109.4 (C_{aro}); 62.4 (C_e); 54.1 (C_c); 42.1 (C_d); 40.5 (C_a); 25.6 (C_b).

3.2.5 3-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-5-chlorobenzoxazin-2-one (32)

Procedure A (DMF):

A 300 mg (1.8 mmol) amount of chloroxazone, 490 mg (2.10 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 730 mg (5.31 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of DMF were used. After 72 hours of reaction, purification by column chromatography (petroleum ether: ethyl acetate, 7:3 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: Colourless oil. **Yield:** 130 mg (23%)

TLC (PE:EtOAc, 7:3, v/v): R_f = 0.3

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 331.12; 333.12; Found: 330.94; 331.97

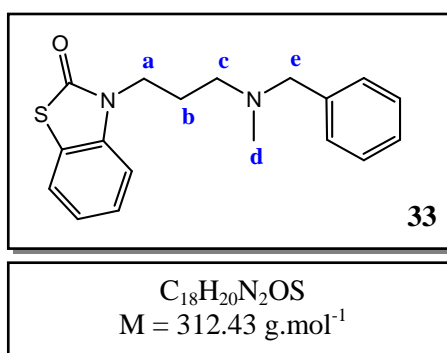
HRMS (C₁₈H₁₉ClN₂O₂): Calc. for [M+H]: 331.1208; 333.1153. Found: 331.1196; 33.1165

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 21.0 min; P_{HPLC} > 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 19.5 min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.37-7.20 (m, 5H, H_{aro}); 7.17-6.98 (m, 3H, H_{aro}); 3.88 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.50 (s, 2H, H_e); 2.47 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.20 (s, 3H, H_d); 1.97 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 154.4 (CO); 141.1 (C_{aro}); 138.7 (C_{aro}); 132.4 (C_{aro}); 129.3 (C_{aro}); 129.0 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 122.1 (C_{aro}); 110.8 (C_{aro}); 109.0 (C_{aro}); 62.4 (C_e); 54.0 (C_c); 42.0 (C_d); 40.5 (C_a); 25.5 (C_b).

3.2.6 3-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]benzothiazolin-2-one (33)

Procedure A (DMF) :

A 200 mg (1.32 mmol) amount of benzothiazolinone, 400 mg (1.60 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 550 mg (3.98 mmol) of potassium carbonate and 15 mL of DMF were used. After 48 hours of reaction, purification by column chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 3:2 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: yellowish oil. **Yield:** 223 mg (54%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.7

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 313.1; Found: 313.0

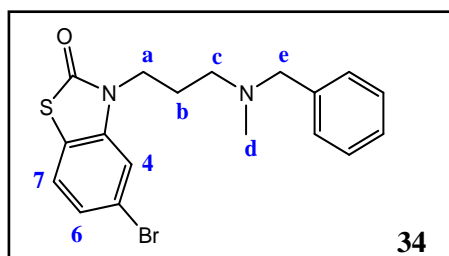
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 10.3 min; P_{HPLC} = 98%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 18.3 min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.46-7.10 (m, 9H, H_{aro}); 4.03 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.51 (s, 2H, H_e); 2.49 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.32 (s, 3H, H_d); 1.95 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 169.9 (CO); 139.0 (C_{aro}); 137.3 (C_{aro}); 128.9 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 126.3 (C_{aro}); 123.0 (C_{aro}); 122.8 (C_{aro}); 122.6 (C_{aro}); 110.7 (C_{aro}); 62.4 (C_{e}); 54.4 (C_{c}); 42.1 (C_{d}); 41.0 (C_{a}); 25.6 (C_{b}).

3.2.7 3-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-5-bromobenzothiazolin-2-one (34)



$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{OS}$
 $M = 391.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Procedure A (DMF):

A 300 mg (1.30 mmol) amount of 5-bromobenzothiazolinone, 375 mg (1.56 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 540 mg (3.90 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of DMF were used. After 48 hours of reaction, purification by column chromatography (petroleum ether: ethyl acetate, 8:2 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH_3)) was performed.

Aspect: Yellowish oil. **Yield:** 450 mg (88%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): $R_f = 0.6$

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 391.0; 393.0; Found: 391.1; 393.1

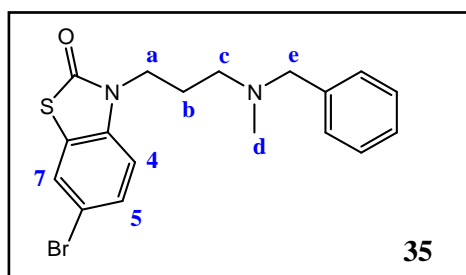
HPLC (C₄, 35 min): $t_R = 17.6$ min; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

HPLC (C₁₈, 35 min): $t_R = 20.7$ min; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

^1H NMR (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 7.41-7.20 (m, 8H, H_{aro}); 4.00 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_{a}); 3.53 (s, 2H, H_{e}); 2.48 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_{c}); 2.22 (s, 3H, H_{d}); 1.94 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_{b}).

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 169.5 (CO); 138.8 (C_{aro}); 138.5 (C_{aro}); 129.0 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 125.9 (C_{aro}); 123.7 (C_{aro}); 121.6 (C_{aro}); 119.8 (C_{aro}); 113.9 (C_{aro}); 62.3 (C_{e}); 54.1 (C_{c}); 42.1 (C_{d}); 41.2 (C_{a}); 25.5 (C_{b}).

3.2.8 3-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-6-bromobenzothiazolin-2-one (35)



$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{OS}$
 $M = 391.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Procedure A (DMF):

A 300 mg (1.30 mmol) amount of 6-bromobenzothiazolinone, 375 mg (1.56 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 540 mg (3.90 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of DMF were used. After 48 hours of reaction, purification by column chromatography (petroleum ether: ethyl acetate, 8:2 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH_3)) was performed.

Aspect: Yellow oil. **Yield:** 440 mg (86%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): $R_f = 0.7$

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 391.0; 393.0. Found: 391.2; 393.2

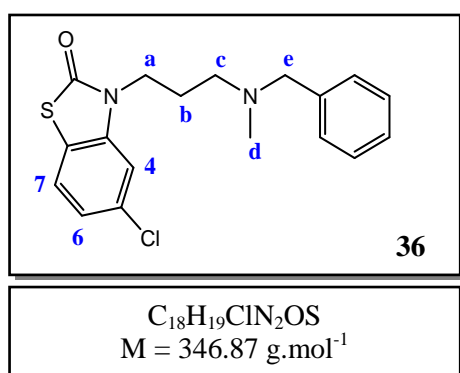
HPLC (C_4 , 35 min): $t_R = 21.6$ min; $P_{\text{HPLC}} = 97\%$

HPLC (C_{18} , 35 min): $t_R = 21.0$ min; $P_{\text{HPLC}} = 97\%$

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 7.54 (d, $^4J = 2\text{ Hz}$, 1H, H_7); 7.39 (dd, $^3J = 8\text{ Hz}$, $^4J = 2\text{ Hz}$, 1H, H_5); 7.37-7.24 (m, 5H, H_{aro}); 7.00 (d, $^3J = 8\text{ Hz}$, 1H, H_4); 4.00 (t, $^3J = 7\text{ Hz}$, 2H, H_a); 3.50 (s, 2H, H_c); 2.47 (t, $^3J = 7\text{ Hz}$, 2H, H_c); 2.21 (s, 3H, H_d); 1.94 (p, $^3J = 7\text{ Hz}$, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 169.1 (CO); 139.0 (C_{aro}); 136.3 (C_{aro}); 129.3 (C_{aro}); 128.9 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.0 (C_{aro}); 125.1 (C_7); 124.6 (C_{aro}); 115.3 (C_{aro}); 111.9 (C_4); 62.4 (C_e); 54.3 (C_c); 42.1 (C_d); 41.1 (C_a); 25.5 (C_b).

3.2.9 3-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-5-chlorobenzothiazolin-2-one (36)



Procedure A (DMF):

A 300 mg (1.60 mmol) amount of 5-chlorobenzothiazolinone, 460 mg (1.94 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 670 mg (4.80 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of DMF were used. After 48 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 1:1 (v/v) + 0.1 % $\text{MeOH}(\text{NH}_3)$) was performed.

Aspect: Yellow oil. **Yield:** 510 mg (91%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): $R_f = 0.6$

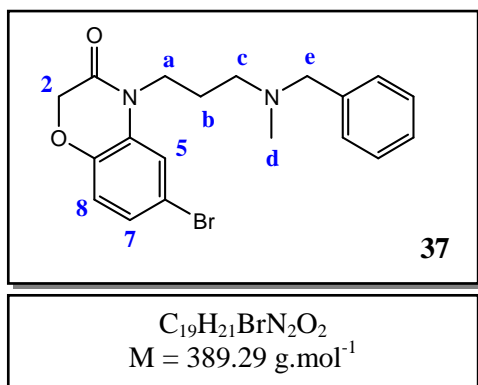
LCMS (ESI⁺): Calc. for $[\text{M}+\text{H}]$: 347.1; 349.1; Found: 347.2; 349.2

HPLC (C_4 , 35 min): $t_R = 21.0$ min; $P_{\text{HPLC}} = 96\%$

HPLC (C_{18} , 35 min): $t_R = 20.7$ min; $P_{\text{HPLC}} = 97\%$

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 7.38-7.22 (m, 6H, H_7 and H_{aro}); 7.19 (d, $^4J_{4-6} = 2\text{ Hz}$, 1H, H_4); 7.12 (dd, $^3J_{6-7} = 8\text{ Hz}$, $^4J_{6-4} = 2\text{ Hz}$, 1H, H_6); 3.99 (t, $^3J = 7\text{ Hz}$, 2H, H_a); 3.52 (s, 2H, H_c); 2.48 (t, $^3J = 7\text{ Hz}$, 2H, H_c); 2.22 (s, 3H, H_d); 1.93 (p, $^3J = 7\text{ Hz}$, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 169.8 (CO); 138.7 (C_{aro}); 138.3 (C_{aro}); 132.4 (C_{aro}); 129.0 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 123.4 (C_{aro}); 123.1 (C_{aro}); 121.0 (C_{aro}); 111.2 (C_{aro}); 62.2 (C_e); 54.1 (C_c); 42.1 (C_d); 41.2 (C_a); 25.5 (C_b).

3.2.10 4-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-6-bromobenzoxazin-3-one (37)

Procedure A (DMF):

A 50 mg (0.22 mmol) amount of 6-bromobenzoxazin-3-one **16**, 62 mg (0.26 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 121 mg (0.88 mmol) of potassium carbonate and 6 mL of DMF were used. After 72 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (cyclohexane:ethyl acetate, 1:1 (v/v) + 0.1% MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 65 mg (62%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.5

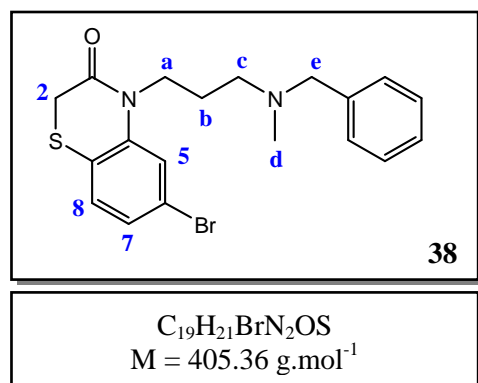
LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 389.0; 391.0; Found: 388.8; 390.8

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 11.3 min; P_{HPLC} = 98%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 20.2 min; P_{HPLC} = 97%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.39-7.23 (m, 6H, H₅ and H_{aro}); 7.13 (dd, ³J₇₋₈ = 8 Hz, ³J₇₋₅ = 2 Hz, 1H, H₇); 6.86 (d, ³J₈₋₇ = 8 Hz, 1H, H₈); 4.58 (s, 2H, H₂); 3.95(t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.59 (s, 2H, H_e); 2.52 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.28 (s, 3H, H_d); 1.89 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 163.9 (CO); 144.4 (C_{aro}); 137.9 (C_{aro}); 130.0 (C_{aro}); 129.2 (2 C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 127.3 (C_{aro}); 126.4 (C₇); 118.5 (C_{aro}); 118.0 (C₈); 115.1 (C_{aro}); 67.5 (C₂); 62.1 (C_e); 54.1 (C_c); 42.0 (C_d); 39.6 (C_a); 24.6 (C_b).

3.2.11 4-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-6-bromobenzothiazin-3-one (38)

Procedure A (DMF):

A 300 mg (1.22 mmol) amount of 6-bromobenzothiazinone, 375 mg (1.47 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 510 mg (4.68 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of DMF were used. After 48 hours of reaction, purification by column chromatography (petroleum ether: ethyl acetate, 8:2 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: Yellow oil. **Yield:** 220 mg (47%)

TLC (PE:EtOAc, 7:3, v/v): R_f = 0.5

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 405.05; 407.05. Found: 404.92; 406.91

HRMS (C₁₉H₂₁BrN₂OS): Calc. for [M+H]: 405.0631; 407.0537. Found: 405.0623; 407.0598

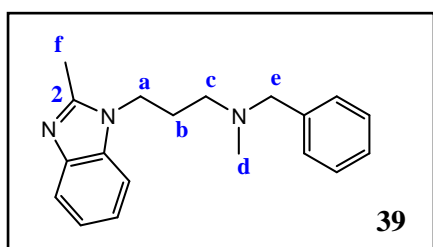
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 22.0 min; P_{HPLC} = 98%

HPLC (C_{18} , 35 min): $t_R = 12.7$ min; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

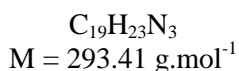
$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 7.44 (d, $^4J_{5-7} = 2$ Hz, 1H, H_5); 7.36-7.10 (m, 7H, H_7 , H_8 and H_{aro}); 4.03 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_a); 3.50 (s, 2H, H_2); 3.36 (s, 2H, H_e); 2.44 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_c); 2.21 (s, 3H, H_d); 1.86 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 164.7 (CO); 140.7 (C_{aro}); 139.0 (C_{aro}); 129.5 (C_{aro}); 129.0 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.0 (C_{aro}); 126.2 (C_{aro}); 122.9 (C_{aro}); 121.0 (C_{aro}); 120.6 (C_{aro}); 62.3 (C_e); 54.2 (C_c); 43.4 (C_d); 42.2 (C_a); 31.4 (C_2); 25.2 (C_b).

3.2.12 1-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-2-methylbenzimidazole (39)



39



Procedure A (DMF):

A 200 mg (1.51 mmol) amount of 2-methylbenzimidazole, 424 mg (1.82 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 834 mg (6.04 mmol) of potassium carbonate and 15 mL of DMF were used. After 24 hours of reaction, purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH_3), 97:3 (v/v)) was performed.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 283 mg (64%)

TLC (DCM:MeOH(NH_3), 9:1, v/v): $R_f = 0.5$

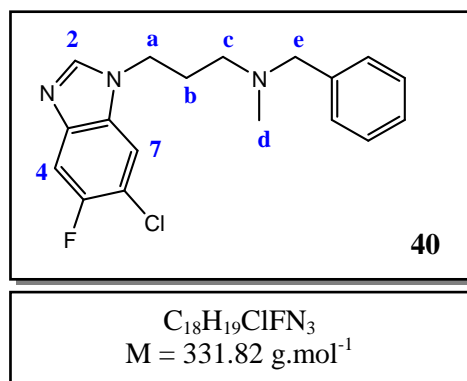
LCMS (ESI⁺): Calc. for $[\text{M}+\text{H}]$: 294.2; Found: 294.1

HPLC (C_4 , 35 min): $t_R = 15.3$ min; $P_{\text{HPLC}} > 99\%$

HPLC (C_{18} , 35 min): $t_R = 12.3$ min; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$.

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 7.70 (m, 1H, H_{aro}); 7.38-7.18 (m, 8H, H_{aro}); 4.19 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_a); 3.51 (s, 2H, H_e); 2.62 (s, 3H, H_f); 2.42 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_c); 2.21 (s, 3H, H_d); 1.98 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 151.6 (C_2); 142.7 (C_{aro}); 138.8 (C_{aro}); 135.1 (C_{aro}); 128.9 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 121.9 (C_{aro}); 121.7 (C_{aro}); 119.0 (C_{aro}); 109.2 (C_{aro}); 62.3 (C_e); 54.0 (C_c); 42.1 (C_d); 41.5 (C_a); 27.4 (C_b); 13.9 (C_f).

3.2.13 1-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-6-chloro-5-fluorobenzimidazole (40)

Procedure A (DMF):

A 300 mg (1.75 mmol) amount of 6-chloro-5-fluorobenzimidazole, 390 mg (2.11 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 725 mg (5.25 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of DMF were used. After 72 hours of reaction, purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 99:1, v/v) was performed. A mixture of 2 positional isomers (50:50) which

can't be separated was collected.

Aspect: orange oil. **Yield:** 350 mg (65%, mixture 50:50)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 99:1, v/v): R_f = 0.6

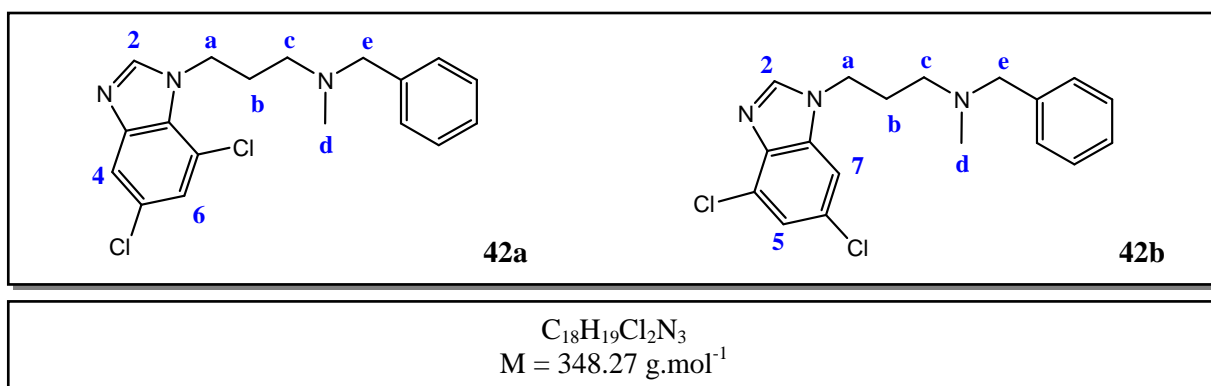
LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 332.12; 333.12; 334.12; Found: 331.95; 332.95; 333.95

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 16.8 min; P_{HPLC} = 98% (mixture 50:50)

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 15.5 min; P_{HPLC} = 98% (mixture 50:50)

¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆, mixture isomers A and B), δ(ppm): 8.26 (s, 0,5H, H_{2A}); 8.24 (s, 0,5H, H_{2B}); 7.94 (d, *J* = 7 Hz, 0,5H, H_{7A}); 7.85 (d, *J* = 7 Hz, 0,5H, H_{7B}); 7.78 (d, ³*J*_{4-F} = 9 Hz, 0,5H, H_{4A}); 7.67 (d, ³*J*_{4-F} = 9 Hz, 0,5H, H_{4B}); 7.35-7.20 (m, 5H, H_{aro}); 4.27 (q, ³*J* = 7 Hz, 2H, H_a); 3.41 (s, 2H, H_c); 2.28 (t, ³*J* = 7 Hz, 2H H_c); 2.15 (s, 3H, H_d); 1.97 (p, ³*J* = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, DMSO-*d*₆, mixture isomers A and B), δ(ppm): 162.8 (C_{aro}); 146.9 (C_{2A}); 146.6 (C_{2B}); 142.8 (C_{aroB}); 142.6 (C_{aroA}); 140.4 (C_{aro}); 139.3 (C_{aro}); 131.2 (C_{aro}); 129.2 (2 C_{aro}); 128.5 (2 C_{aro}); 127.3 (C_{aro}); 120.6 (C_{7B}); 112.2 (C_{7A}); 106.6 (C_{4B}); 99.3 (C_{4A}); 61.9 (C_c); 54.0 (C_c); 42.9 (C_d); 42.1 (C_a); 27.4 (C_b).

3.2.14 1-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-5,7-dichlorobenzimidazole (42a)

Procedure A (DMF):

A 200 mg (0.89 mmol) amount of 5,7-dichlorobenzimidazole hydrochloride, 248 mg (1.07 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 492 mg (3.56 mmol) of potassium

carbonate and 15 mL of DMF were used. After 24 hours of reaction, purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 97:3 (v/v)) was performed. A mixture of 2 positional isomers (1:2) **42a** and **42b** which can't be separated was collected.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 263 mg (85%, mixture 1:2, 42a/42b)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.6

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 348.1; 350.1; Found: 348.2; 350.2

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 16.5 min; P_{HPLC} = 99% (**42a** + **42b**)

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 18.1 min, P_{HPLC} = 35% (**42a**); t_R = 18.46 min, P_{HPLC} = 65% (**42b**)

NMR analysis were done on the mixture 1:2 of 42a and 42b

Compound 42a

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.69 (s, 1H, H₂); 7.67 (d, ⁴J₄₋₆ = 1.8 Hz, 1H, H₄); 7.34-7.32 (m, 5H, H_{aro}); 7.24 (d, ⁴J₆₋₄ = 1.8 Hz, 1H, H₆); 4.45 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.50 (s, 2H, H_c); 2.36 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.22 (s, 3H, H_d); 2.05 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

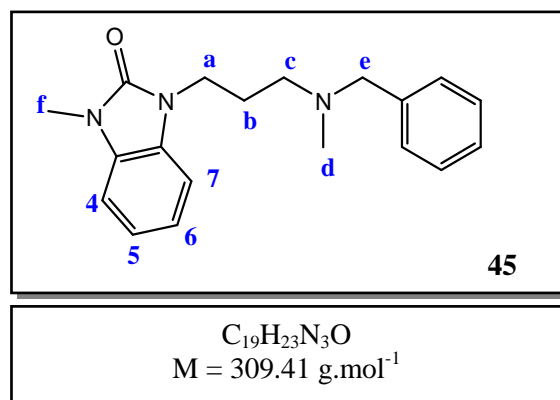
¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 146.5 (C₂); 138.5 (C_{aro}); 129.1 (C_{aro}); 128.8 (C_{aro}); 128.4 (C_{aro}); 127.7 (C_{aro}); 127.3 (C_{aro}); 125.6 (C_{aro}); 124.2 (C_{aro}); 119.0 (C_{aro}); 116.6 (C_{aro}); 62.3 (C_e); 53.1 (C_e); 44.3 (C_d); 42.1 (C_a); 29.2 (C_b).

Compound 42b

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.78 (s, 1H, H₂); 7.36-7.30 (m, 7H, H_{aro}); 4.22 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.48 (s, 2H, H_c); 2.34 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.21 (s, 3H, H_d); 1.99 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 144.5 (C₂); 139.87 (C_{aro}); 135.0 (C_{aro}); 129.0 (C_{aro}); 128.6 (C_{aro}); 128.42 (C_{aro}); 127.2 (C_{aro}); 127.3 (C_{aro}); 122.4 (C_{aro}); 119.04 (C_{aro}); 108.8 (C_{aro}); 62.4 (C_e); 53.2 (C_e); 42.8 (C_d); 42.1 (C_a); 27.2 (C_b).

3.2.15 1-[3-(N-benzyl-N-methylamino)propyl]-3-methylbenzimidazol-2-one (**45**)



Procedure A (DMF):

A 150 mg (0.81 mmol) amount of 3-methylbenzimidazol-2-one hydrochloride **25**, 244 mg (0.97 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 450 mg (3.24 mmol) of potassium carbonate and 5 mL of DMF were used. After 24 hours of reaction, purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 97:3 (v/v)) was performed.

Aspect: pale green oil. **Yield:** 54 mg (22%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 98:2, v/v): R_f = 0.2

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 310.2; Found: 310.1

HPLC (C₄, 35 min): $t_R = 9.7$ min; P_{HPLC} > 99%

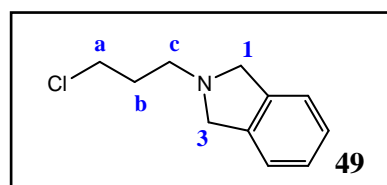
HPLC (C₁₈, 35 min): $t_R = 16.8$ min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.36-6.95 (m, 9H, H_{aro}); 3.97 (t, ³J = 7Hz, 2H, H_a); 3.43 (s, 2H, H_c); 3.53 (s, 3H, H_f); 2.51 (t, ³J = 7Hz, 2H, H_c); 2.22 (s, 3H, H_d); 1.99 (p, ³J = 7Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ (ppm): 154.4 (CO); 130.1 (C_{aro}); 129.5 (C_{aro}); 129.1 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 121.2 (C_{aro}); 121.0 (2 C_{aro}); 107.6 (C_{aro}); 107.4 (C_{aro}); 62.2 (C_e); 54.5 (C_e); 42.0 (C_d); 39.2 (C_a); 27.1 (C_f); 26.2(C_b).

3.3 Isoindoline derivatives

3.3.1 2-(3-chloropropyl)isoindoline (49)



C₁₁H₁₄ClN
M = 195.69 g.mol⁻¹

A 1.00 g (8.39 mmol) amount of isoindoline was dissolved in 25 mL of acetonitrile. After addition of potassium carbonate (16.78 mmol, 2.32 g), the resulting mixture was heated at 70°C. After 30 minutes, the solution was allowed to cool to room temperature. A 4.17 mL (47.18 mmol) amount of 1-bromo-3-chloropropane was added and the reacting mixture was stirred at room temperature for 24 hours. The solvent was removed under reduced pressure and 60 mL water added to the residue. The product was extracted with 3 x 30 mL of dichloromethane. The combined organic fractions were washed with water and dried over sodium sulphate. The solvent was evaporated under reduced pressure. Purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 99:1 (v/v)) was performed and enabled to collect the product as a brown liquid.

Aspect: brown liquid. **Yield:** 1.27 g (77%)

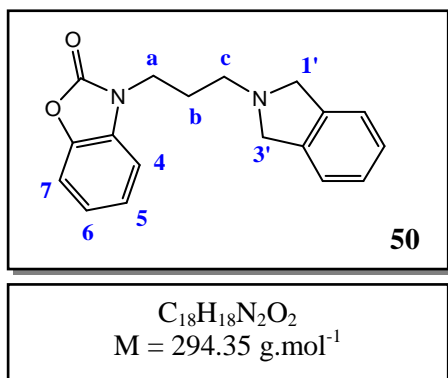
TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.7

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 196.05; 198.07; Found: 195.95; 197.91

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.21 (s, 4H, H_{iso}); 3.95 (s, 4H, H₁ and H₃); 3.69 (t, ³J = 7Hz, 2H, H_a); 2.90 (t, ³J = 7Hz, 2H, H_c); 2.07 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ (ppm): 140.0 (2 C_{aro}); 126.7 (2 C_{aro}); 122.3 (2 C_{aro}); 59.1 (C₁ and C₃); 53.0 (C_c); 43.1 (C_a); 31.9 (C_b).

3.3.2 3-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]benzoxazolin-2-one (50)



Procedure A (DMF):

A 100 mg (0.74 mmol) amount of benzoxazolinone, 206 mg (0.88 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 306 mg (2.22 mmol) of potassium carbonate and 7 mL of DMF were used. After 24 hours of reaction, purification by column chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 3:2 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: beige solid. **Yield:** 153 mg (70%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.4

Melting point: 109°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 295.1; Found: 295.2

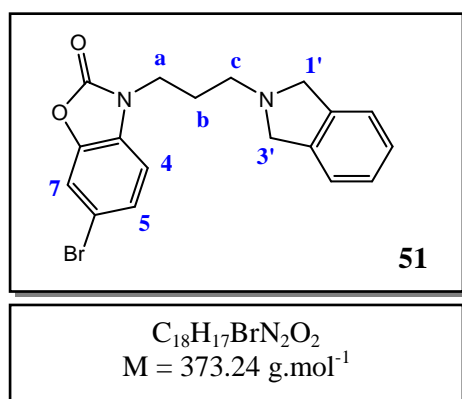
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 9.6 min; P_{HPLC} > 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 16.5 min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.19 (s, 4H, H_{iso}); 7.18-7.08 (m, 4H, H_{aro}); 4.00 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.96 (s, 4H, H_{1'} and H_{3'}); 2.82 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.09 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 154.6 (CO); 142.7 (C_{aro}); 139.5 (2 C_{aro}); 131.5 (C_{aro}); 126.9 (2 C_{aro}); 123.8 (C_{aro}); 122.3 (3 C_{aro}); 110.0 (C_{aro}); 108.5 (C_{aro}); 58.9 (C_{1'} and C_{3'}); 52.5 (C_c); 40.0 (C_a); 27.0 (C_b).

3.3.3 6-bromo-3-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]benzoxazolin-2-one (51)



Procedure A (DMF):

A 300 mg (1.40 mmol) amount of 6-bromobenzoxazolinone, 390 mg (1.68 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 582 mg (4.20 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of DMF were used. After 24 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 3:2 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: Brown oil. **Yield:** 340 mg (65%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 3:2, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 373.0; 375.0; Found: 372.9; 374.9

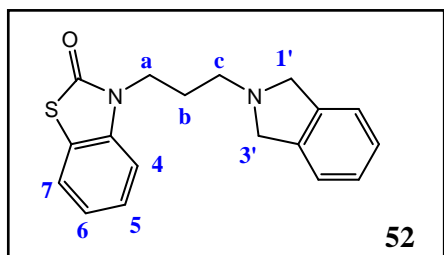
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 12.2 min; P_{HPLC} = 96%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 19.4 min; P_{HPLC} = 96%

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 7.36-7.26 (m, 2H, H_5 and H_7); 7.22 (s, 4H, H_{iso}); 7.00 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H, H_4); 3.98 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_a); 3.91 (s, 4H, $\text{H}_{1'}$ and $\text{H}_{3'}$); 2.77 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_c); 2.05 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 154.1 (CO); 143.0 (C_{aro}); 139.8 (2 C_{aro}); 130.8 (C_{aro}); 126.9 (2 C_{aro}); 126.7 (C_{aro}); 123.7 (C_{aro}); 122.3 (2 C_{aro}); 114.5 (C_{aro}); 113.5 (C_{aro}); 109.6 (C_{aro}); 58.8 ($\text{C}_{1'}$ and $\text{C}_{3'}$); 52.2 (C_c); 40.1 (C_a); 26.9 (C_b).

3.3.4 3-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]benzothiazolin-2-one (52)



$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OS}$
 $M = 310.41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Procedure A (DMF) :

A 150 mg (1.00 mmol) amount of benzothiazolinone, 235 mg (1.2 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 415 mg (3.00 mmol) of potassium carbonate and 5 mL of DMF were used. After 48 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (DCM:MeOH(NH_3), 95:5 (v/v)) was performed.

Aspect: brown oil. **Yield:** 162 mg (53%)

TLC (DCM:MeOH (NH_3), 95:5, v/v): $R_f = 0.4$

LCMS (ESI^+): Calc. for $[\text{M}+\text{H}]$: 311.1; Found: 311.1

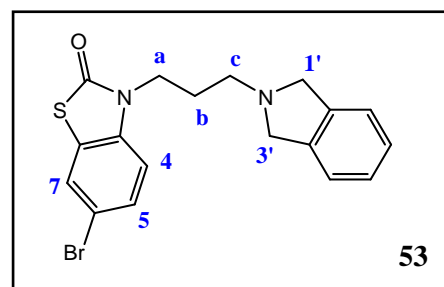
HPLC (C_4 , 35 min): $t_R = 10.5$ min; $P_{\text{HPLC}} = 97\%$

HPLC (C_{18} , 35 min): $t_R = 18.0$ min; $P_{\text{HPLC}} = 97\%$

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 7.36-7.14 (m, 8H, H_{aro}); 4.13 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_a); 3.97 (s, 4H, $\text{H}_{1'}$ and $\text{H}_{3'}$); 2.82 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_c); 2.05 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 170.0 (CO); 139.9 (2 C_{aro}); 137.4 (C_{aro}); 126.8 (2 C_{aro}); 126.3 (C_{aro}); 123.0 (C_{aro}); 122.8 (C_{aro}); 122.6 (C_{aro}); 122.3 (2 C_{aro}); 110.8 (C_{aro}); 59.0 ($\text{C}_{1'}$ and $\text{C}_{3'}$); 52.9 (C_c); 40.8 (C_a); 27.1 (C_b).

3.3.5 6-bromo-3-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]benzothiazolin-2-one (53)



$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{BrN}_2\text{OS}$
 $M = 389.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Procedure A (DMF):

A 300 mg (1.30 mmol) amount of 6-bromobenzothiazolinone, 362 mg (1.56 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 539 mg (3.90 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of DMF were used. After 48 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 3:2 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH_3)) was performed.

Aspect: Colourless oil. **Yield:** 324 mg (64%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 2:3, v/v): R_f = 0.5

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 389.0; 391.0; Found: 389.0; 391.0

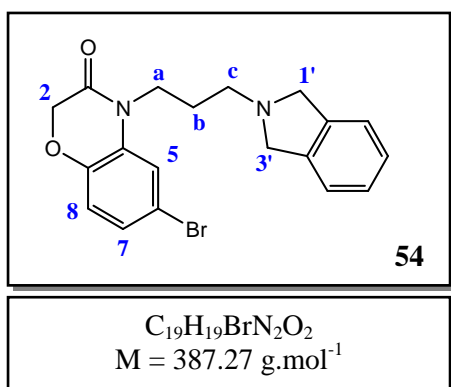
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 13.4 min; P_{HPLC} = 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 20.5 min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.57 (d, ⁴J₇₋₅ = 2 Hz, 1H, H₇); 7.43 (dd, ³J₅₋₄ = 8 Hz, ⁴J₅₋₇ = 2 Hz, 1H, H₅); 7.24 (s, 4H, H_{iso}); 7.14 (d, ³J = 8 Hz, 1H, H₄); 4.10 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.97 (s, 4H, H_{1'} and H_{3'}); 2.80 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.04 (p, ³J = 7 Hz, 2H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 169.4 (CO); 139.6 (2 C_{aro}); 136.5 (C_{aro}); 129.3 (C₅); 126.9 (2 C_{aro}); 125.1 (C₇); 124.5 (C_{aro}); 122.3 (2 C_{aro}); 115.4 (C_{aro}); 112.1 (C₄); 58.9 (C_{1'} and C_{3'}); 52.5 (C_c); 40.9 (C_a); 26.9 (C_b).

3.3.6 6-bromo-4-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]benzoxazin-3-one (54)



Procedure A (DMF):

A 50 mg (0.22 mmol) amount of 6-bromobenzoxazin-3-one **16**, 61 mg (0.26 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 121 mg (0.88 mmol) of potassium carbonate and 6 mL of DMF were used. After 72 hours of reaction, purification by column chromatography (cyclohexane:ethyl acetate, 9:1 (v/v) + 0.1% MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: Yellowish oil. **Yield:** 55 mg (66%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 3:1, v/v): R_f = 0.5

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 387.0; 389.0; Found: 386.9; 388.9

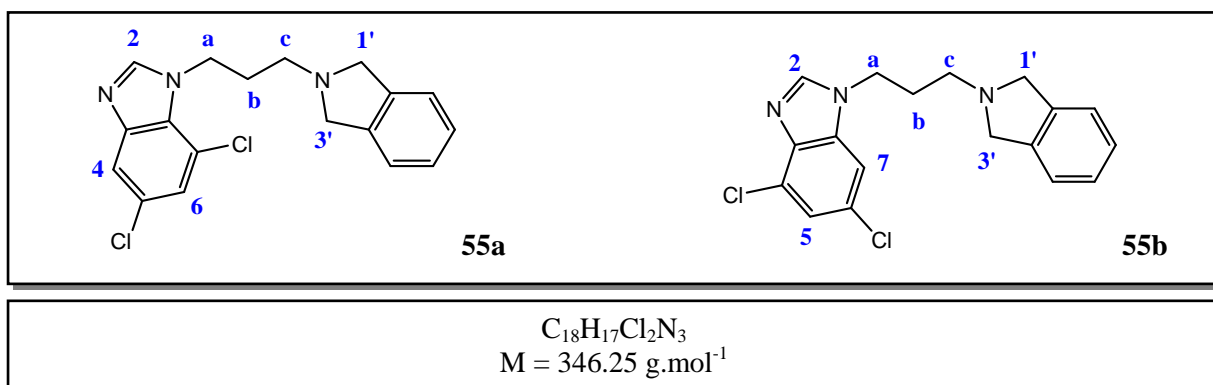
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 11.0 min; P_{HPLC} = 97%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 19.8 min; P_{HPLC} = 97%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.39 (d, ³J₅₋₇ = 2 Hz, 1H, H₅); 7.22 (s, 4H, H_{iso}); 7.10 (dd, ³J₇₋₈ = 8 Hz, ³J₇₋₅ = 2 Hz, 1H, H₇); 6.86 (d, ³J₈₋₇ = 8 Hz, 1H, H₈); 4.60 (s, 2H, H₂); 4.06 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.97 (s, 4H, H_{1'} and H_{3'}); 2.81 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 1.96 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 163.9 (CO); 144.3 (C_{aro}); 139.7 (2 C_{aro}); 130.2 (C_{aro}); 126.8 (2 C_{aro}); 126.4 (C₇); 122.3 (2 C_{aro}); 118.4 (C₈); 118.2 (C₅); 115.1 (C_{aro}); 65.5 (C₂); 59.0 (C_{1'} and C_{3'}); 52.8 (C_c); 39.5 (C_a); 26.3 (C_b).

3.3.7 5,7-dichloro-1-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]benzimidazole (55a)



Procedure A (DMF):

A 200 mg (0.89 mmol) amount of 5,7-dichlorobenzimidazole hydrochloride, 251 mg (1.07 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 492 mg (3.56 mmol) of potassium carbonate and 15 mL of DMF were used. Purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 98:2 (v/v)) was performed. A mixture of 2 positional isomers (1:2) **55a** and **55b** which can't be separated was collected.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 270 mg (87% mixture 1:2, 55a/55b)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.7

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 346.1; 348.1; Found: 346.2; 348.2

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 10.2 min, P_{HPLC} = 98% (**55a** + **55b**)

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 17.7 min, P_{HPLC} = 35% (**55a**); t_R = 18.21 min, P_{HPLC} = 65% (**55b**)

NMR analysis were done on the mixture 1:2 of 55a and 55b

Compound 55a

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.95 (s, 1H, H₂); 7.69 (d, ⁴J₄₋₆ = 1.8 Hz, 1H, H₄); 7.27 (d, ⁴J₄₋₆ = 1.8 Hz, 1H, H₆); 7.23 (s, 4H, H_{iso}); 4.61 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.93 (s, 4H, H_{1'} and H_{3'}); 2.64 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.14 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

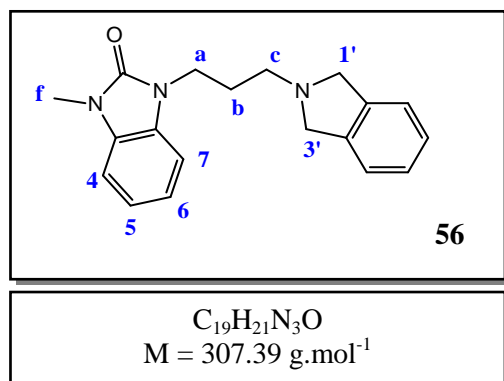
¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 146.9 (C₂); 139.8 (2 C_{aro}); 128.8 (C_{aro}); 127.7 (C_{aro}); 126.9 (2 C_{aro}); 125.6 (C_{aro}); 124.3 (C_{aro}); 122.6 (2 C_{aro}); 119.1 (C₄); 116.6 (C_{aro}); 58.8 (C_{1'} and C_{3'}); 53.4 (C_c); 43.9 (C_a); 30.2 (C_b).

Compound 55b

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.97 (s, 1H, H₂); 7.41 (d, ⁴J₇₋₅ = 1.8 Hz, 1H, H₇); 7.31 (d, ⁴J₅₋₇ = 1.8 Hz, 1H, H₅); 7.24 (s, 4H, H_{iso}); 4.34 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.92 (s, 4H, H_{1'} and H_{3'}); 2.61 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.08 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 144.69 (C₂); 139.8 (2 C_{aro}); 135.1 (C_{aro}); 128.7 (C_{aro}); 127.7 (C_{aro}); 126.9 (2 C_{aro}); 124.3 (C_{aro}); 122.3 (2 C_{aro}); 109.0 (C₇); 58.8 (C_{1'} and C_{3'}); 51.2 (C_c); 42.4 (C_a); 28.4 (C_b).

3.3.8 1-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]-3-methylbenzimidazol-2-one (56)



Procedure A (DMF):

A 125 mg (0.68 mmol) amount of 3-methylbenzimidazol-2-one hydrochloride **25**, 160 mg (0.82 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 376 mg (2.72 mmol) of potassium carbonate and 5 mL of DMF were used. After 72 hours of reaction at 50°C, purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 97:3 (v/v)) was performed.

Aspect: brown oil. **Yield:** 145 mg (69%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 95:5, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 308.2; Found: 308.2

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 10.0 min; P_{HPLC} = 97%

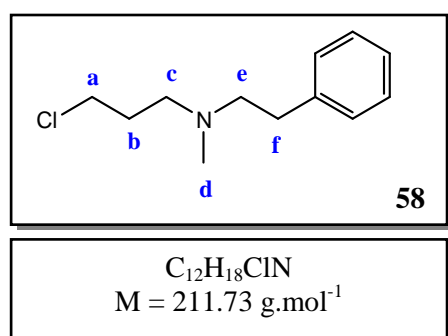
HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 16.5 min; P_{HPLC} = 98%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.14-6.96 (m, 8H, H_{aro}); 4.05 (t, ³J = 7Hz, 2H, H_a); 3.96 (s, 4H, H_{1'} and H_{3'}); 3.43 (s, 3H, H_f); 2.81 (t, ³J = 7Hz, 2H, H_c); 2.06 (p, ³J = 7Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 154.5 (CO); 139.8 (2 C_{aro}); 130.0 (C_{aro}); 129.6 (C_{aro}); 126.8 (2 C_{aro}); 122.3 (2 C_{aro}); 121.2 (C_{aro}); 121.0 (C_{aro}); 107.7 (C_{aro}); 107.4 (C_{aro}); 59.0 (C_{1'} and C_{3'}); 52.9 (C_c); 39.0 (C_a); 27.7 (C_b); 27.1 (C_f).

3.4 Phenylethylamine derivatives

3.4.1 3-chloro-N-methyl-N-phenylethylpropan-1-amine (58)²⁸⁰



A 1.00 g (7.39 mmol) amount of *N*-methyl-*N*-phenylethylamine was dissolved in 25 mL of DMF. After addition of potassium carbonate (14.78 mmol, 2.04 g), the resulting mixture was heated at 70°C. After 30 minutes, the solution was allowed to cool to room temperature. A 2.2 mL (22.18 mmol) amount of 1-bromo-3-chloropropane was added and the reacting mixture was stirred at room temperature for 24 hours. The solvent was removed under reduced pressure and 60 mL water added to the residue. The product was extracted with 3 x 30 mL of dichloromethane. The combined organic fractions were washed with water and dried over sodium sulphate. The solvent was evaporated under reduced pressure. Purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 97:3 (v/v)) was performed and enabled to collect the product as a yellowish liquid.

²⁸⁰ C. F. Turk *et al.*, *J. Med. Chem.*, **1967**, 10, 823-825

Aspect: Yellowish liquid. **Yield:** 1.00 g (65%)

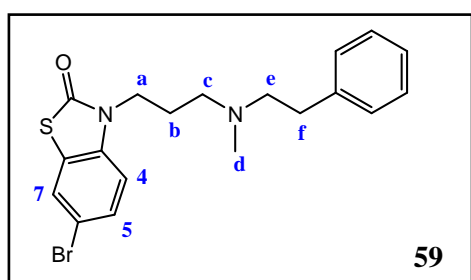
TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.7

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 212.1; 214.1; Found: 212.1; 214.1

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.33 -7.27 (m, 2H, H_{aro}); 7.42-7.16 (m, 3H, H_{aro}); 3.57 (t, ³J = 7Hz, 2H, H_a); 2.78 (m, 2H, H_f); 2.63 (m, 2H, H_e); 2.56 (t, ³J = 7Hz, 2H, H_c); 2.31 (s, 3H, H_d); 1.93 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 140.5 (C_{aro}); 129.3 (C_{aro}); 129.0 (C_{aro}); 128.7 (C_{aro}); 128.4 (C_{aro}); 126.0 (C_{aro}); 59.6 (C_e); 54.4 (C_c); 43.2 (C_a); 42.3 (C_d); 33.9 (C_f); 30.4 (C_b).

3.4.2 6-bromo-3-[3-(N-methyl-N-phenylethylamino)propyl]benzothiazolin-2-one (59)



C₁₉H₂₁BrN₂OS
M = 405.36 g.mol⁻¹

Procedure A (DMF):

A 300 mg (1.30 mmol) amount of 6-bromobenzothiazolinone, 387 mg (1.56 mmol) of 3-chloro-N-methyl-N-phenylethylpropan-1-amine hydrochloride **58**, 539 mg (3.90 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of DMF were used. After 48 hours of reaction, purification by column chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 3:2 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: Yellow oil. **Yield:** 300 mg (57%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 405.0; 407.0; Found: 404.8; 406.8

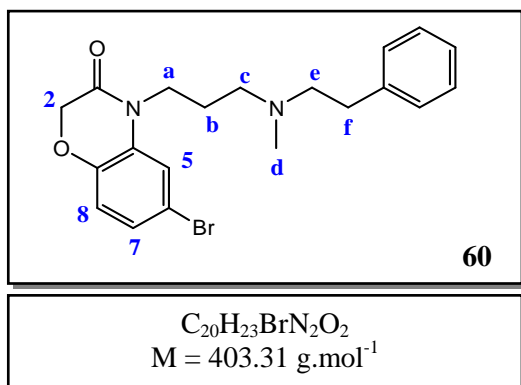
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 12.5 min; P_{HPLC} = 98%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 22.7 min; P_{HPLC} = 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.54 (d, ⁴J_{7.5} = 2 Hz, 1H, H₇); 7.38 (dd, ³J_{5.4} = 8 Hz, ⁴J_{5.7} = 2Hz, 1H, H₅); 7.36-7.27 (m, 2H, H_{aro}); 7.21-7.18 (m, 3H, H_{aro}); 6.90 (d, ³J_{4.5} = 8 Hz, 1H, H₄); 3.90 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 2.77 (m, 2H, H_f); 2.60 (m, 2H, H_e); 2.43 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.29 (s, 3H, H_d); 1.86 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 169.1 (CO); 140.5 (C_{aro}); 136.4 (C_{aro}); 129.2 (2 C_{aro}); 128.7 (C₅); 128.4 (2 C_{aro}); 126.1 (C₇); 125.0 (C_{aro}); 124.5 (C_{aro}); 115.3 (C_{aro}); 112.1 (C₄); 59.1 (C_e); 54.4 (C_c); 41.9 (C_d); 41.1 (C_a); 33.8 (C_f); 25.4 (C_b).

3.4.3 6-bromo-4-[3-(*N*-methyl-*N*-phenylethylamine)propyl]benzoxazin-3-one (60)



Procedure A (DMF):

A 60 mg (0.26 mmol) amount of 6-bromobenzoxazin-3-one **16**, 77 mg (0.31 mmol) of 3-chloro-*N*-methyl-*N*-phenylethylpropan-1-amine hydrochloride **58**, 147 mg (1.04 mmol) of potassium carbonate and 6 mL of DMF were used. After 72 hours of reaction, purification by column chromatography (cyclohexane:ethyl acetate, 1:1 (v/v) + 0.1% MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: yellow oil. **Yield:** 65 mg (62%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 403.1; 405.1; Found: 403.0; 405.0

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 11.9 min; P_{HPLC} = 98%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 21.1 min; P_{HPLC} = 98%

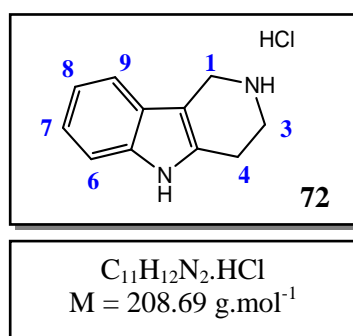
¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.33-7.18 (m, 6H, H₅ and H_{aro}); 7.11 (dd, ³J₇₋₈ = 8 Hz, ³J₇₋₅ = 2 Hz, 1H, H₇); 6.85 (d, ³J₈₋₇ = 8 Hz, 1H, H₈); 4.58 (s, 2H, H₂); 3.86 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 2.80 (m, 2H, H_f); 2.65 (m, 2H, H_e); 2.49 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.35 (s, 3H, H_d); 1.83 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 163.8 (CO); 144.3 (C_{aro}); 140.3 (C_{aro}); 130.1 (C_{aro}); 128.8 (2 C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 126.4 (C₇); 126.1 (C_{aro}); 118.4 (C_{aro}); 118.2 (C₈); 115.0 (C_{aro}); 67.5 (C₂); 59.3 (C_e); 54.5 (C_c); 42.0 (C_d); 39.5 (C_a); 33.6 (C_f); 24.8 (C_b).

4. Synthesis of tricyclic derivatives

4.1 Heterocycles

4.1.1 2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole hydrochloride (72)²⁵⁸



The reaction was performed under nitrogen atmosphere. A mixture of phenylhydrazine hydrochloride (6.09 mmol, 1.00 g) and 4-piperidone monohydrate hydrochloride (6.09 mmol, 1.00 g) in 20 mL of absolute ethanol was brought to reflux. After 2 hours, the solution was allowed to cool to room temperature and stand overnight. The precipitate that formed was collected by filtration with sufficient purity to be used without purification in the next step.

Aspect: Orange solid. **Yield:** 810 mg (64%)

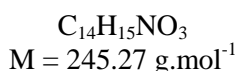
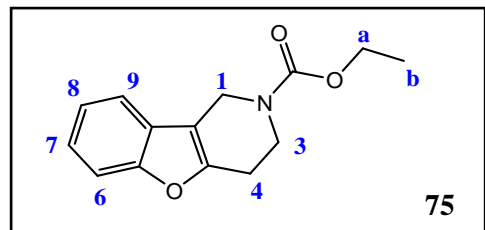
TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.2

Melting point: >250°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H] free base: 173.10; Found: 172.95

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, MeOD), $\delta(\text{ppm})$: 7.43 (m, 1H, H₆); 7.34 (m, 1H, H₉); 7.13 (m, 1H, H₇); 7.04 (m, 1H, H₈); 4.43 (t, br, $^4J_{1-3} = 1.5$ Hz, 2H, H₁); 3.62 (t, $^3J_{4-3} = 6$ Hz, 2H, H₄); 3.17 (m, 2H, H₃).

4.1.2 Ethyl-3,4-dihydro-1H-benzofuro[3,2-c]pyridine-2-carboxylate (**75**)



A 500 mg (3.43 mmol) amount of O-phenylhydroxylamine hydrochloride and a 0.519 mL (3.43 mmol) amount of ethyl-4-oxopiperidine-1-carboxylate were dissolved in 10 mL of ethanol and 1 mL of chlorhydric acid. The resulting mixture was brought to reflux for 2 hours and then stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure and 30 mL ethyl acetate added to the residue. The organic fraction was washed with a sodium hydroxide solution (1M), dried over magnesium sulphate and concentrated to give the crude product as a brown solid. Purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 99:1 (v/v)) was performed.

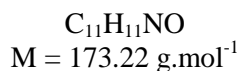
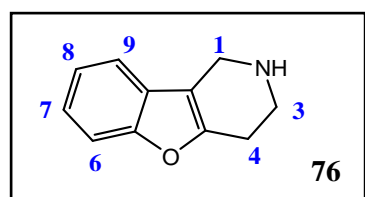
Aspect: colourless oil. **Yield:** 708 mg (84%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 99:1, v/v): R_f = 0.5

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 246.1; Found: 246.1

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl₃), $\delta(\text{ppm})$: 7.47-7.40 (m, 2H, H_{aro}); 7.30-7.19 (m, 2H, H_{aro}); 4.63 (br s, 2H, H₁); 4.23 (q, $^3J_{a-b} = 7$ Hz, 2H, H_a); 3.90 (br t, $^3J_{4-3} = 6$ Hz, 2H, H₄); 2.89 (br t, $^3J_{3-4} = 6$ Hz, 2H, H₃); 1.32 (t, $^3J_{b-a} = 7$ Hz, 3H, H_b).

4.1.3 1,2,3,4-tetrahydrobenzofuro[3,2-c]pyridine (**76**)²⁸¹



A 600 mg (2.45 mmol) amount of ethyl-3,4-dihydro-1H-benzofuro[3,2-c]pyridine-2-carboxylate **75** was dissolved in 16 mL of ethanol. A 2.05 g (36.69 mmol) of potassium hydroxide dissolved in 2 mL of water was added. The resulting solution was brought to reflux for 24 hours. Then, the solvent was removed under reduced pressure and 30 mL dichloromethane was added to the residue. The organic fraction was washed with a sodium hydroxide solution (1M), dried over magnesium sulphate and concentrated to give the desired product of sufficient purity for use without purification in the next step.

Aspect: orange solid. **Yield:** 400 mg (94%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.6

Melting point: 54°C

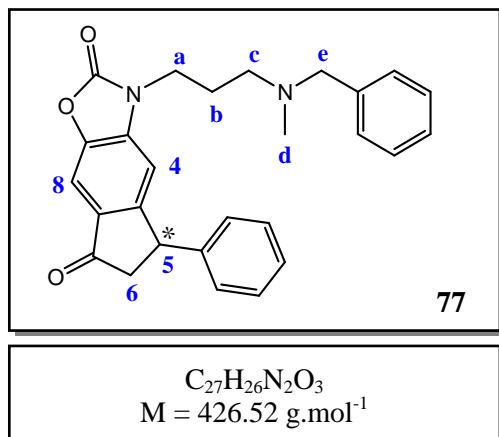
²⁸¹ N. F. Kucherova *et al.*, *Chem. Heterocycl. Comp.*, **1973**, 9, 835-837

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 174.1; Found: 174.1

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.50-7.32 (m, 2H, H_{aro}); 7.26-7.12 (m, 2H, H_{aro}); 4.00 (t, ⁴J_{1,3} = 2 Hz, 2H, H₁); 3.26 (t, ³J_{4,3} = 6 Hz, 2H, H₄); 2.80 (m, 2H, H₃); 1.69 (br s, 1H, NH).

4.2 Benzylmethylamine derivatives

4.2.1 3-[3-(N-benzyl-N-methylamino)propyl]-2,3-dihydro-2,5-dioxo-7-phenylcyclopentabenzoxazole (77)



Procedure A (DMF):

A 300 mg (1.13 mmol) amount of heterocyclic compound, 317 mg (1.36 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 470 mg (3.40 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of DMF were used. After 24 hours of reaction, purification by column chromatography (petroleum ether: ethyl acetate, 7:3 (v/v) + 0.1 % MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: beige solid. **Yield:** 190 mg (39%)

TLC (PE:EtOAc), 7:3, v/v): R_f = 0.2

Melting point: 93°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 427.19; Found: 427.01

HRMS (C₁₈H₁₉ClN₂O₂): Calc. for [M+H]: 427.2016; Found: 427.2001

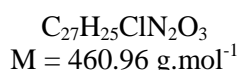
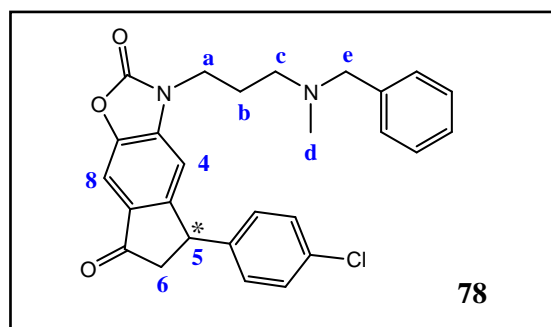
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 21.8 min; P_{HPLC} = 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 20.5 min; P_{HPLC} = 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.56 (s, 1H, H₈); 7.39-7.14 (m, 8H, H_{aro}); 7.08 (dd, ³J = 8 Hz, ⁴J = 2 Hz, 2H, H_{aro}); 6.85 (s, 1H, H₄); 4.54 (dd, ³J = 8Hz, ⁴J = 3 Hz, 1H, H₅); 2.88 (m, 2H, H_a); 3.38 (d, ³J = 5 Hz, 2H, H_c); 3.26 (dd, ²J = 19Hz, ³J = 4 Hz, 1H, H₆); 2.71 (dd, ²J = 19Hz, ³J = 4 Hz, 1H, H₆); 2.38 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.02 (s, 3H, H_d); 1.91 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 204.0 (C_{7O}); 155.4 (C_{aro}); 154.3 (C_{2O}); 143.4 (C_{aro}); 142.8 (C_{aro}); 138.7 (C_{aro}); 138.2 (C_{aro}); 131.5 (C_{aro}); 129.1 (2 C_{aro}); 128.8 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.5 (2 C_{aro}); 127.2 (C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 105.6 (C_{aro}); 104.1 (C_{aro}); 62.0 (C_e); 53.9 (C_c); 47.0 (C₆); 44.5 (C₅); 41.9 (C_d); 40.6 (C_a); 25.4 (C_b).

4.2.2 3-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-2,3-dihydro-2,5-dioxo-7-(4-chlorophenyl)cyclopentabenzoxazole (78)



Procedure A (DMF):

A 300 mg (1.00 mmol) amount of heterocyclic compound, 280 mg (1.20 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 410 mg (3.00 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of DMF were used. After 24 hours of reaction, purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 98:2, v/v) was performed.

Aspect: Yellow solid. **Yield:** 150 mg (27%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 98:2, v/v): R_f = 0.5

Melting point: 146°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 461.16; 463.16; Found: 461.01; 463.04

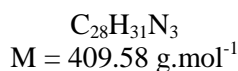
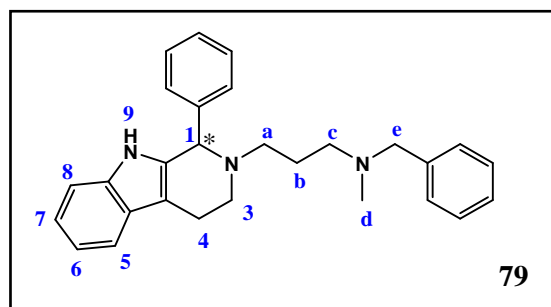
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 23.7 min; P_{HPLC} = 96%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 17.2 min; P_{HPLC} = 96%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.57 (s, 1H, H₈); 7.34-7.24 (m, 4H, H_{aro}); 7.25-7.15 (m, 3H, H_{aro}); 6.99 (d, ³J = 8 Hz, 2H, H_{aro}); 6.82 (s, 1H, H₄); 4.50 (dd, ³J = 8Hz, ⁴J = 4 Hz, 1H, H₅); 3.88 (m, 2H, H_a); 3.38 (d, ³J = 4 Hz, 2H, H_e); 3.25 (dd, ²J = 19Hz, ³J = 8 Hz, 1H, H₆); 2.65 (dd, ²J = 19Hz, ³J = 4 Hz, 1H, H₆); 2.39 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.02 (s, 3H, H_d); 1.91 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 203.5 (C₇O); 154.8 (C_{aro}); 154.3 (C₂O); 142.9 (C_{aro}); 141.9 (C_{aro}); 138.7 (C_{aro}); 138.5 (C_{aro}); 133.0 (C_{aro}); 131.5 (C_{aro}); 129.2 (2 C_{aro}); 128.9 (2 C_{aro}); 128.8 (C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.1 (2 C_{aro}); 105.5 (C_{aro}); 104.2 (C_{aro}); 62.0 (C_e); 53.9 (C_c); 46.8 (C₆); 43.9 (C₅); 41.8 (C_d); 40.7 (C_a); 25.5 (C_b).

4.2.3 2-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-1-phenyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b] indole (79)



Procedure A (acetonitrile):

A 300 mg (0.83 mmol) amount of 1-phényl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b] indole trifluoroacetate, 230 mg (1.00 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 460 mg (3.32 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of acetonitrile were used. After 48 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 6:4 (v/v) + 0.1 %

MeOH(NH₃) was performed.

Aspect: Yellow solid. **Yield:** 160 mg (47%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.5

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 410.2; Found: 410.0

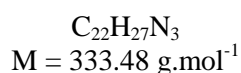
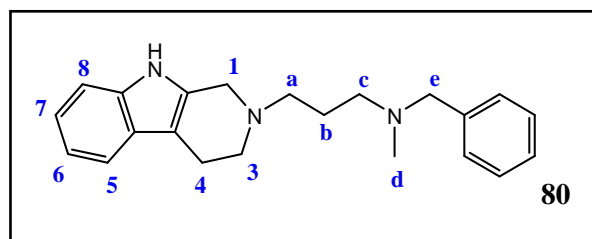
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 19.4 min; P_{HPLC} = 96%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 18.0 min; P_{HPLC} = 97%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.54 (br s, 1H, NH); 7.42-7.23 (m, 11H, H_{aro}); 7.22-7.05 (m, 3H, H_{aro}); 4.60 (br t, ⁴J₁₋₃ = 2 Hz, 1H, H₁); 3.46 (s, 2H, H_e); 3.35 (m, 1H, H₃); 2.93 (m, 2H, H₄); 2.79-2.62 (m, 2H, H₃ et H_a); 2.50-2.35 (m, 2H, H_c and H_a); 2.27 (m, 1H, H_c); 2.16 (s, 3H, H_d); 1.79 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 141.4 (C_{aro}); 139.1 (C_{aro}); 136.2 (C_{aro}); 135.0 (C_{aro}); 129.1 (2 C_{aro}); 129.0 (2 C_{aro}); 128.6 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.2 (C_{aro}); 126.9 (C_{aro}); 121.5 (C_{aro}); 119.3 (C_{aro}); 118.3 (C_{aro}); 110.8 (C_{aro}); 109.1 (C_{aro}); 109.0 (C_{aro}); 64.7 (C₁); 62.2 (C_e); 55.4 (C_a); 52.1 (C_c); 48.4 (C₃); 42.2 (C_d); 25.0 (C_b); 21.3 (C₄).

4.2.4 2-[3-(N-benzyl-N-methylamino)propyl]-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b] indole (80)



Procedure A (acetonitrile):

A 300 mg (1.74 mmol) amount of 2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b] indole, 489 mg (2.09 mmol) of N-benzyl-3-chloro-N-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 962 mg (6.96 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of acetonitrile were used. After 96 hours of reaction, purification

by column chromatography (DCM: MeOH(NH₃), 9:1, v/v) was performed.

Aspect: Orange solid. **Yield:** 202 mg (35%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 8:2, v/v): R_f = 0.5

Melting point: 112°C

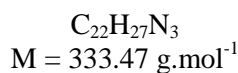
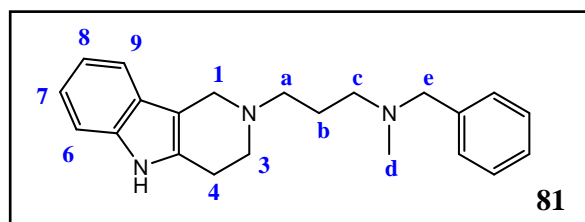
LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 334.2; Found: 334.0.

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 10.2 min; P_{HPLC} = 97%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 15.6 min; P_{HPLC} = 97%

¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆), δ(ppm): 10.71 (br s, 1H, NH); 7.37-7.19 (m, 7H, H_{aro}); 7.04-6.90 (m, 2H, H_{aro}); 3.60 (br s, 2H, H₁); 3.48 (s, 2H, H_e); 2.74 (m, 2H, H₃); 2.66 (m, 2H, H₄); 2.52 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 2.42 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.14 (s, 3H, H_d); 1.73 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b)

¹³C NMR (75MHz, DMSO-d₆), δ(ppm): 139.6 (C_{aro}); 136.4 (C_{aro}); 133.3 (C_{aro}); 129.2 (2 C_{aro}); 128.6 (2 C_{aro}); 127.3 (C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 120.7 (C_{aro}); 118.7 (C_{aro}); 117.8 (C_{aro}); 111.4 (C_{aro}); 106.9 (C_{aro}); 62.0 (C_e); 55.8 (C_a); 55.3 (C_c); 51.3 (C₃); 50.6 (C₁); 42.3 (C_d); 25.1 (C_b); 21.7 (C₄).

4.2.5 2-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (81)

Procedure A (Acetonitrile):

A 300 mg (1.44 mmol) amount of 2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]indole hydrochloride **72**, 402 mg (1.72 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 796 mg (5.76 mmol) of potassium carbonate and 25 mL of acetonitrile were used. After 72 hours of reaction, purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 95:5 to 94:6 (v/v)) was performed.

Aspect: yellow oil. **Yield:** 15mg (3%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 8:2, v/v): R_f = 0.4

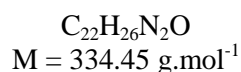
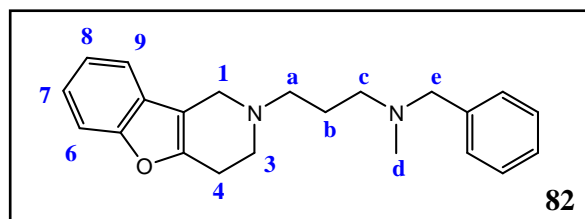
LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 334.2; Found: 334.0

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 5.3 min; P_{HPLC} = 97%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 14.9 min; P_{HPLC} = 97%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 8.16 (br s, 1H, NH); 7.40 (m, 1H, H_{aro}); 7.37-7.22 (m, 6H, H_{aro}); 7.17-7.03 (m, 2H, H_{aro}); 3.78 (br s, 2H, H_i); 3.55 (s, 2H, H_e); 2.97-2.81 (m, 4H, H₃ and H₄); 2.73 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 2.52 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.26 (s, 3H, H_d); 1.93 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 138.7 (C_{aro}); 136.1 (C_{aro}); 131.9 (C_{aro}); 129.2 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.2 (C_{aro}); 126.0 (C_{aro}); 121.3 (C_{aro}); 119.3 (C_{aro}); 117.5 (C_{aro}); 110.7 (C_{aro}); 108.0 (C_{aro}); 62.3 (C_e); 55.9 (C_a); 55.4 (C_c); 50.7 (C₃); 49.6 (C₁); 42.2 (C_d); 25.0 (C_b); 23.5 (C₄).

4.2.6 2-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-1,2,3,4-tetrahydrobenzofuro[3,2-*c*]pyridine (82)

Procedure C:

A 60 mg (0.34 mmol) amount of 1,2,3,4-tetrahydrobenzofuro[3,2-*c*]pyridine **76**, 97 mg (0.41 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 51 mg (0.34 mmol) of sodium iodide, 235 mg (0.88 mmol) of potassium carbonate and 25 mL of

acetonitrile were used. After 48 hours of reaction, purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 99:1 (v/v)) was performed.

Aspect: yellowish oil. **Yield:** 65 mg (57%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.7

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 335.2; Found: 335.1

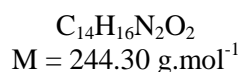
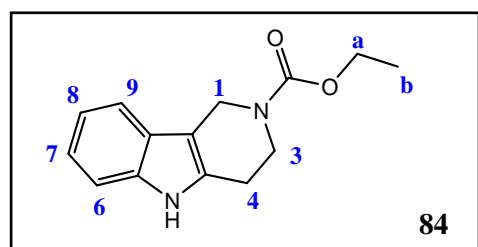
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 17.0 min; P_{HPLC} = 97%

HPLC (C_{18} , 35 min): $t_R = 15.0$ min; $P_{HPLC} > 99\%$

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$), $\delta(ppm)$: 7.46-7.24 (m, 7H, H_{aro}); 7.23-7.18 (m, 2H, H_{aro}); 3.64 (br t, $^4J_{1-3} = 2$ Hz, 2H, H_1); 3.54 (s, 2H, H_c); 2.94-2.85 (m, 4H, H_3 and H_4); 2.68 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_a); 2.50 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_c); 2.25 (s, 3H, H_d); 1.87 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_b).

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$), $\delta(ppm)$: 154.7 (C_{aro}); 152.1 (C_{aro}); 129.3 (2 C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 127.4 (C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 123.2 (C_{aro}); 122.4 (C_{aro}); 118.2 (2 C_{aro}); 111.6 (C_{aro}); 111.0 (C_{aro}); 62.0 (C_e); 55.3 (C_a); 55.2 (C_c); 50.3 (C_3); 48.7 (C_1); 41.9 (C_d); 25.1 (C_b); 24.2 (C_4).

4.2.7 Ethyl-1,3,4,5-tetrahydro-2H-pyrido[4,3-b]indole-2-carboxylate (84)^{258, 282}



The reaction was performed under a nitrogen atmosphere. A solution of phenylhydrazine hydrochloride (6.90 mmol, 1.00 g) and ethyl-4-oxopiperidine-1-carboxylate (6.90 mmol, 1.03 mL) in 30 mL of absolute ethanol was brought to reflux for 2 hours. Then, the solvent was evaporated under reduced pressure and 30 mL dichloromethane added to the residue. The organic layer was washed with a saturated sodium carbonate solution and dried over sodium sulphate.

Purification by column chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: Orange solid. **Yield:** 758 mg (45%)

TLC (DCM): $R_f = 0.6$

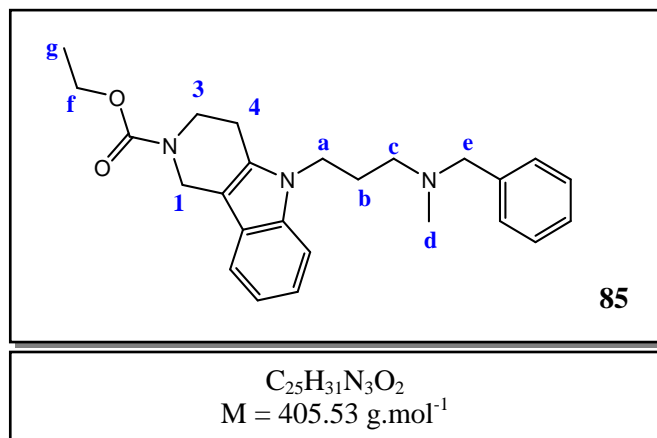
Melting point: 131°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for $[M+H]$: 245.1; Found: 245.0

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$), $\delta(ppm)$: 7.91 (br s, 1H, NH); 7.47 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H, H_{aro}); 7.32 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H, H_{aro}); 7.21-7.08 (m, 2H, H_{aro}); 4.72 (s, br, 2H, H_1); 4.22 (q, $^3J_{a-b} = 7$ Hz, 2H, H_a); 3.89 (br t, $^3J_{3-4} = 6$ Hz, 2H, H_3); 2.86 (br t, $^3J_{4-3} = 6$ Hz, 2H, H_4); 1.32 (t, $^3J_{b-a} = 7$ Hz, 3H, H_b).

²⁸² C. A. Harbert *et al.*, *J. Med. Chem.*, **1980**, 23, 635-643

4.2.8 Ethyl-5-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-1,3,4,5-tetrahydro-2*H*-pyrido[4,3-*b*]indole-2-carboxylate (85)



The reaction was performed under nitrogen atmosphere. A solution of ethyl 3,4-dihydro-1*H*-pyrido[4,3-*b*]indole-2(5*H*)-carboxylate **84** (1.23 mmol, 300 mg) and NaH (9.84 mmol, 394 mg) in 10 mL of tetrahydrofuran was brought to reflux for 10 minutes. A solution of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28** (1.47 mmol, 344 mg) in 5 mL of tetrahydrofuran was added and the resulting

mixture was brought to reflux for 48 hours. The solvent was removed under reduced pressure and 30 mL water added to the residue. The product was extracted with 3x30 mL of dichloromethane. The organic layers were combined, washed with NaCl saturated solution and dried over sulphate magnesium. A purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 98:2 (v/v)) was performed.

Aspect: yellow oil. **Yield:** 152 mg (30%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 98:2, v/v): R_f = 0.4

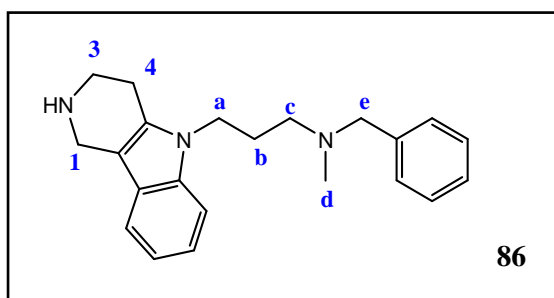
LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 406.2; Found: 406.0

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 12.9 min; P_{HPLC} = 96%

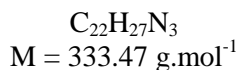
HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 22.1 min; P_{HPLC} = 96%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.48 (m, 1H, H_{aro}); 7.38-7.25 (m, 6H, H_{aro}); 7.22-7.07 (m, 2H, H_{aro}); 4.72 (br s, 2H, H₁); 4.22 (q, ³J_{f-g} = 7 Hz, 2H, H_f); 4.13 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.88 (br s, 2H, H₃); 3.53 (s, 2H, H_c); 2.83 (br t, ³J = 5 Hz, 2H, H₄); 2.43 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.22 (s, 3H, H_d); 1.97 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b); 1.33 (t, ³J_{g-f} = 7 Hz, 3H, H_g).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 156.2 (CO); 138.8 (C_{aro}); 136.4 (C_{aro}); 129.0 (3 C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 125.2 (C_{aro}); 121.2 (C_{aro}); 119.2 (C_{aro}); 117.7 (C_{aro}); 109.3 (C_{aro}); 106.4 (C_{aro}); 62.3 (C_f); 61.5 (C_e); 54.4 (C_e); 42.2 (C_d); 41.4 (C₁); 41.3 (C₃); 40.9 (C_a); 28.0 (C_b); 21.5 (C₄); 14.8 (C_g).

4.2.9 *N*-benzyl-*N*-methyl-3-(1,2,3,4-tetrahydropyrido[4,3b]indol-5-yl)propan-1-amine (86)

86



A 152 mg (0.37 mmol) amount of ethyl-5-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-1,3,4,5-tetrahydro-2*H*-pyrido[4,3-*b*]indole-2-carboxylate **85** was dissolved in 4 mL of ethanol. A solution of potassium hydroxide (5.6 mmol, 316 mg) in 0.5 mL of water was added. The resulting mixture was brought to reflux for 24 hours. The solvent was removed under reduced pressure and 15 mL dichloromethane added to the residue. The solution was washed with 2x15 mL of sodium hydroxide (1M) and dried over magnesium sulphate. A purification by thick layer chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: yellow oil. **Yield:** 100 mg (83%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 98:2, v/v): R_f = 0.4

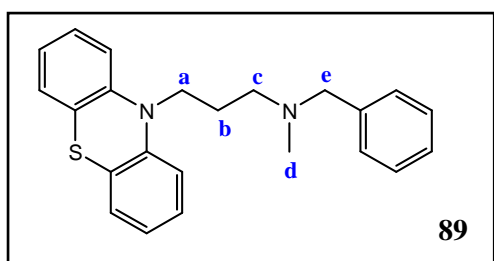
LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 334.2; Found: 334.1

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 10.4 min; P_{HPLC} = 98%

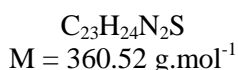
HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 14.4 min; P_{HPLC} = 96%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.40 (m, 1H, H_{aro}); 7.35-7.28 (m, 6H, H_{aro}); 7.23-7.07 (m, 2H, H_{aro}); 4.74 (br s, 1H, NH); 4.35 (br s, 2H, H₁); 4.10 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.52-3.47 (m, 4H, H₃ et H_e); 3.07 (br t, ³J = 5 Hz, 2H, H₄); 2.40 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.19 (s, 3H, H_d); 1.94 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 138.5 (C_{aro}); 136.4 (C_{aro}); 131.4 (C_{aro}); 129.0 (2 C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 127.2 (C_{aro}); 125.1 (C_{aro}); 121.8 (C_{aro}); 119.6 (C_{aro}); 117.8 (C_{aro}); 109.5 (C_{aro}); 103.1 (C_{aro}); 62.2 (C_e); 54.2 (C_c); 42.0 (C_d); 41.1 (C₁); 40.9 (C₃); 40.8 (C_a); 27.7 (C_b); 20.5 (C₄).

4.2.10 10-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]phenothiazine (89)

89



Procedure F:

A 200 mg (1.00 mmol) amount of phenothiazine, 281 mg (1.20 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 160 mg (4.00 mmol) of sodium hydride and 10 mL of DMF were used. After 48 hours of reaction, purification by column chromatography (CycloHex:EtOAc, 3:2 (v/v) + 0.1% MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: purple oil. **Yield:** 238 mg (66%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 3:2, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 361.1; Found: 361.2

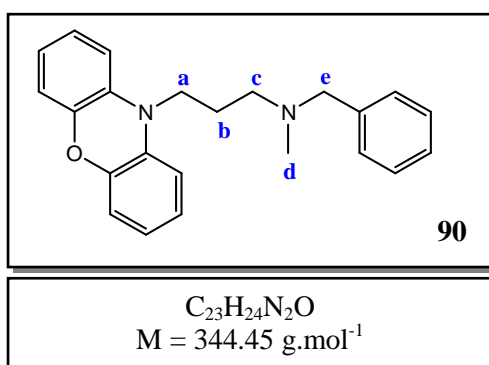
HPLC (C₄, 35 min): *t_R* = 14.6 min; P_{HPLC} = 96%

HPLC (C₁₈, 35 min): *t_R* = 24.7 min; P_{HPLC} = 97%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.30-7.13 (m, 9H, H_{aro}); 6.97-6.88 (m, 4H, H_{aro}); 3.98 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.62 (s, 2H, H_c); 2.67 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.26 (s, 3H, H_d); 2.11 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 145.1 (2 C_{aro}); 129.5 (2 C_{aro}); 129.2 (C_{aro}); 128.5 (2 C_{aro}); 127.7 (C_{aro}); 127.5 (2 C_{aro}); 127.3 (2 C_{aro}); 125.4 (2 C_{aro}); 122.6 (2 C_{aro}); 115.7 (2 C_{aro}); 61.6 (C_e); 54.1 (C_c); 44.8 (C_a); 41.5 (C_d); 23.9 (C_b).

4.2.11 10-[3-(N-benzyl-N-methylamino)propyl]phenoxazine (90)



Procedure F:

A 200 mg (1.10 mmol) amount of phenoxazine, 306 mg (1.30 mmol) of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**, 176 mg (4.40 mmol) of sodium hydride and 10 mL of DMF were used. After 48 hours of reaction, purification by column chromatography (CycloHex:EtOAc, 3:2 (v/v) + 0.1% MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: purple oil. **Yield:** 219 mg (58%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 3:2, v/v): R_f = 0.5

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 345.2; Found: 345.2

HPLC (C₄, 35 min): *t_R* = 14.0 min; P_{HPLC} = 98%

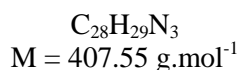
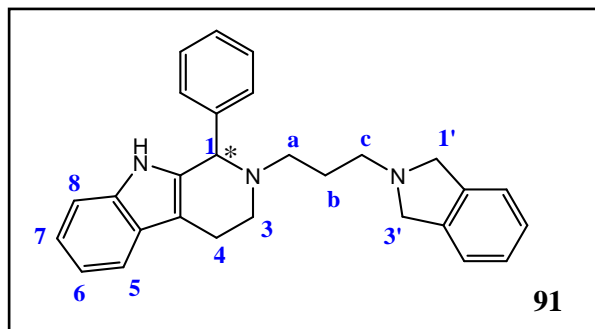
HPLC (C₁₈, 35 min): *t_R* = 21.3 min; P_{HPLC} = 98%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.39-7.29 (m, 5H, H_{aro}); 6.81-6.50 (m, 8H, H_{aro}); 3.58 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.54 (s, 2H, H_c); 2.50 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.26 (s, 3H, H_d); 1.85 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 145.0 (2 C_{aro}); 133.2 (2 C_{aro}); 129.7 (C_{aro}); 128.7 (2 C_{aro}); 123.7 (3 C_{aro}); 121.0 (3 C_{aro}); 115.5 (3 C_{aro}); 111.4 (2 C_{aro}); 61.4 (C_e); 53.8 (C_c); 41.5 (C_a); 41.4 (C_d); 22.1 (C_b).

4.3 Isoindoline derivatives

4.3.1 2-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]-1-phenyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (91)



Procedure A (acetonitrile):

A 300 mg (0.83 mmol) amount of 1-phenyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b] indole trifluoroacetate, 195 mg (0.99 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 458 mg (3.32 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of acetonitrile were used. After 96 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (cyclohexane: ethyl acetate, 1:1

(v/v) + 0.1 % MeOH(NH₃) was performed.

Aspect: Yellow oil. **Yield:** 200 mg (59%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.5

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 408.2; Found: 408.0

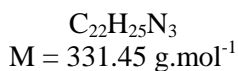
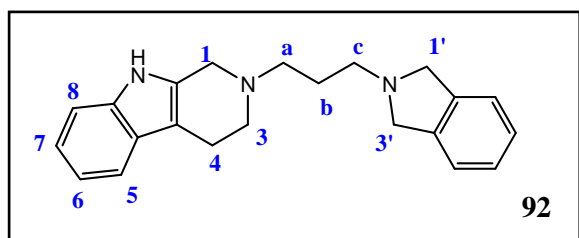
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 11.9 min; P_{HPLC} = 98%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 17.0 min; P_{HPLC} = 96%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.55 (m, 1H, H_{aro}); 7.41-7.28 (m, 5H, H_{aro}); 7.25-7.07 (m, 7H, H_{aro}); 4.61 (br t, ⁴J₁₋₃ = 2 Hz, 1H, H₁); 3.89 (s, 4H, H_{1'} and H_{3'}); 3.39 (m, 1H, H₃); 2.95 (m, 2H, H₄); 2.82-2.67 (m, 3H, H₃, H_a and H_c); 2.65-2.46 (m, 2H, H_a and H_c); 1.84 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 141.5 (C_{aro}); 139.9 (2 C_{aro}); 136.3 (C_{aro}); 135.0 (C_{aro}); 129.2 (2 C_{aro}); 128.7 (2 C_{aro}); 128.0 (C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 126.7 (2 C_{aro}); 122.2 (2 C_{aro}); 121.5 (C_{aro}); 119.3 (C_{aro}); 118.3 (C_{aro}); 110.8 (C_{aro}); 109.0 (C_{aro}); 64.7 (C₁); 59.0 (C_{1'} and C_{3'}); 54.1 (C_a); 51.9 (C_c); 48.4 (C₃); 26.7 (C_b); 21.3 (C₄).

4.3.2 2-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (92)



Procedure A (acetonitrile):

A 300 mg (1.74 mmol) amount of 2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b] indole, 485 mg (2.09 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 962 mg (6.96 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of acetonitrile were used. After 96 hours of reaction, purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃),

99:1 to 96:4 (v/v) was performed.

Aspect: Orange solid. **Yield:** 100 mg (36%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.5

Melting point: 197°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 332.2; Found: 332.0

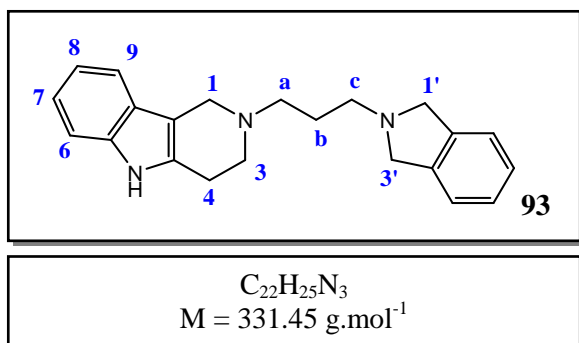
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 9.0 min; P_{HPLC} > 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 15.2 min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.85 (br s, 1H, NH); 7.49 (m, 1H, H_{aro}); 7.31 (m, 1H, H_{aro}); 7.21 (s, 4H, H_{iso}); 7.17-7.06 (m, 2H, H₆ and H₇); 3.97 (s, 4H, H_{1'} and H_{3'}); 3.73 (br t, ⁴J₁₋₃ = 2 Hz, 1H, H₁); 2.95-2.81 (m, 6H, H₃, H₄ and H_a); 2.75 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 1.94 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 140.0 (2 C_{aro}); 136.1 (C_{aro}); 131.8 (C_{aro}); 126.8 (2 C_{aro}); 122.3 (2 C_{aro}); 121.3 (C_{aro}); 119.3 (C_{aro}); 118.0 (C_{aro}); 110.6 (C_{aro}); 108.0 (C_{aro}); 59.1 (C_{1'} and C_{3'}); 55.8 (C_a); 54.2 (C_c); 51.2 (C₃); 50.6 (C₁); 26.9 (C_b); 21.4 (C₄).

4.3.3 2-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]-2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole (93)



Procedure B:

A 100 mg (0.48 mmol) amount of 2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole hydrochloride, 133 mg (0.58 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 58 mg (1.44 mmol) of sodium hydroxide and 12 mL of H₂O: acetonitrile (2:1, v/v) were used. After 48 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (cyclohexane:ethyl acetate, 1:1 (v/v) + 0.1% MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: yellow oil. **Yield:** 41 mg (26%)

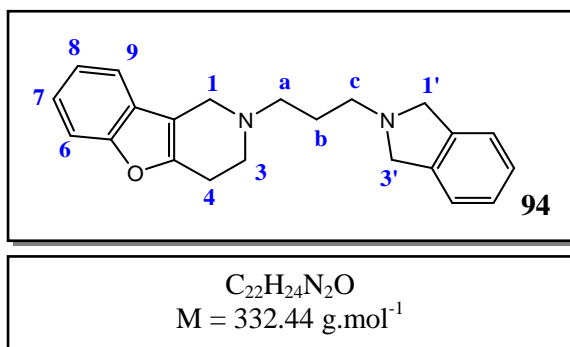
TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 332.2; Found: 332.0

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.98 (br s, 1H, NH); 7.41 (m, 1H, H_{aro}); 7.30 (m, 1H, H_{aro}); 7.21 (s, 4H, H_{iso}); 7.17-7.04 (m, 2H, H_{aro}); 4.00 (s, 4H, H_{1'} and H_{3'}); 3.82 (br t, ⁴J₁₋₃ = 2 Hz, 2H, H₁); 3.02-2.77 (m, 8H, H₃, H₄, H_a and H_c); 2.01 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 139.7 (2 C_{aro}); 136.1 (C_{aro}); 131.8 (C_{aro}); 126.8 (2 C_{aro}); 126.1 (C_{aro}); 122.3 (2 C_{aro}); 121.3 (C_{aro}); 119.4 (C_{aro}); 117.5 (C_{aro}); 110.7 (C_{aro}); 108.0 (C_{aro}); 59.1 (C_{1'} and C_{3'}); 55.7 (C_a); 54.2 (C_c); 50.6 (C₃); 49.6 (C₁); 26.6 (C_b); 23.5 (C₄).

4.3.4 2-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]-1,2,3,4-tetrahydrobenzofuro[3,2-c]pyridine (94)



Procedure C:

A 60 mg (0.34 mmol) amount of 1,2,3,4-tetrahydrobenzofuro[3,2-c]pyridine **76**, 95 mg (0.41 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 51 mg (0.34 mmol) of sodium iodide, 235 mg (0.88 mmol) of potassium carbonate and 6 mL of acetonitrile were used. After 48 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: brown oil. **Yield:** 67 mg (58%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 333.2; Found: 333.2

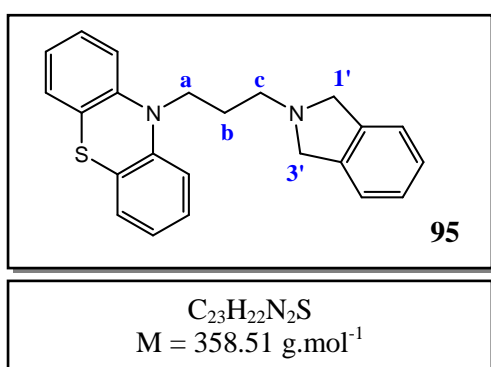
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 16.7 min; P_{HPLC} = 97%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 14.7 min; P_{HPLC} = 96%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.43-7.39 (m, 2H, H_{aro}); 7.24-7.19 (m, 6H, H_{aro}); 4.01 (s, 4H, H_{1'} and H_{3'}); 3.68 (br t, ⁴J_{1,3} = 2 Hz, 2H, H₁); 2.97-2.84 (m, 6H, H₃, H₄ and H_a); 2.78 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 1.97 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 154.7 (C_{aro}); 152.1 (C_{aro}); 139.6 (2 C_{aro}); 127.2 (C_{aro}); 126.9 (2 C_{aro}); 123.2 (C_{aro}); 122.4 (2 C_{aro}); 122.3 (C_{aro}); 118.2 (C_{aro}); 111.6 (C_{aro}); 111.0 (C_{aro}); 59.1 (C_{1'} and C_{3'}); 55.4 (C_a); 54.2 (C_c); 50.4 (C₃); 48.7 (C₁); 26.9 (C_b); 24.3 (C₄).

4.3.5 10-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]phenothiazine (95)



Procedure F:

A 200 mg (1.00 mmol) amount of phenothiazine, 278 mg (1.20 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 160 mg (4.00 mmol) of sodium hydride and 10 mL of DMF were used. After 48 hours of reaction, purification by column chromatography (CycloHex:EtOAc, 3:2 (v/v) + 0.1% MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: brown oil. **Yield:** 199 mg (56%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 3:2, v/v): R_f = 0.2

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 359.1; Found: 358.9

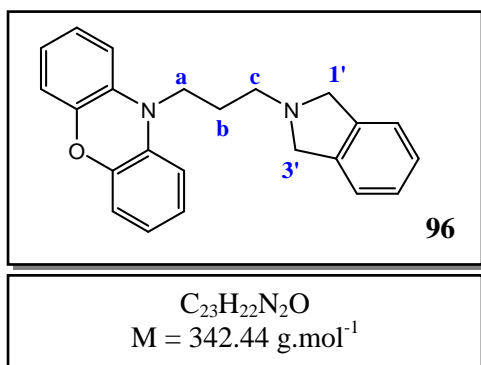
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 13.6 min; P_{HPLC} = 97%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 24.0 min; P_{HPLC} = 96%

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 7.23-7.10 (m, 8H, H_{aro}); 6.98-6.88 (m, 4H, H_{aro}); 4.02 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_a); 3.93 (s, 4H, $\text{H}_{1'}$ and $\text{H}_{3'}$); 2.89 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_c); 2.09 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 145.3 (2 C_{aro}); 139.6 (2 C_{aro}); 127.5 (2 C_{aro}); 127.3 (2 C_{aro}); 126.9 (2 C_{aro}); 125.3 (2 C_{aro}); 122.5 (2 C_{aro}); 122.3 (2 C_{aro}); 115.7 (2 C_{aro}); 59.2 ($\text{C}_{1'}$ and $\text{C}_{3'}$); 53.6 (C_c); 45.2 (C_a); 26.3 (C_b).

4.3.6 10-[3-(isoindolin-2-yl)propyl]phenoxazine (96)



Procedure F:

A 200 mg (1.10 mmol) amount of phenoxazine, 301 mg (1.30 mmol) of 2-(3-chloropropyl)isoindoline hydrochloride **49**, 176 mg (4.40 mmol) of sodium hydride and 10 mL of DMF were used. After 24 hours of reaction, purification by column chromatography (CycloHex:EtOAc, 3:2 (v/v) + 0.1% MeOH(NH_3)) was performed.

Aspect: brown oil. **Yield:** 314 mg (83%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 3:2, v/v): $R_f = 0.5$

LCMS (ESI^+): Calc. for $[\text{M}+\text{H}]$: 343.1; Found: 343.0

HPLC (C_4 , 35 min): $t_R = 13.2$ min; $P_{\text{HPLC}} = 99\%$

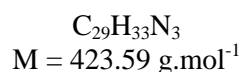
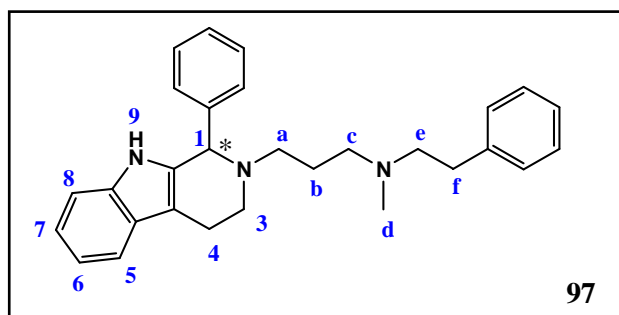
HPLC (C_{18} , 35 min): $t_R = 23.9$ min; $P_{\text{HPLC}} > 99\%$

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 7.27 (s, 4H, H_{iso}); 6.83-6.76 (m, 2H, H_{aro}); 6.69-6.60 (m, 6H, H_{aro}); 3.98 (s, 4H, $\text{H}_{1'}$ and $\text{H}_{3'}$); 3.68 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_a); 2.85 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_c); 1.94 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 144.9 (2 C_{aro}); 139.1 (2 C_{aro}); 133.3 (2 C_{aro}); 127.1 (2 C_{aro}); 123.7 (2 C_{aro}); 122.4 (2 C_{aro}); 120.9 (2 C_{aro}); 115.4 (2 C_{aro}); 111.4 (2 C_{aro}); 59.2 ($\text{C}_{1'}$ and $\text{C}_{3'}$); 53.8 (C_c); 41.6 (C_a); 24.2 (C_b).

4.4 Phenylethylamine derivatives

4.4.1 2-[3-(*N*-methyl-*N*-phenylethylamino)propyl]-1-phenyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*] indole (97)



Procedure A (acetonitrile):

A 300 mg (0.83 mmol) amount of 1-phenyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*] indole trifluoroacetate, 210 mg (0.99 mmol) of 3-chloro-*N*-methyl-*N*-phenylethylpropan-1-amine hydrochloride **58**, 458 mg (3.32 mmol) of potassium carbonate and 20 mL of acetonitrile were used. After 96 hours of reaction, purification by column chromatography

(DCM:MeOH(NH₃), 98:2 to 96:4 (v/v)) was performed.

Aspect: Yellow oil. **Yield:** 135 mg (38%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.6

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 424.2; Found: 424.1

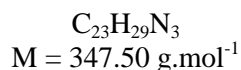
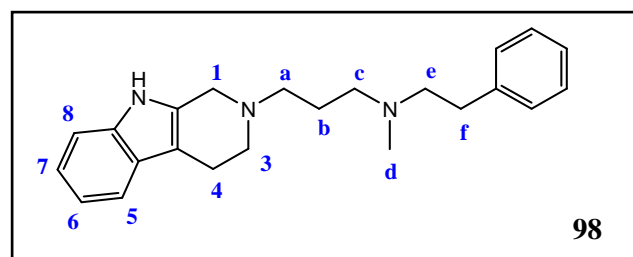
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 11.0 min; P_{HPLC} = 97%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 18.6 min; P_{HPLC} = 96%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.62 (m, 1H, H_{aro}); 7.40-7.28 (m, 9H, H_{aro} and NH); 7.26-7.08 (m, 6H, H_{aro}); 4.59 (br t, ⁴J_{I-3} = 2 Hz, 1H, H_I); 3.35(m, 1H, H₃); 2.95 (m, 2H, H₄); 2.82-2.58 (m, 7H, H₃, H_a, H_c, H_e and H_f); 2.57-2.38 (m, 2H, H_a and H_c); 2.32 (s, 3H, H_d); 1.76 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 141.4 (C_{aro}); 140.3 (C_{aro}); 136.3 (C_{aro}); 134.9 (C_{aro}); 129.1 (2 C_{aro}); 128.7 (2 C_{aro}); 128.6 (2 C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 128.0 (C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 126.1 (C_{aro}); 121.5 (C_{aro}); 119.3 (C_{aro}); 118.3 (C_{aro}); 110.8 (C_{aro}); 109.0 (C_{aro}); 64.7 (C₁); 59.4 (C_e); 55.5 (C_a); 52.0 (C_c); 48.4 (C₃); 42.0 (C_d); 33.5 (C_f); 24.8 (C_b); 21.3 (C₄).

4.4.2 2-[3-(*N*-methyl-*N*-phenylethylamino)propyl]-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*] indole (98)



Procedure A (acetonitrile):

A 300 mg (1.74 mmol) amount of 2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*] indole, 518 mg (2.09 mmol) of 3-chloro-*N*-methyl-*N*-phenylethylpropan-1-amine hydrochloride **58**, 962 mg (6.93 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of acetonitrile were used. After 96

hours of reaction, purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 99:1 to 97:3 (v/v)) was performed.

Aspect: Orange oil. **Yield:** 300 mg (51%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.6

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 348.2; Found: 348.0

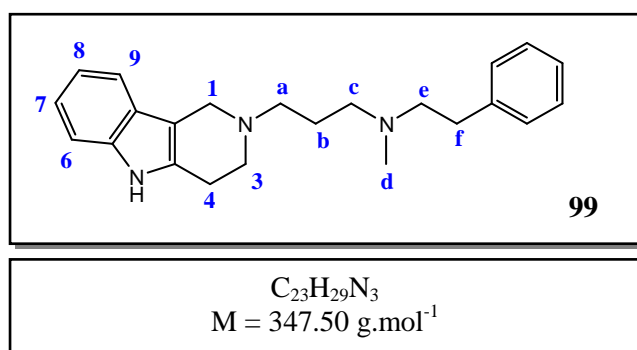
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 9.3 min; P_{HPLC} > 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 16.4 min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 8.11 (br s, 1H, NH); 7.48 (m, 1H, H_{aro}); 7.34-7.27 (m, 3H, H_{aro}); 7.25-7.18 (m, 3H, H_{aro}); 7.17-7.08 (m, 2H, H_{aro}); 3.63 (br s, 2H, H₁); 2.91-2.77 (m, 6H, H₃, H₄ and H_f); 2.73 (m, 2H, H_e); 2.62 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 2.55 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.36 (s, 3H, H_d); 1.82 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 140.5 (C_{aro}); 136.2 (C_{aro}); 131.9 (C_{aro}); 128.7 (2 C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 127.2 (C_{aro}); 126.1 (C_{aro}); 121.3 (C_{aro}); 119.3 (C_{aro}); 118.0 (C_{aro}); 110.7 (C_{aro}); 108.3 (C_{aro}); 59.9 (C_e); 55.9 (C_a); 55.6 (C_c); 51.3 (C₃); 50.4 (C₁); 42.2 (C_d); 33.7 (C_f); 25.3 (C_b); 21.3 (C₄).

4.4.3 2-[3-(N-methyl-N-phenylethylamino)propyl]-2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole (99)



Procedure B:

A 100 mg (0.48 mmol) amount of 2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indole hydrochloride, 143 mg (0.60 mmol) of 3-chloro-N-methyl-N-phenylethylpropan-1-amine hydrochloride **58**, 58 mg (1.44 mmol) of sodium hydroxide and 12 mL of H₂O: acetonitrile (2:1, v/v) were used. After 48

hours of reaction, purification by thick layer chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: yellow oil. **Yield:** 25 mg (15%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.3

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 348.2; Found: 348.0

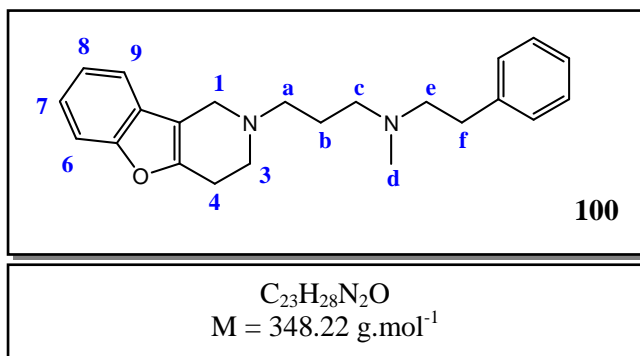
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 8.3 min; P_{HPLC} = 98%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 16.1 min; P_{HPLC} = 98%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.96 (br s, 1H, NH); 7.41 (m, 1H, H_{aro}); 7.33-7.18 (m, 6H, H_{aro}); 7.17-7.05 (m, 2H, H_{aro}); 3.74 (s, br, 2H, H₁); 2.95-2.79 (m, 6H, H₃, H₄ and H_f); 2.73-2.65 (m, 4H, H_a and H_c); 2.58 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.39 (s, 3H, H_d); 1.89 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 140.2 (C_{aro}); 136.1 (C_{aro}); 131.9 (C_{aro}); 128.7 (2 C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 126.1 (C_{aro}); 126.1 (C_{aro}); 121.2 (C_{aro}); 119.3 (C_{aro}); 117.5 (C_{aro}); 110.6 (C_{aro}); 108.5 (C_{aro}); 59.4 (C_e); 55.9 (C_a); 55.6 (C_c); 50.7 (C₃); 49.6 (C₁); 42.1 (C_d); 33.5 (C_f); 25.0 (C_b); 23.6 (C₄).

4.4.4 2-[3-(*N*-methyl-*N*-phenylethylamino)propyl]-1,2,3,4-tetrahydrobenzofuro[3,2-*c*]pyridine (100)



Procedure C:

A 60 mg (0.34 mmol) amount of 1,2,3,4-tetrahydrobenzofuro[3,2-*c*]pyridine **76**, 102 mg (0.41 mmol) of 3-chloro-*N*-methyl-*N*-phenylethylpropan-1-amine hydrochloride **58**, 51 mg (0.34 mmol) of sodium iodide, 235 mg (0.88 mmol) of potassium carbonate and 6 mL of acetonitrile were used. After 48 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 71 mg (60%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.5

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 349.2; Found: 349.1

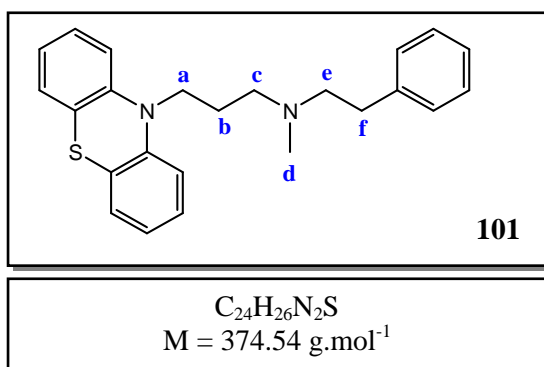
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 10.9 min; P_{HPLC} > 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 15.8 min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.49-7.14 (m, 9H, H_{aro}); 3.64 (br t, ⁴J_{I-3} = 2 Hz, 2H, H₁); 3.00-2.73 (3, 8H, H_e, H_f, H₃ et H₄); 2.71-2.67 (m, 4H, H_a et H_c); 2.51 (s, 3H, H_d); 1.96 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 154.7 (C_{aro}); 152.1 (C_{aro}); 138.8 (C_{aro}); 128.7 (2 C_{aro}); 128.6 (2C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 126.5 (C_{aro}); 123.3 (C_{aro}); 122.4 (C_{aro}); 118.2 (C_{aro}); 111.5 (C_{aro}); 111.0 (C_{aro}); 58.8 (C_e); 55.2 (C_a); 55.0 (C_c); 50.4 (C₃); 48.7 (C₁); 41.6 (C_d); 32.6 (C_f); 24.3 (C_b); 24.1 (C₄).

4.4.5 10-[3-(*N*-methyl-*N*-phenylethylamino)propyl]phenothiazine (101)



Procedure F:

A 200 mg (1.00 mmol) amount of phenothiazine, 298 mg (1.20 mmol) of 3-chloro-*N*-methyl-*N*-phenylethylpropan-1-amine hydrochloride **58**, 160 mg (4.00 mmol) of sodium hydride and 10 mL of DMF were used. After 24 hours of reaction, purification by column chromatography (CycloHex:EtOAc, 3:2 (v/v) + 0.1% MeOH(NH₃)) was performed.

Aspect: brown oil. **Yield:** 150 mg (40%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 3:2, v/v): R_f = 0.2

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 375.1; Found: 374.9

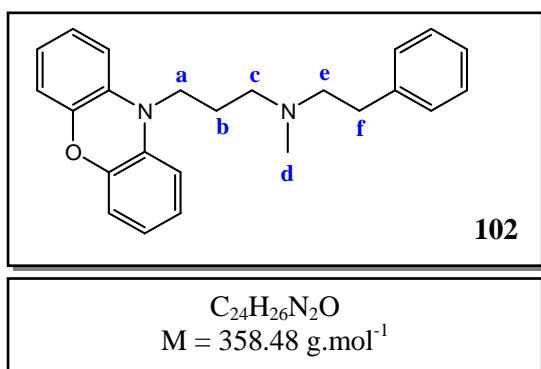
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 14.4 min; P_{HPLC} = 97%

HPLC (C_{18} , 35 min): $t_R = 25.4$ min; $P_{HPLC} = 98\%$

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$), $\delta(ppm)$: 7.32-7.10 (m, 9H, H_{aro}); 6.97-6.84 (m, 4H, H_{aro}); 3.94 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_a); 2.78-2.62 (m, 2H, H_f); 2.62-2.51 (m, 4H, H_e and H_c); 2.35 (s, 3H, H_d); 2.04 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_b).

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$), $\delta(ppm)$: 145.2 (2 C_{aro}); 139.6 (C_{aro}); 128.7 (2 C_{aro}); 128.5 (2 C_{aro}); 127.6 (C_{aro}); 127.3 (2 C_{aro}); 126.2 (2 C_{aro}); 125.4 (2 C_{aro}); 122.6 (2 C_{aro}); 115.8 (2 C_{aro}); 59.1 (C_e); 54.6 (C_c); 44.9 (C_a); 42.0 (C_d); 32.8(C_f); 26.3 (C_b).

4.4.6 10-[3-(*N*-methyl-*N*-phenylethylamino)propyl]phenoxazine (102)



Procedure F:

A 200 mg (1.10 mmol) amount of phenothiazine, 323 mg (1.30 mmol) of 3-chloro-*N*-methyl-*N*-phenylethylpropan-1-amine hydrochloride **58**, 176 mg (4.40 mmol) of sodium hydride and 10 mL of DMF were used. After 24 hours of reaction, purification by column chromatography (CycloHex:EtOAc, 3:2 (v/v) + 0.1% MeOH(NH_3)) was performed.

Aspect: Yellow oil. **Yield:** 200 mg (51%)

TLC (CycloHex:EtOAc, 3:2, v/v): $R_f = 0.2$

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 359.2; Found: 359.1

HPLC (C_4 , 35 min): $t_R = 13.63$ min; $P_{HPLC} = 96\%$

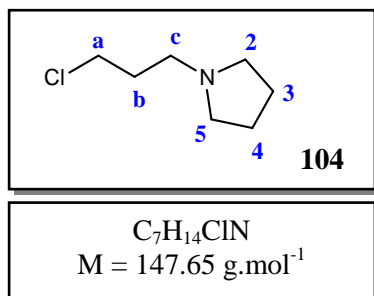
HPLC (C_{18} , 35 min): $t_R = 24.00$ min; $P_{HPLC} = 96\%$

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$), $\delta(ppm)$: 7.33-7.18 (m, 5H, H_{aro}); 6.82-6.74 (m, 2H, H_{aro}); 6.68-6.61 (m, 4H, H_{aro}); 6.54-6.50 (m, 2H, H_{aro}); 3.53 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_a); 2.83 (m, 2H, H_f); 2.65 (m, 2H, H_e); 2.54 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_c); 2.35 (s, 3H, H_d); 1.81 (p, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_b).

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$), $\delta(ppm)$: 145.0 (2 C_{aro}); 140.0 (C_{aro}); 133.3 (2 C_{aro}); 128.7 (2 C_{aro}); 128.5 (2 C_{aro}); 126.2 (2 C_{aro}); 123.7 (C_{aro}); 120.8 (2 C_{aro}); 115.3 (2 C_{aro}); 111.42 (2 C_{aro}); 59.3 (C_e); 54.7 (C_c); 42.0 (C_a); 41.7 (C_d); 33.6 (C_f); 22.7 (C_b).

4.5 Pyrrolidine derivatives

4.5.1 1-(3-chloropropyl)pyrrolidine (104)²⁸³



A 1.00 g (14.06 mmol) amount of pyrrolidine was dissolved in 25 mL of DMF. After addition of potassium carbonate (28.12 mmol, 3.88 g), the resulting mixture was heated at 70°C. After 30 minutes, the solution was allowed to cool to room temperature. A 4.17 mL (47.18 mmol) amount of 1-bromo-3-chloropropane was added and the reacting mixture was stirred at room temperature for 24 hours. The solvent was removed under reduced pressure and 60 mL water added to the residue. The product was extracted with 3 x 30 mL of dichloromethane. The combined organic fractions were washed with water and dried over sodium sulphate. The solvent was evaporated under reduced pressure. Purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 99:1 (v/v)) was performed and enabled to collect the product as a brown oil.

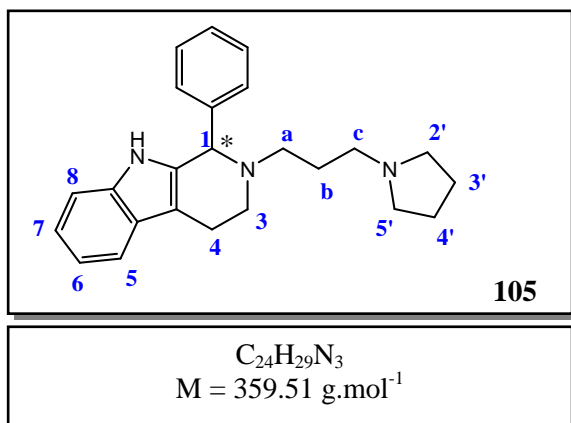
Aspect: brown oil. **Yield:** 586 mg (30%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.5

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 148.1; 150.1; Found: 148.0; 150.0

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 3.60 (t, ³J = 7Hz, 2H, H_a); 2.85 (t, ³J = 7Hz, 2H, H_c); 2.49 (m, 4H, H₂ and H₅); 1.98 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b); 1.78 (m, 4H, H₃ and H₄).

4.5.2 1-phenyl-2-[3-(pyrrolidin-1-yl)propyl]-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (105)



Procedure A (acetonitrile):

A 300 mg (0.83 mmol) amount of 1-phenyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b] indole trifluoroacetate, 182 mg (0.99 mmol) of 1-(3-chloropropyl)pyrrolidine hydrochloride **103**, 458 mg (3.32 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of acetonitrile were used. After 96 hours of reaction, purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 99:1 to 95:5 (v/v)) was performed.

Aspect: Yellow oil. **Yield:** 35 mg (12%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 4:1, v/v): R_f = 0.6

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]:360.2; Found: 360.0

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 9.9 min; P_{HPLC} = 99%

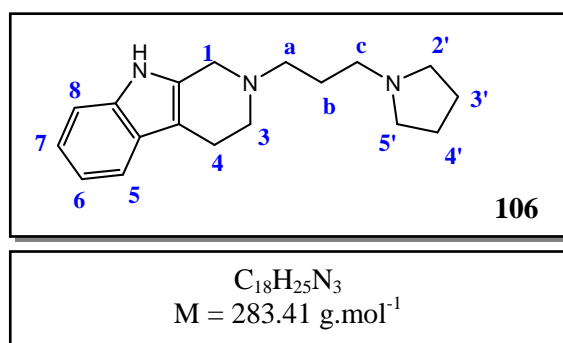
HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 15.4 min; P_{HPLC} = 98%

²⁸³ C.-K. Hau *et al.*, *Tetrahedron*, **2010**, 66, 9860-9874

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.55 (m, 1H, H_{aro}); 7.39-7.31 (m, 5H, H_{aro}); 7.22-7.06 (m, 3H, H_{aro}); 4.59 (br t, ⁴J₁₋₃ = 2 Hz, 1H, H₁); 3.33 (m, 1H, H₃); 2.99 (m, 2H, H₄); 2.82-2.77 (m, 2H, H₃ and H_c); 2.62-2.51 (m, 5H, H_a, H_{2'} and H_{5'}); 2.45 (m, 1H, H_c); 2.33 (m, 1H, H_a); 1.90-1.67 (m, 6H, H_b, H_{3'} and H_{4'}).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 141.4 (C_{aro}); 136.3 (C_{aro}); 134.9 (C_{aro}); 129.1 (2 C_{aro}); 128.6 (2 C_{aro}); 128.0 (C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 121.5 (C_{aro}); 119.3 (C_{aro}); 118.3 (C_{aro}); 110.8 (C_{aro}); 108.9 (C_{aro}); 64.7 (C₁); 54.3 (C_a); 54.1 (C_{2'} and C_{5'}); 51.9 (C_c); 48.3 (C₃); 26.2 (C_b); 23.4 (C_{3'} and C_{4'}); 21.2 (C₄).

4.5.3 2-[3-(pyrrolidin-1-yl)propyl]-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (106)



Procedure A (acetonitrile):

A 300 mg (1.74 mmol) amount of 2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b] indole, 385 mg (2.09 mmol) of 1-(3-chloropropyl)pyrrolidine hydrochloride **104**, 962 mg (6.93 mmol) of potassium carbonate and 30 mL of acetonitrile were used. After 96 hours of reaction, purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 96:4

(v/v)) was performed.

Aspect: Yellow oil. **Yield:** 100 mg (20%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.6

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 284.2; Found: 284.1

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 10.6 min; P_{HPLC} = 96%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 15.7 min; P_{HPLC} = 96%

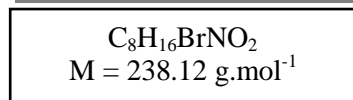
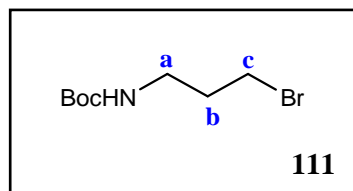
¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 8.35 (br s, 1H, NH); 7.49 (d, ³J₈₋₇ = 8 Hz, 1H, H₈); 7.34 (d, ³J₅₋₆ = 8 Hz, 1H, H₅); 7.17 (td, ³J₆₋₅ = 8 Hz, ⁴J₆₋₈ = 1 Hz, 1H, H₆); 7.11 (td, ³J₇₋₈ = 8 Hz, ⁴J₇₋₅ = 1 Hz, 1H, H₇); 4.70 (br s, 2H, H₁); 4.25 (m, 2H, H_a); 3.85 (m, 2H, H₃); 2.85 (m, 2H, H₄); 2.77 (m, 6H, H_c, H_{2'} and H_{5'}); 2.04 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b); 1.91-1.84 (m, 4H, H_{3'} and H_{4'}).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 136.2 (C_{aro}); 130.4 (C_{aro}); 127.0 (C_{aro}); 121.8 (C_{aro}); 119.6 (C_{aro}); 118.0 (C_{aro}); 111.0 (C_{aro}); 63.7 (C_a); 54.1 (C_c); 53.4 (C_{2'} and C_{5'}); 50.8 (C₃); 42.2 (C₁); 27.8 (C_b); 23.5 (C_{3'} and C_{4'}); 21.5 (C₄).

5. Synthesis of monocyclic derivatives

5.1 Compounds from strategy A

5.1.1 *Tert-butyl-3-bromopropylcarbamate (111)*²⁸⁴



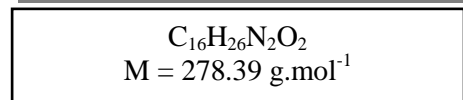
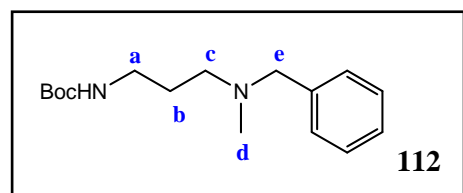
A 3.00 g (13.70 mmol) amount of 3-bromopropylamine hydrobromide was blended into 80 mL of dichloromethane. After addition of triethylamine (16.4 mmol, 2.32 mL) and di-*tert*-butylcarbonate (13.70 mmol, 3.00 g) the resulting mixture was stirred at room temperature overnight. Then, it was washed with 2 x 60 mL of a citric acid solution (5%) and 50 mL of saturated brine solution. The organic fraction was dried over magnesium sulphate and concentrated to give the desired product as yellowish liquid of sufficient purity for use without purification in the next step.

Aspect: yellowish liquid. **Yield:** 3.16 g (96%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.5

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 4.67 (br s, 1H, NH); 3.45 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 3.28 (q, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 2.06 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b); 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃).

5.1.2 *Tert-butyl-3-(N-benzyl-N-methylamino)propylcarbamate (112)*



A 936 μL (6.50 mmol) amount of *N*-methyl benzylamine was dissolved in 30 mL of DMF. A 1.83 g (13.00 mmol) amount of potassium carbonate was added and the resulting mixture was heated at 70°C. After 30 minutes, *tert*-butyl-3-bromopropylcarbamate **111** (8.44 mmol, 2.00 g) was added and the reacting mixture was heated at 70°C for 48 hours. Then, the solvent was removed under reduced pressure and 60 mL of water added to the residue. The product was extracted with 3 x 50 mL of dichloromethane. Purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 97:3, v/v) was performed.

Aspect: Yellow oil. **Yield:** 1.33 g (74%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.5

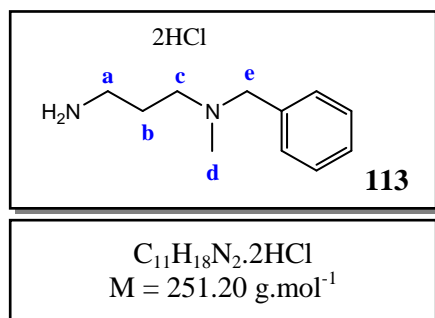
LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 279.2; Found: 279.1; 223.1 [M – *tert*But + H].

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.36-7.19 (m, 5H, H_{aro}); 5.61 (br s, 1H, NH); 3.48 (s, 2H, H_e); 3.20 (q, ³J = 6 Hz, 2H, H_a); 2.45 (t, ³J = 6 Hz, 2H, H_c); 2.17 (s, 3H, H_d); 1.68 (p, ³J = 6 Hz, 2H, H_b); 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 156.1 (CO); 139.0 (C_{aro}); 129.0 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 127.0 (C_{aro}); 78.7 (C(CH₃)₃); 62.7 (C_e); 56.5 (C_c); 42.1 (C_d); 40.1 (C_a); 28.5 (C(CH₃)₃); 26.6 (C_b).

²⁸⁴ I. Zlatev *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 7008-7014

5.1.3 *N*-benzyl-*N*-methylpropane-1,3-diamine dihydrochloride (**113**)



A 2.0 g (7.18 mmol) amount of *tert*-butyl-3-[*N*-benzyl-*N*-methylamino]propylcarbamate **112** was dissolved in 72 mL of 3M HCl in dry 1,4-dioxane. The resulting mixture was stirred at room temperature overnight. Then, the solvent was removed under reduced pressure to give the desired product of sufficient purity for use without purification in the next step.

Aspect: white solid. **Yield:** 1.80 g (100%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.1

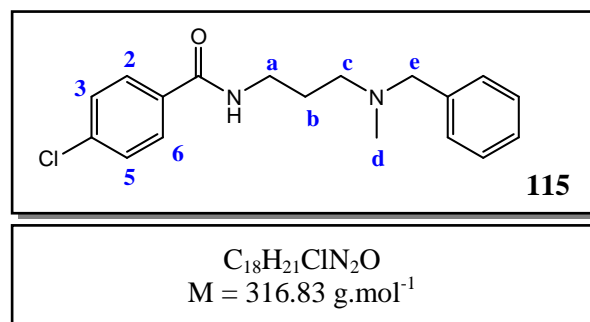
Melting point: 77°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H] free base: 179.1; Found: 179.0

¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 11.27 (br s, 1H, NH); 8.37 (br s, 3H, NH); 7.66-7.41 (m, 5H, H_{aro}); 4.27 (m, 2H, H_e), 3.27-2.28 (m, 4H, H_a and H_c); 2.60 (s, 2H, H_d); 2.13 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, DMSO-*d*₆), δ(ppm): 123.0 (C_{aro}); 130.3 (C_{aro}); 129.9 (2 C_{aro}); 129.2 (2 C_{aro}); 58.6 (C_e); 52.1 (C_c); 39.0 (C_d); 36.7 (C_a); 22.0 (C_b).

5.1.4 *N*-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-4-chlorobenzamide (**115**)



A solution of *N*-benzyl-*N*-methylpropan-1,3-diamine dihydrochloride **113** (2.05 mmol, 515 mg), and triethylamine (5.15 mmol, 3.6 mL) in 10 mL of dichloromethane was cooled at 0°C. A solution of 4-chlorobenzoylchloride (1.71 mmol, 0.218 mL) in 3 mL of dichloromethane was added slowly. The resulting mixture was stirred at room

temperature overnight. Then the solution was diluted with 30 mL of dichloromethane and washed successively with hydrochloric acid solution (2M), saturated sodium hydrogen carbonate solution and saturated brine. The organic fraction was dried over magnesium sulphate and concentrated to give the crude product as brown oil. Purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 330 mg (61%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 317.1; 319.1; Found: 316.9; 318.9

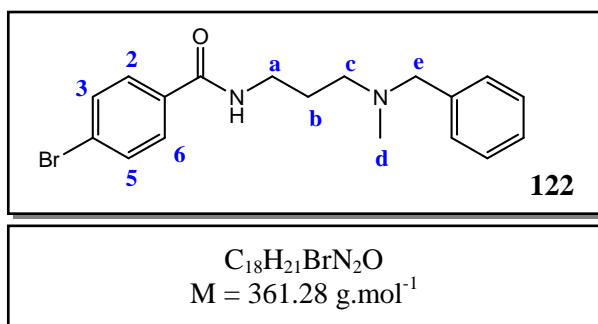
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 7.7 min; P_{HPLC} = 98%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 18.0 min; P_{HPLC} = 98%

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 8.25 (br s, 1H, NH); 7.60 (d, $^3J = 9$ Hz, 2H, H_{aro}); 7.33-7.21 (m, 7H, H_{aro}); 3.62-3.51 (m, 4H, H_a and H_e); 2.65 (t, $^3J = 5$ Hz, 2H, H_c); 2.27 (s, 3H, H_d); 1.83 (p, $^3J = 5$ Hz, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 166.0 (CO); 137.8 (C_{aro}); 137.3 (C_{aro}); 133.1 (C_{aro}); 129.4 (2 C_{aro}); 128.6 (2 C_{aro}); 128.5 (2 C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 127.5 (C_{aro}); 63.2 (C_c); 57.2 (C_c); 41.5 (C_d); 40.5 (C_a); 25.0 (C_b).

5.1.5 *N*-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-4-bromobenzamide (**122**)



Procedure D:

A 130 mg (0.65 mmol) amount of 4-fluorobenzoic acid, 164 mg (0.65 mmol) of *N*-benzyl-*N*-methylpropan-1,3-diamine dihydrochloride **113**, 150 mg (0.78 mmol) of HOBt, 300 mg (0.78 mmol) of HBTu, 1.27 mL (9.79 mmol) of DIEA and 15 mL of DCM were

used. After 12 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (DCM:MeOH(NH_3), 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 157 mg (67%)

TLC (DCM:MeOH(NH_3), 9:1, v/v): R_f = 0.5

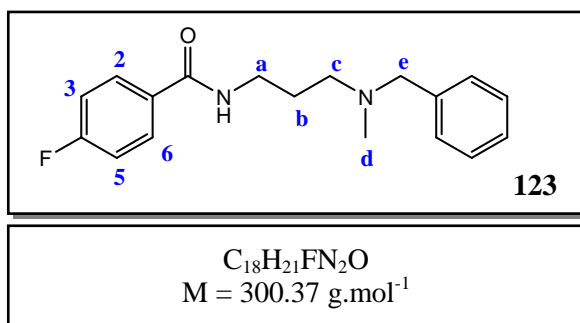
LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 361.1; 363.1; Found: 360.9; 362.9.

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 8.8 min; P_{HPLC} > 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 18.4 min; P_{HPLC} > 99%

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 8.29 (br s, 1H, NH); 7.60-7.40 (m, 4H, H_{aro}); 7.33-7.20 (m, 5H, H_{aro}); 3.65-3.47 (m, 4H, H_a et H_e); 2.66 (t, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_c); 2.29 (s, 3H, H_d); 1.84 (p, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 166.2 (CO); 137.5 (C_{aro}); 133.5 (C_{aro}); 131.6 (2 C_{aro}); 129.5 (2 C_{aro}); 128.6 (2 C_{aro}); 128.5 (C_{aro}); 127.7 (C_{aro}); 125.7 (C_{aro}); 63.0 (C_c); 57.0 (C_c); 41.4 (C_d); 40.3 (C_a); 24.9 (C_b).

5.1.6 *N*-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-4-fluorobenzamide (123)

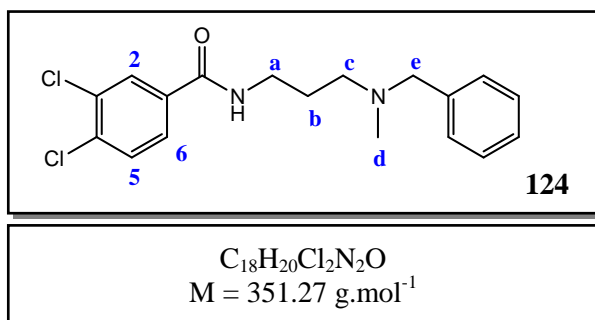
Procedure D:

A 90 mg (0.67 mmol) amount of 4-fluorobenzoic acid, 170 mg (0.67 mmol) of *N*-benzyl-*N*-methylpropan-1,3-diamine dihydrochloride **113**, 160 mg (0.81 mmol) of HOBt, 310 mg (0.81 mmol) of HBtu, 1.80 mL (10.15 mmol) of DIEA and 15 mL of DCM were used. After 12 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: yellowish oil. **Yield:** 119 mg (58%)**TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v):** R_f = 0.5**LCMS (ESI⁺):** Calc. for [M+H]: 301.2; 302.2; Found: 301.1; 302.1**HPLC (C₄, 35 min):** t_R = 8.4 min; P_{HPLC} > 99%**HPLC (C₁₈, 35 min):** t_R = 16.3 min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 8.20 (br s, 1H, NH); 7.66 (m, 2H, H₂ and H₆); 7.28-7.24 (m, 5H, H_{aro}); 7.00 (t, ³J_{3-F} = 9 Hz, 2H, H₃ and H₅); 3.60-3.52 (m, 4H, H_a et H_c); 2.65 (t, ³J = 6 Hz, 2H, H_c); 2.28 (s, 3H, H_d); 1.83 (p, ³J = 6 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 166.1 (CO); 164.5 (d, ¹J_{4-F} = 250 Hz, C₄); 137.6 (C_{aro}); 130.8 (d, ⁴J_{1-F} = 3 Hz, C₁); 129.5 (2 C_{aro}); 129.2 (d, ³J_{2-F} = 9 Hz, C₂ and C₆); 128.5 (2 C_{aro}); 127.6 (C_{aro}); 115.3 (d, ²J_{3-F} = 20 Hz, C₃ and C₅); 63.1 (C_e); 57.1 (C_e); 41.4 (C_d); 40.3 (C_a); 25.0 (C_b).

5.1.7 *N*-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-3,4-dichlorobenzamide (124)

Procedure D:

A 150 mg (0.78 mmol) amount of 3,4-dichlorobenzoic acid, 197 mg (0.78 mmol) of *N*-benzyl-*N*-methylpropan-1,3-diamine dihydrochloride **113**, 181 mg (0.94 mmol) of HOBt, 357 mg (0.94 mmol) of HBtu, 2.05 mL (11.77 mmol) of DIEA and 15 mL of DCM were

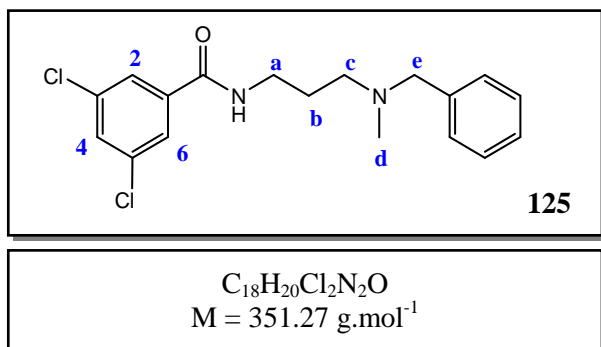
used. After 12 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 85 mg (31%)**TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v):** R_f = 0.5**LCMS (ESI⁺):** Calc. for [M+H]: 351.1; 353.1; Found: 350.9; 352.9**HPLC (C₄, 35 min):** t_R = 15.6 min; P_{HPLC} > 99%**HPLC (C₁₈, 35 min):** t_R = 19.8 min; P_{HPLC} > 99%

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 8.44 (br s, 1H, NH) ; 7.82 (d, $^4J_{2-6} = 2$ Hz, 1H, H₂) ; 7.47 (dd, $^3J_{6-5} = 8$ Hz, $^4J_{6-2} = 2$ Hz, 1H, H₆) ; 7.38 (d, $^3J_{5-6} = 8$ Hz, 1H, H₅) ; 7.31-7.22 (m, 5H, H_{aro}) ; 3.60 (s, 2H, H_e) ; 3.56 (q, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_a) ; 2.68 (t, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_c) ; 2.33 (s, 3H, H_d) ; 1.86 (p, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 164.9 (CO) ; 135.4 (C_{aro}) ; 134.5 (C_{aro}) ; 132.9 (C_{aro}) ; 130.4 (2 C_{aro}) ; 129.5 (2 C_{aro}) ; 129.3 (C_{aro}) ; 128.6 (2 C_{aro}) ; 127.8 (C_{aro}) ; 126.1 (C_{aro}) ; 62.8 (C_e) ; 56.7 (C_c) ; 41.4 (C_d) ; 40.3 (C_a) ; 24.7 (C_b).

5.1.8 *N*-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-3,5-dichlorobenzamide (**125**)



Procedure D:

A 150 mg (0.78 mmol) amount of 3,5-dichlorobenzoic acid, 197 mg (0.78 mmol) of *N*-benzyl-*N*-methylpropan-1,3-diamine dihydrochloride **113**, 187 mg (0.94 mmol) of HOBt, 357 mg (0.354 mmol) of HBTu, 2.05 mL (11.77 mmol) of DIEA and 15 mL of DCM were used. After 12 hours of reaction, purification by

thick layer chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 95 mg (34%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.6

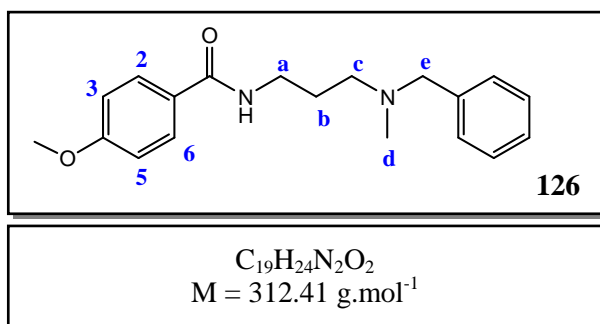
LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 351.1; 353.1; Found: 351.0; 353.0.

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 21.9 min; P_{HPLC} > 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 20.3 min; P_{HPLC} > 99%

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 8.42 (br s, 1H, NH) ; 7.55 (m, 2H, H₂ and H₆) ; 7.44 (m, 1H, H₄) ; 7.28-7.20 (m, 5H, H_{aro}) ; 3.57-3.51 (m, 4H, H_a et H_e) ; 2.63 (t, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_c) ; 2.32 (s, 3H, H_d) ; 1.82 (p, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 164.6 (CO) ; 137.7 (C_{aro}) ; 137.5 (C_{aro}) ; 135.3 (C_{aro}) ; 130.9 (2 C_{aro}) ; 129.3 (2 C_{aro}) ; 128.5 (2 C_{aro}) ; 127.6 (C_{aro}) ; 125.7 (2 C_{aro}) ; 63.0 (C_e) ; 56.7 (C_c) ; 41.8 (C_d) ; 40.7 (C_a) ; 24.8 (C_b).

5.1.9 *N*-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-4-methoxybenzamide (**126**)

Procedure D:

A 150 mg (0.98 mmol) amount of 4-methoxybenzoic acid, 247 mg (0.98 mmol) of *N*-benzyl-*N*-methylpropan-1,3-diamine dihydrochloride **113**, 227 mg (1.18 mmol) of HOBt, 449 mg (1.18 mmol) of HBtu, 2.60 mL (14.79 mmol) of DIEA and 15 mL of DCM were

used. After 12 hours of reaction, purification by thick layer chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 225 mg (73%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.4

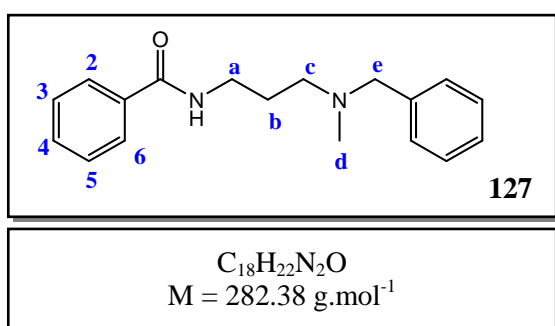
LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 313.2; Found: 313.1.

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 18.1 min; P_{HPLC} > 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 16.2 min; P_{HPLC} = 98%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.97 (br s, 1H, NH) ; 7.68-7.65 (m, 2H, H₂ and H₆); 7.32-7.24 (m, 5H, H_{aro}); 6.86-6.83 (m, 2H, H₃ and H₅); 3.84 (s, 3H, OCH₃); 3.60-3.52 (m, 4H, H_a et H_e); 2.65 (t, ³J = 6 Hz, 2H, H_c); 2.29 (s, 3H, H_d); 1.85 (p, ³J = 6 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 166.9 (CO); 162.0 (C₄); 137.2 (C_{aro}); 129.6 (2 C_{aro}); 128.8 (2 C_{aro}); 128.5 (2 C_{aro}); 127.7 (C_{aro}); 125.0 (C_{aro}); 113.6 (2 C_{aro}); 62.9 (C_e); 56.7 (C_c); 55.4 (OCH₃); 41.4 (C_d); 39.9 (C_a); 25.3 (C_b).

5.1.10 *N*-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]benzamide (**127**)

Procedure D:

A 80 mg (0.64 mmol) amount of benzoic acid, 172 mg (0.64 mmol) of *N*-benzyl-*N*-methylpropan-1,3-diamine dihydrochloride **113**, 150 mg (0.77 mmol) of HOBt, 290 mg (0.77 mmol) of HBtu, 1.68 mL (9.67 mmol) of DIEA and 15 mL of DCM were used. After 24 hours of reaction, purification by thick layer

chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: yellowish oil. **Yield:** 135 mg (75%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 283.2; Found: 283.1

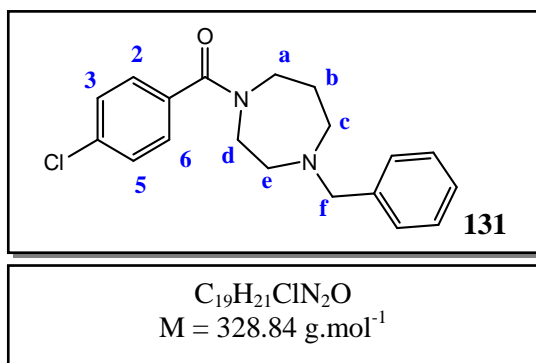
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 17.5 min; P_{HPLC} = 97%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 15.2 min; P_{HPLC} = 99%

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 8.05 (br s, 1H, NH); 7.70 (m, 2H, H_2 and H_6); 7.49-7.30 (m, 3H, H_3 , H_4 and H_5); 7.29-7.22 (m, 5H, H_{aro}); 3.61-3.52 (m, 4H, H_a et H_e); 2.65 (t, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_c); 2.29 (s, 3H, H_d); 1.84 (p, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 167.3 (CO); 137.8 (C_{aro}); 134.7 (C_{aro}); 131.1 (2 C_{aro}); 129.4 (2 C_{aro}); 128.4 (C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 127.4 (C_{aro}); 126.9 (2 C_{aro}); 63.1 (C_e); 56.9 (C_c); 41.6 (C_d); 40.1 (C_a); 25.3 (C_b).

5.1.11 *N*-(4-benzyl-1,4-diazepan-1-yl)-4-chlorobenzamide (131)



Procedure E:

A 100 mg (0.57 mmol) amount of 4-chlorobenzoylchloride, 108 μL (0.57 mmol) of *N*-benzylhomopiperazine, 200 μL (1.42 mmol) of Et_3N and 10 mL of DCM were used. Purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH_3), 96:4 (v/v)) was performed.

Aspect: yellow oil. **Yield:** 150 mg (80%)

TLC (DCM:MeOH(NH_3), 9:1, v/v): $R_f = 0.5$

LCMS (ESI^+): Calc. for $[\text{M}+\text{H}]$: 329.1; 331.1; Found: 329.0; 331.0

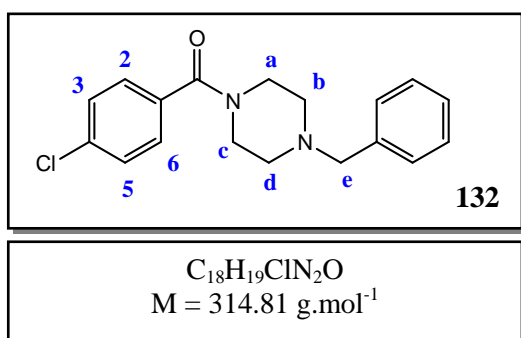
HPLC (C_4 , 35 min): $t_R = 11.4$ min; $P_{\text{HPLC}} > 99\%$

HPLC (C_{18} , 35 min): $t_R = 17.2$ min; $P_{\text{HPLC}} > 99\%$

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3 , 2 conformations), $\delta(\text{ppm})$: 7.47-7.17 (m, 9H, H_{aro}); 3.78 (m, 2H, H_a and H_d); 3.67 (s, 1H, H_f); 3.61(s, 1H, H_f); 3.42 (m, 2H, H_a and H_d); 2.80 (m, 1H, H_c); 2.72 (m, 1H, H_e); 2.59 (m, 2H, H_c and H_e); 1.97 (p, $^3J = 7$ Hz, 1H, H_b); 1.80 (p, $^3J = 7$ Hz, 1H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3 , 2 conformations), $\delta(\text{ppm})$: 170.5 (CO); 138.8 (C_{aro}); 135.3 (C_{aro}); 128.8 (C_{aro}); 128.7 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 128.2 (C_{aro}); 127.2 (C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 62.6 (C_f); 62.5 (C_f); 56.1 (C_e); 56.0 (C_e); 54.8 (C_c); 54.1 (C_c); 49.9 (C_d); 48.8 (C_d); 46.3 (C_a); 45.6 (C_a); 29.0 (C_b); 27.3 (C_b).

5.1.12 *N*-(1-benzylpiperazin-4-yl)-4-chlorobenzamide (132)



Procedure E:

A 100 mg (0.57 mmol) amount of 4-chlorobenzoylchloride, 101 mg (0.57 mmol) of 1-benzylpiperazine, 200 μL (1.42 mmol) of Et_3N and 10 mL of DCM were used. Purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH_3), 95:5 (v/v)) was performed.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 150 mg (83%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.7

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 315.1; 317.1; Found: 315.0; 317.0

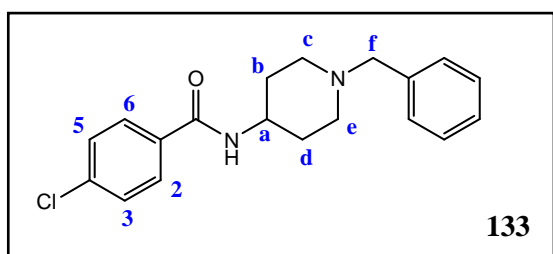
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 8.5 min; P_{HPLC} > 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 17.5 min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.45-7.21 (m, 9H, H_{aro}); 3.76 (br s, 2H, H_a and H_c); 3.54 (s, 2H, H_e); 3.42 (m, 2H, H_a and H_c); 2.45 (m, 4H, H_b et H_d).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 169.2 (CO); 137.5 (C_{aro}); 135.7 (C_{aro}); 134.2 (C_{aro}); 129.1 (2 C_{aro}); 128.7 (2 C_{aro}); 128.6 (2 C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 127.3 (C_{aro}); 62.9 (C_e); 53.2 (C_c); 52.8 (C_a); 47.8 (C_d); 42.3 (C_b).

5.1.13 N-(1-benzylpiperidin-4-yl)-4-chlorobenzamide (133)



133

C₁₉H₂₁ClN₂O
M = 328.84 g.mol⁻¹

Procedure E:

A 100 mg (0.57 mmol) amount of 4-chlorobenzoylchloride, 190 mg (0.57 mmol) of 4-amino-1-benzylpiperazine, 200 μL (1.42 mmol) of Et₃N and 10 mL of DCM were used. The crude product was obtained as a white solid and washed with diethyl ether and DCM to give the pure compound.

Aspect: white solid. **Yield:** 158 mg (84%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.6

Melting point: 186°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 329.1; 331.1; Found: 329.0; 331.0

HPLC (C₄, 35 min): t_R = 8.7 min; P_{HPLC} > 99%

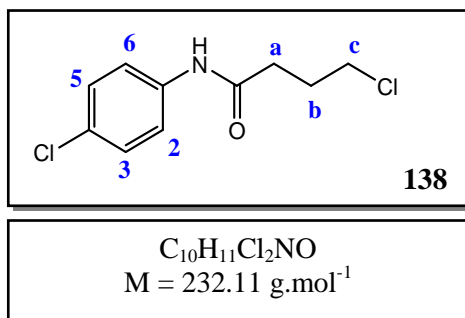
HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 17.7 min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.70 (d, ³J = 9 Hz, 2H, H₂ and H₆); 7.41 (d, ³J = 9 Hz, 2H, H₃ and H₅); 7.35-7.27 (m, 5H, H_{aro}); 5.91 (br s, 1H, NH); 4.01 (m, 1H, H_a); 3.53 (s, 2H, H_f); 2.87 (m, 2H, H_c and H_e); 2.19 (m, 2H, H_c and H_e); 2.02 (m, 2H, H_b and H_d); 1.50 (m, 2H, H_b and H_d).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 165.7 (CO); 138.3 (C_{aro}); 137.6 (C_{aro}); 133.1 (C_{aro}); 129.1 (2 C_{aro}); 128.8 (2 C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 128.2 (2 C_{aro}); 127.1 (C_{aro}); 63.1 (C_f); 52.3 (C_c et C_e); 47.2 (C_a); 32.3 (C_b et C_d).

5.2 Compounds from strategy B

5.2.1 4-chloro-N-(4-chlorophenyl)butanamide (138)



To a solution of 4-chloroaniline (1g, 7.8 mmol) in 15 mL of DCM at 0°C was added slowly a solution of 4-chlorobutyryl chloride (878 μL , 7.8 mmol) in 5 mL of DCM. The resulting mixture was stirred at room temperature for 12 hours. Then the reaction was quenched with 25 mL of water and the product extract with 3x25 mL of DCM. The combined organic fractions were dried over magnesium sulphate and concentrated to give the desired product with sufficient purity to be used without purification in the next step.

Aspect: white solid. **Yield:** 1.572 g (87%)

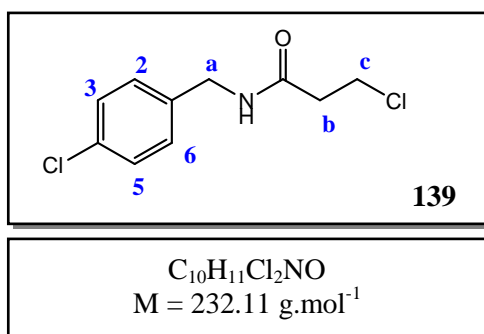
TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.7

Melting point: 98°C

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.75 (br s, 1H, NH); 7.46 (d, ³J = 9 Hz, 2H, H₂ and H₆); 7.26 (d, ³J = 9 Hz, 2H, H₃ and H₅); 3.65 (t, ³J = 6 Hz, 2H, H_c); 2.55 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 2.18 (p, ³J = 6 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.0 (CO); 136.2 (C_{aro}); 129.4 (C_{aro}); 129.0 (2 C_{aro}); 121.1 (2 C_{aro}); 44.4 (C_c); 34.1 (C_a); 27.8 (C_b).

5.2.2 N-(4-chlorobenzyl)-3-chloropropanamide (139)



To a solution of 4-chlorobenzylamine (862 μL , 7.0 mmol) in 15 mL of DCM at 0°C was added slowly a solution of 3-chloropropionyl chloride (668 μL , 7.0 mmol) in 5 mL of DCM. The resulting mixture was stirred at room temperature for 12 hours. Then the reaction was quenched with 20 mL of water and the product extract with 3x25 mL of DCM. The combined organic fractions were dried over magnesium sulphate. The crude product was purified by column chromatography (ethyl acetate: cyclohexane, 1:1 (v/v)).

Aspect: white solid. **Yield:** 971 g (60%)

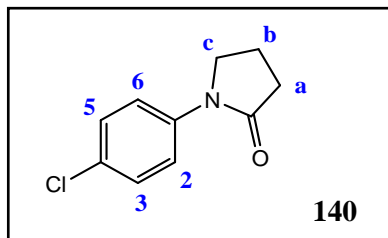
TLC (CycloHex:EtOAc, 1:1, v/v): R_f = 0.4

Melting point: 123°C

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm): : 7.35-7.30 (m, 2H, H₂ and H₆); 7.25-7.20 (m, 2H, H₃ and H₅); 5.94 (br s, 1H, NH); 4.45 (d, ³J = 6 Hz, 2H, H_a); 3.84 (t, ³J = 6 Hz, 2H, H_c); 2.67 (t, ³J = 6 Hz, 2H, H_b).

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 169.4 (CO); 136.4 (C_{aro}); 133.4 (C_{aro}); 129.1 (2 C_{aro}); 128.9 (2 C_{aro}); 43.1 (C_a); 40.1 (C_c); 39.6 (C_b).

5.2.3 1-(4-chlorophenyl)pyrrolidin-2-one (140)



$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{ClNO}$
 $M = 195.65 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of *N*-methyl-*N*-benzylamine (106 μL , 0.82 mmol) in 10 mL of DMF was added a 340 mg (2.46 mmol) amount of potassium carbonate. The resulting mixture was stirred at 70°C. After 30 minutes, the 4-chloro-*N*-(4-chlorophenyl)butanamide **138** (210 mg, 0.91 mmol) was added and the reacting mixture was stirred at 70°C overnight. The solvent was removed under reduced pressure and 15 mL of water added to the residue. The crude product was extracted with 3x15 mL of DCM. The combined organic fractions were washed with water and dried over magnesium sulphate. Purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH_3), 99:1 (v/v)) was performed.

Aspect: white solid. **Yield:** 120 mg (67%)

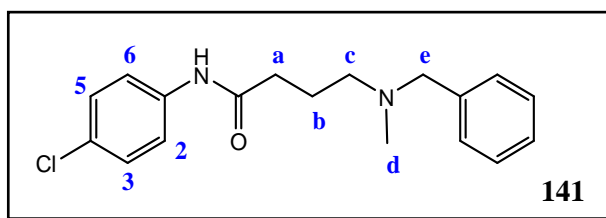
TLC (DCM:MeOH(NH_3), 9:1, v/v): $R_f = 0.7$

Melting point: 94°C

^1H NMR (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 7.63-7.55 (m, 2H, H_2 and H_6); 7.36-7.29 (m, 2H, H_3 and H_5); 3.84 (t, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 2H, H_c); 2.62 (t, $^3J = 8 \text{ Hz}$, 2H, H_a); 2.16 (p, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 2H, H_b).

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 174.2 (CO); 138.0 (C_{aro}); 129.4 (C_{aro}); 128.8 (2 C_{aro}); 120.9 (2 C_{aro}); 48.6 (C_c); 32.6 (C_a); 17.8 (C_b).

5.2.4 4-(*N*-benzyl-*N*-methyamino)-*N*-(4-chlorophenyl)butanamide (141)



$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}$
 $M = 316.83 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

A solution of 4-chloro-*N*-(4-chlorophenyl)butanamide **138** (300 mg, 1.29 mmol) in 1 mL of *N*-benzylmethylamine (7.75 mmol) was stirred at room temperature for 12 hours. A 5 mL amount of hexane was added and the white solid was filtered. It was identified as *N*-benzylmethylamine hydrochloride. The filtrate was concentrated and purified by thick layer chromatography (cyclohexane: ethyl acetate: MeOH(NH_3), 45:45:10 (v/v)) to give compound **141**.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 287 mg (70%)

TLC (CycloHex:EtOAc:MeOH(NH_3), 45:45:10, v/v): $R_f = 0.5$

LCMS (ESI⁺): Calc. for $[\text{M}+\text{H}]$: 317.1; 319.1; Found: 317.2; 319.2

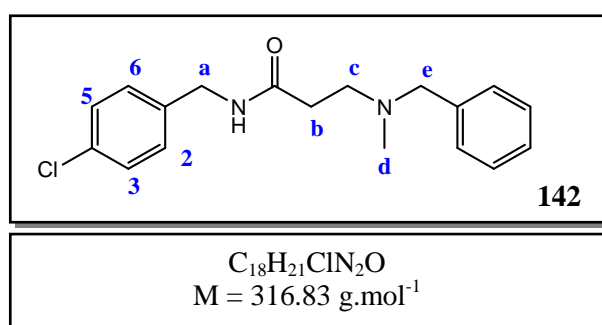
HPLC (C_4 , 35 min): $t_R = 8.6$ min; $P_{\text{HPLC}} = 99\%$

HPLC (C_{18} , 35 min): $t_R = 20.2$ min; $P_{\text{HPLC}} = 98\%$

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 9.63 (br s, 1H, NH); 7.45 (d, $^3J = 9$ Hz, 2H, H_2 and H_6); 7.34-7.27 (m, 5H, H_{aro}); 7.21 (d, $^3J = 9$ Hz, 2H, H_3 and H_5); 3.69 (s, 2H, H_e); 2.62 (t, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_c); 2.51 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H, H_a); 2.35 (s, 3H, H_d); 1.96 (p, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 171.4 (CO); 137.2 (C_{aro}); 135.9 (C_{aro}); 129.7 (2 C_{aro}); 128.8 (2 C_{aro}); 128.7 (2 C_{aro}); 128.5 (2 C_{aro}); 128.0 (C_{aro}); 120.8 (C_{aro}); 62.2 (C_e); 56.5 (C_c); 41.4 (C_d); 36.2 (C_a); 22.2 (C_b).

5.2.5 *N*-(4-chlorobenzyl)-3-(*N*-benzyl-*N*-methyamino)propanamide (**142**)



A solution of *N*-(4-chlorobenzyl)-3-chloropropanamide **139** (50 mg, 0.21 mmol) in 166 μL of *N*-benzylmethylamine (1.29 mmol) was stirred at room temperature for 12 hours. A 5 mL amount of hexane was added and the white solid was filtered. It was identified as *N*-benzylmethylamine hydrochloride. The filtrate

was concentrated and purified by thick layer chromatography (cyclohexane: ethyl acetate: MeOH(NH_3), 45:45:10 (v/v)) to give compound **142**.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 45 mg (67 %)

TLC (CycloHex:EtOAc:MeOH(NH_3), 45:45:10, v/v): $R_f = 0.4$

LCMS (ESI⁺): Calc. for $[\text{M}+\text{H}]$: 317.1; 319.1; Found: 316.9; 318.9

HPLC (C_4 , 35 min): $t_R = 10.0$ min; $P_{\text{HPLC}} > 99\%$

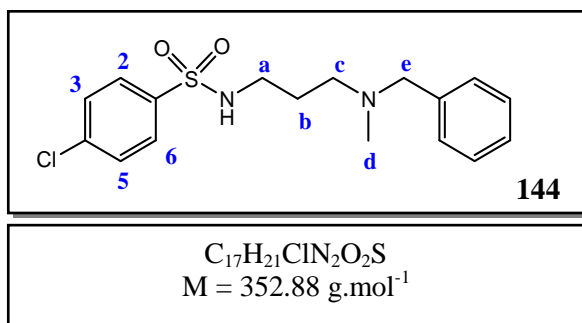
HPLC (C_{18} , 35 min): $t_R = 19.1$ min; $P_{\text{HPLC}} > 99\%$

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 8.65 (br s, 1H, NH); 7.34-7.19 (m, 7H, H_2 , H_6 and H_{aro}); 7.09 (d, $^3J = 9$ Hz, 2H, H_3 and H_5); 4.38 (d, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_a); 3.57 (s, 2H, H_e); 2.79 (t, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_c); 2.56 (t, $^3J = 6$ Hz, 2H, H_b); 2.25 (s, 3H, H_d).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 171.9 (CO); 137.2 (C_{aro}); 133.1 (C_{aro}); 129.3 (2 C_{aro}); 129.2 (3 C_{aro}); 128.8 (2 C_{aro}); 128.6 (2 C_{aro}); 127.9 (C_{aro}); 62.0 (C_e); 53.0 (C_c); 42.6 (C_a); 40.7 (C_d); 32.4 (C_b).

5.3 Other modulations

5.3.1 *N*-[3-(*N*-benzyl-*N*-methylamino)propyl]-4-chlorobenzensulfonamide (144)



A solution of *N*-benzyl-*N*-methylpropan-1,3-diamine dihydrochloride (1.06 mmol, 267 mg), and triethylamine (3.55 mmol, 0.5 mL) in 2 mL of dichloromethane was cooled at 0°C. A solution of 4-chlorobenzosulfonamide chloride (0.71 mmol, 150 mg) in 3 mL of dichloromethane was added slowly. The resulting mixture was stirred at room

temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and 15 mL of dichloromethane was added to the residue. The solution was washed with 15 mL of HCl (1M) solution and then 15 mL of NaCl saturated solution. The organic layer was dried over sulfate magnesium. A purification by thick layer chromatography (petroleum ether:DCM:MeOH(NH₃), 5:4:1 (v/v)) was performed.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 150 mg (60%)

TLC (PE:DCM:MeOH(NH₃), 5:4:1, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 353.1; 355.1; Found: 353.0; 355.0

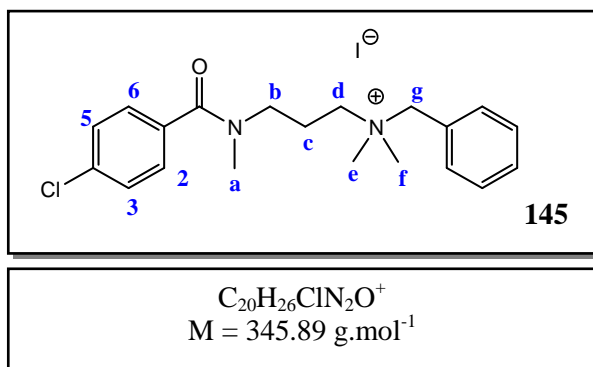
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 13.8 min; P_{HPLC} > 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 18.6 min; P_{HPLC} > 99%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.76 (d, ³J = 9 Hz, 2H, H₂ and H₆); 7.47(d, ³J = 9 Hz, 2H, H₃ and H₅); 7.36-7.22 (m, 5H, H_{aro}); 3.46 (s, 2H, H_e); 3.05 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 2.45 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.18 (s, 3H, H_d); 1.67 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 138.8 (C_{aro}); 138.7 (C_{aro}); 137.9 (C_{aro}); 129.3 (2 C_{aro}); 129.0 (2 C_{aro}); 128.6 (2 C_{aro}); 128.5 (2 C_{aro}); 127.4 (C_{aro}); 62.8 (C_e); 56.8 (C_e); 44.0 (C_d); 41.9 (C_a); 24.7 (C_b).

5.3.2 *N*-benzyl-3-(4-chloro-*N*-methylbenzamido)-*N,N*-dimethylpropan-1-aminium (145)



The reaction was carried out under nitrogen atmosphere. A solution of *N*-[3-(benzylmethylamino)propyl]-4-chlorobenzamide **115** (40 mg, 0.13 mmol) and NaH 60% (20.2 mg, 0.50 mmol) in 3 mL of THF was cooled at 0°C. A 31 μL (0.50 mmol) amount of iodomethane was added drop by drop. The resulting mixture was stirred at room temperature for 12 hours. The

reaction was quenched with 10 mL of water and the product was extracted with 3 x 15 mL of DCM. The combined organic fractions were dried over magnesium sulphate and concentrated to give the crude product as yellow oil. Purification by thick layer chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 9:1 (v/v)) was performed.

Aspect: Yellow oil. **Yield:** 36 mg (80%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.4

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 346.2; 348.2; Found: 346.3; 348.3

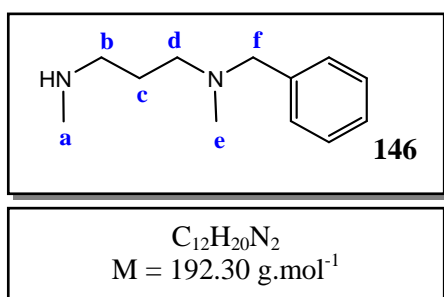
HPLC (C₄, 35 min): t_R = 10.6 min; P_{HPLC} = 99%

HPLC (C₁₈, 35 min): t_R = 17.8 min; P_{HPLC} = 98%

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.71-7.59 (m, 2H, H₂ and H₆); 7.53-7.38 (m, 7H, H₃, H₅ and H_{aro}); 4.97 (s, 2H, H_g); 3.76-3.55 (m, 4H, H_b and H_d); 3.32 (s, 6H, H_e and H_f); 3.09 (s, 3H, H_a); 2.47-2.17 (m, 2H, H_c).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.1 (CO); 136.0 (C_{aro}); 133.9 (C_{aro}); 133.1 (2 C_{aro}); 131.1 (2 C_{aro}); 129.4 (2 C_{aro}); 128.9 (C_{aro}); 128.7 (C_{aro}); 126.7 (2 C_{aro}); 67.8 (C_g); 61.9 (C_d); 50.2 (C_e and C_f); 45.1 (C_b); 38.7 (C_a); 21.4 (C_c).

5.3.4 *N*-benzyl-*N,N'*-dimethylpropane-1,3-diamine (146)



To a solution of *N*-methylamine (2.00 g, 10.1 mmol) in 5 mL of acetonitrile was added a 2.00 g (10.1 mmol) amount of *N*-benzyl-3-chloro-*N*-methylpropan-1-amine hydrochloride **28**. The resulting mixture was brought to reflux overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product purified by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 98:2 to 90:1 (v/v))

Aspect: White solid. **Yield:** 1.72 g (88%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 95:5, v/v): R_f = 0.4

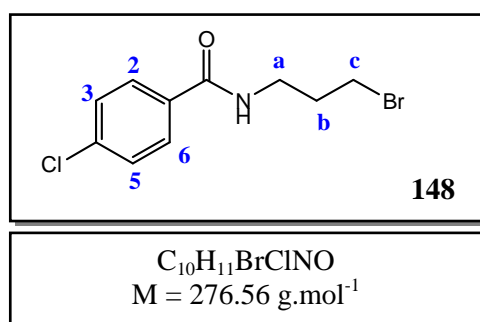
Melting point: 34°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 193.1; Found: 193.2

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.38-7.24 (m, 5H, H_{aro}); 3.49 (s, 2H, H_f); 2.88 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_b); 2.58-2.51 (m, 5H, H_a and H_d); 2.32 (s, 3H, H_e); 1.94 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_c).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 138.0 (C_{aro}); 129.2 (C_{aro}); 128.4 (C_{aro}); 127.4 (C_{aro}); 62.4 (C_f); 54.7 (C_d); 49.3 (C_b); 41.8 (C_e); 33.6 (C_a); 23.4 (C_c).

5.3.5 N-(3-bromopropyl)-4-chlorobenzamide (148)



To a solution of 3-bromopropylamine hydrobromide (625 mg, 2.86 mmol) in 10 mL of DCM at 0°C was added slowly a solution of 4-chlorobenzoyl chloride (363 μL, 2.86 mmol) in 5 mL of DCM. The resulting mixture was stirred at room temperature for 12 hours. Then the solution was diluted with DCM and washed successively with HCl (2M) solution, NaHCO₃ saturated solution and NaCl solution. The organic layer was dried over magnesium sulfate and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (DCM: cyclohexane, 2:1 to 1:0 (v/v)).

Aspect: white solid. **Yield:** 520 mg (65%)

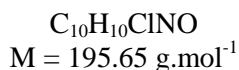
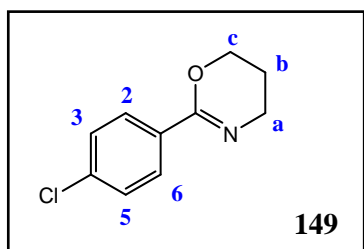
TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.7

Melting Point: 84°C

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 276.0; 278.0; Found: 276.0; 278.0

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.72 (d, ³J = 9 Hz, 2H, H₂ and H₆); 7.38(d, ³J = 9 Hz, 2H, H₃ and H₅); 6.69 (s, br, 1H, NH); 3.60 (q, ³J = 7 Hz, 2H, H_a); 3.48 (t, ³J = 7 Hz, 2H, H_c); 2.19 (p, ³J = 7 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 166.8 (CO); 137.8 (C_{aro}); 132.7 (C_{aro}); 128.8 (2 C_{aro}); 128.4 (2 C_{aro}); 38.8 (C_a); 32.0 (C_b); 31.0 (C_c).

5.3.6 2-(4-chlorophenyl)-5,6-dihydro-4H-1,3-oxazine (149)²⁶⁴

To a solution of isoindoline (20.4 μL , 0.18 mmol) in 1 mL of DMF was added a 24 mg (0.18 mmol) amount of potassium carbonate. The resulting mixture was stirred at 70°C. After 30 minutes, the 4-chloro-*N*-(3-bromopropyl)-4-chlorobenzamide **148** (50 mg, 0.18 mmol) was added and the reacting mixture was stirred at 70°C overnight. The solvent was removed under reduced pressure and 15 mL of water added to the residue. The crude product was extracted with 3x15 mL of DCM. The combined organic fractions were washed with water and dried over magnesium sulphate. Purification by column chromatography (DCM:MeOH(NH₃), 99:1 (v/v)) was performed.

Aspect: colourless oil. **Yield:** 25 mg (70%)

TLC (DCM:MeOH(NH₃), 9:1, v/v): R_f = 0.5

LCMS (ESI⁺): Calc. for [M+H]: 196.0; 198.0; Found: 196.0; 198.0

¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.83 (d, ³J = 9 Hz, 2H, H₂ and H₆); 7.34 (d, ³J = 9 Hz, 2H, H₃ and H₅); 4.36 (t, ³J = 6 Hz, 2H, H_a); 3.61 (t, ³J = 6 Hz, 2H, H_c); 1.99 (p, ³J = 6 Hz, 2H, H_b).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ (ppm): 154.7 (OCN); 136.4 (C_{aro}); 132.6 (C_{aro}); 128.3 (2 C_{aro}); 128.2 (2 C_{aro}); 65.2 (C_c); 42.6 (C_a); 21.9 (C_c).

II. Pharmacological evaluations

1. Binding assay to σ receptors

The σ binding assays were performed by CEREP (Paris, France), according to Ganapathy *et al*²⁵⁵. The σ_1 binding assay was carried out by incubating Jurkat cell membranes (10-20 mg protein per tube) with [³H](+)-pentazocine (15 nM) and a range of concentrations of tested compounds, at 37°C for 2 hours, in 5 mM Tris/HCl buffer (pH = 7.4). The σ_2 binding assay was performed by incubating Jurkat cell membranes (10-20 mg protein per tube) with [³H]-DTG (25 nM) in presence of (+)-pentazocine (1 μ M) to saturate σ_1 receptors, and a range of concentrations of tested compounds, at room temperature for 1 hour in 5 mM Tris/HCl buffer (pH = 7.4). The final assay volume was 0.5 mL. Binding was terminated by rapid filtration through Wathman GF/B filters, which were then washed with 5 x 1 mL ice-cold NaCl solution and allowed to dry before bound radioactivity was measured using liquid scintillation counting. Nonspecific binding was determined, in both assays, under similar conditions, but in presence of 10 μ M unlabeled haloperidol. Inhibition constants (K_i) were calculated from the IC_{50} values according to the method of Cheng and Prusoff (1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{L}{K_d}}$$

Where IC_{50} = Inhibitory concentration at 50%

L = Concentration of radioligand

K_d = Affinity constant of radioligand

The σ_1 binding assay was carried out with [³H](+)-pentazocine (L = 15 nM, K_d = 16 nM) as radioligand and the σ_2 binding assay with [³H]-DTG (L = 25 nM, K_d = 80.84 nM).

2. Cell culture and cytotoxicity assay

The human neuroblastoma cell line (SY5Y) was cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 μ g/ml streptomycin, 100 UI/ml penicillin, 1 mM non-essential amino acids, 10 % (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma aldrich) and grown at 37°C in a humidified incubator containing 5 % CO_2 .

Cells were seeded on 2000 cells per well onto 96-well plates in DMEM medium. Cells were starved for 24 hours for culture synchronization and were then incubated in culture medium that contained various concentrations of test compounds, each dissolved in less than 0.1 % DMSO. After 72 hours of incubation, cell growth was estimated by the colorimetric MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) assay.

3. Anti-Alzheimer activity

The evaluation of anti-Alzheimer activity was performed by Sabiha Eddarkaoui within the unity UMR 837-1 (Lille).

3.1 Cell culture and transfection for testing activity on A β _{1–40} and A β _{1–42} secretion

The human neuroblastoma cell line SKNSH-SYSY (ATCC® Catalog No. CRL-2266™), HEK (ATCC® CRL-1573™) and COS-1 (ATCC® CRL-1650™) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO BRL) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM non-essential amino acids, 50 units/ml penicillin/streptomycin (Invitrogen, France) in a 5% CO₂ humidified incubator at 37°C. APP695 cDNA was subcloned into eukaryotic expression vector pcDNA3 (Invitrogen), allowing for a G418 (Invitrogen) selection of clones. This APP cDNA was transfected into SKNSH-SYSY cells using the ethyleneimine polymer ExGen 500 (Euromedex) according to the manufacturer's instructions. Cells expressing APP (SKNSH-SYSY APP^{WT}) were selected by the addition of 200 µg/ml G418 in the cell medium. For quantification of A β released in the cell culture medium, the collected medium was spun at 200×g to eliminate the cell debris. Secreted A β _{1–40} and A β _{1–42} concentrations were determined using the Human A β (1–40) Assay Kit (IBL) or the INNOTEST™ beta-Amyloid (1–42) ELISA Kit (Innogenetics), according to manufacturer's instructions. Results were expressed as IC₅₀, the concentration able to decrease to 50% the quantity of secreted A β .

3.2 Quantification of APP-CTF and AICD

After treatments, SY5Y-APP^{WT} cells were scrapped and lysed in 1× Lysis Buffer (250 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.8, 5 mM EDTA, 2.5% Triton X-100, 1% Deoxycholate, 0.1% SDS). For Western blotting equal quantity of total proteins (20 µg/lane) was loaded on a 16.5% Tris–tricine or 8–16% Tris–glycine polyacrylamide gel.

SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed using the Criterion™ Tris-Tricine-precast or Bis-Tris-precaster criterion gels (Bio-Rad Bioresearch division). Proteins were transferred to 0.2 cm² nitrocellulose membrane (Hybond, Amersham Biosciences) at 2.5 mA/cm² per gel using the Criterion™ Blotter system (Amersham Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Proteins were reversibly stained with Ponceau Red to check the quality of protein transfer. Membranes were blocked in 25 mM Tris–HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 (v/v) and 5% (w/v) of skimmed milk for 30 min. Membranes were incubated overnight at 4°C with appropriate dilutions of the primary antibodies and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibody. The immunoreactive complexes were revealed using the ECL™ Western Blotting kit and LAS-3000 Chemiluminescence Camera acquisition system (FujiFilm). Quantification were

calculated with Image J software (NIH) and data were collected using Excel Software (Microsoft). Loading variations between Western blot lanes were normalized according to the tubulin signal. Quantification of CTF α and AICD were compared to control conditions (considered as 100 in arbitrary units) and are presented for 2 concentrations of the drug : 1 and 10 μ M.

4. ADME

The ADME studies were performed by CEREP (Paris, France). A chromatogram of the test compound (200 μ M), along with a UV/Vis spectrum with labeled absorbance maxima, was generated.

4.1 Aqueous solubility²⁸⁵

Aqueous solubility (μ M) was determined by comparing the peak area of the principal peak in a calibration standard (200 μ M) containing organic solvent (methanol/water, 60/40, v/v) with the peak area of corresponding peak in buffer sample. In addition, chromatographic purity (%) was defined as the peak area of the principal peak relative to the total integrated peak area in the HPLC chromatogram of the calibration standard. A chromatogram of the calibration standard of each test compound, along with a UV/Vis spectrum with labeled absorbance maxima, was generated.

4.2 Partition coefficient²⁶⁶

The total amount of compound was determined as the peak area of the principal peak in a calibration standard (100 μ M) containing organic solvent (methanol/water, 60/40, v/v). The amount of compound in buffer was determined as the combined, volume-corrected, and weighted areas of the corresponding peaks in the aqueous phase of the three organic-aqueous samples of different composition. An automated weighting system was used to ensure the preferred use of raw data from those samples with well quantifiable peak signals. The amount of compound in organic was calculated by subtraction. Subsequently, Log D was calculated as the Log₁₀ of the amount of compound in the organic phase divided by the amount of compound in the aqueous phase.

4.3 Plasma protein binding²⁶⁷

Dialysis membrane strips were presoaked and rinsed prior to use. Following assembly of the 96-well dialysis apparatus, 0.15 mL of phosphate buffer was added to the dialysate side of each well. Plasma (unfiltered) was spiked with the test compound (10 μ M), and 0.15 mL added to the sample side of each well. The dialysis plate was sealed and incubated with shaking at 37°C until equilibrium was reached (at least 8 hours). Equal volumes of sample were removed from the buffer and plasma

²⁸⁵ C. A. Lipinski *et al.*, *Adv. Drug Del. Rev.*, **1997**, 23, 3-25

sides of each well, diluted with acetonitrile and then centrifuged. Also at this time, an additional sample was prepared (in duplicate) by spiking the test compound in plasma at 10 μM , followed by sampling and diluting in acetonitrile/ buffer in the same manner as incubated plasma sample. This reference sample serves as the basis of a recovery determination. The supernatant of all samples was then analyzed by HPLC-MS/MS. The peak area of the test compound in the test buffer and plasma samples was used to calculate percent binding according to the following formula:

$$\text{Protein Binding (\%)} = \frac{(Area_{pe} - Area_{be}) \times \frac{V_{pe}}{V_{pi}}}{\left[(Area_{pe} - Area_{be}) \times \frac{V_{pe}}{V_{pi}} \right] + Area_{be}} \times 100$$

Where $Area_{pe}$ = Peak area of analyte in plasma at equilibrium

$Area_{be}$ = Peak area of analyte in buffer at equilibrium

V_{pe} = Volume of plasma at equilibrium

V_{pi} = Initial volume of plasma

The sum of the peak area of the test compound in the test buffer and plasma samples compared to the average peak area in the reference plasma samples was used to calculate percent recovery according to the following formula:

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{(Area_{pe} + Area_{be})}{Area_{cs}} \times 100$$

Where $Area_{pe}$ = Peak area of analyte in plasma at equilibrium

$Area_{be}$ = Peak area of analyte in buffer at equilibrium

$Area_{cs}$ = Average peak area of analyte in reference plasma sample

4.4 A-B permeability²⁶⁸

The apparent permeability coefficient (P_{app}) of the test compound in the apical to the basolateral direction was calculated as follows:

$$P_{app} (cm/s) = \frac{V_R \times C_{R60}}{\Delta t} \times \frac{1}{A \times (C_{D,mid} - C_{R,mid})}$$

Where V_R = Volume of the receiver chamber

C_{R60} = Concentration of the test compound in the receiver chamber at $t = 60$ min

Δt = Incubation time (60 minutes)

A = Surface area of the cell monolayer

$C_{D, mid}$ = Calculated mid-point concentration of the test compound in the donor side

$C_{R, mid}$ = Mid-point concentration of the test compound in the receiver side

$C_{D, mid}$ is the mean value of the donor concentration at time 0 and the donor concentration at time 60 minutes. $C_{R, mid}$ is one half of the receiver concentration at time 60 minutes. Concentrations of the test compound are expressed as peak areas of the test compound.

The recovery of the test compound was calculated as follows:

$$recovery (\%) = \frac{V_D \times C_{D60} + V_R \times C_{R60}}{V_D \times C_{D0}} \times 100$$

Where V_R = Volume of the receiver chamber

V_D = Volume of the donor chamber

C_{D60} = Concentration of the test compound in the donor sample at $t = 60$ min

C_{R60} = Concentration of the test compound in the receiver sample at $t = 60$ min

C_{D0} = Concentration of the test compound in the donor sample at $t = 0$ min

Concentrations of the test compound are expressed as peak areas of the test compound.

4.5 Metabolic stability²⁶⁹

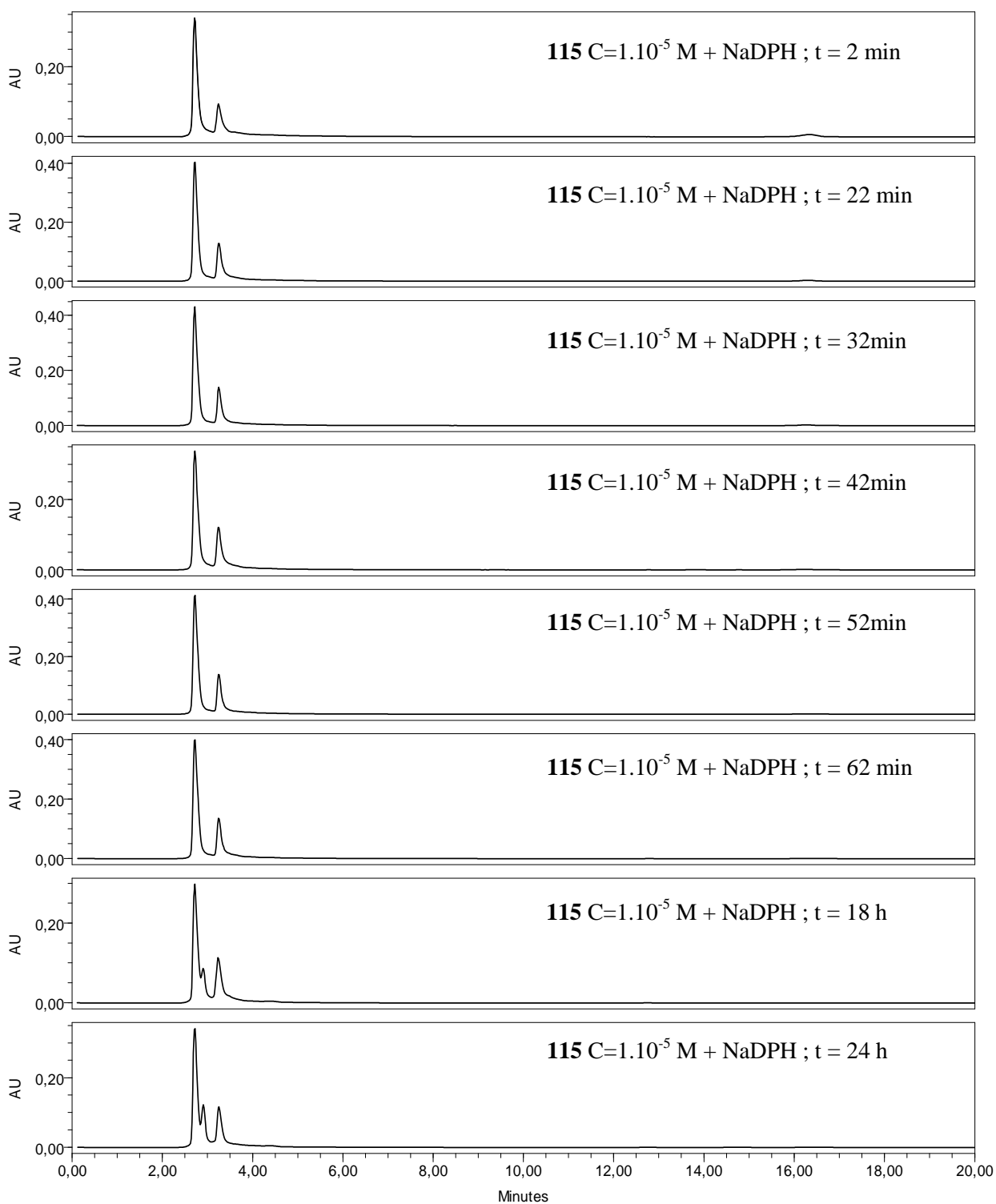
Human liver microsomes (0.1 mg/mL) were used for this study. At each end of incubation at each of the time points (0, 15, 30, 45, 60 minutes), an equal volume of an organic mixture (acetonitrile/methanol, 50/50, v/v) was added to the incubation mixture followed by centrifugation. Samples were analyzed by HPLC-MS/MS. Peak areas corresponding to the analytes were determined by HPLC-MS/MS. The ratio of precursor compound remaining at the end of the incubation relative to the amount remaining at time zero, expressed as percent, is reported as metabolic stability.

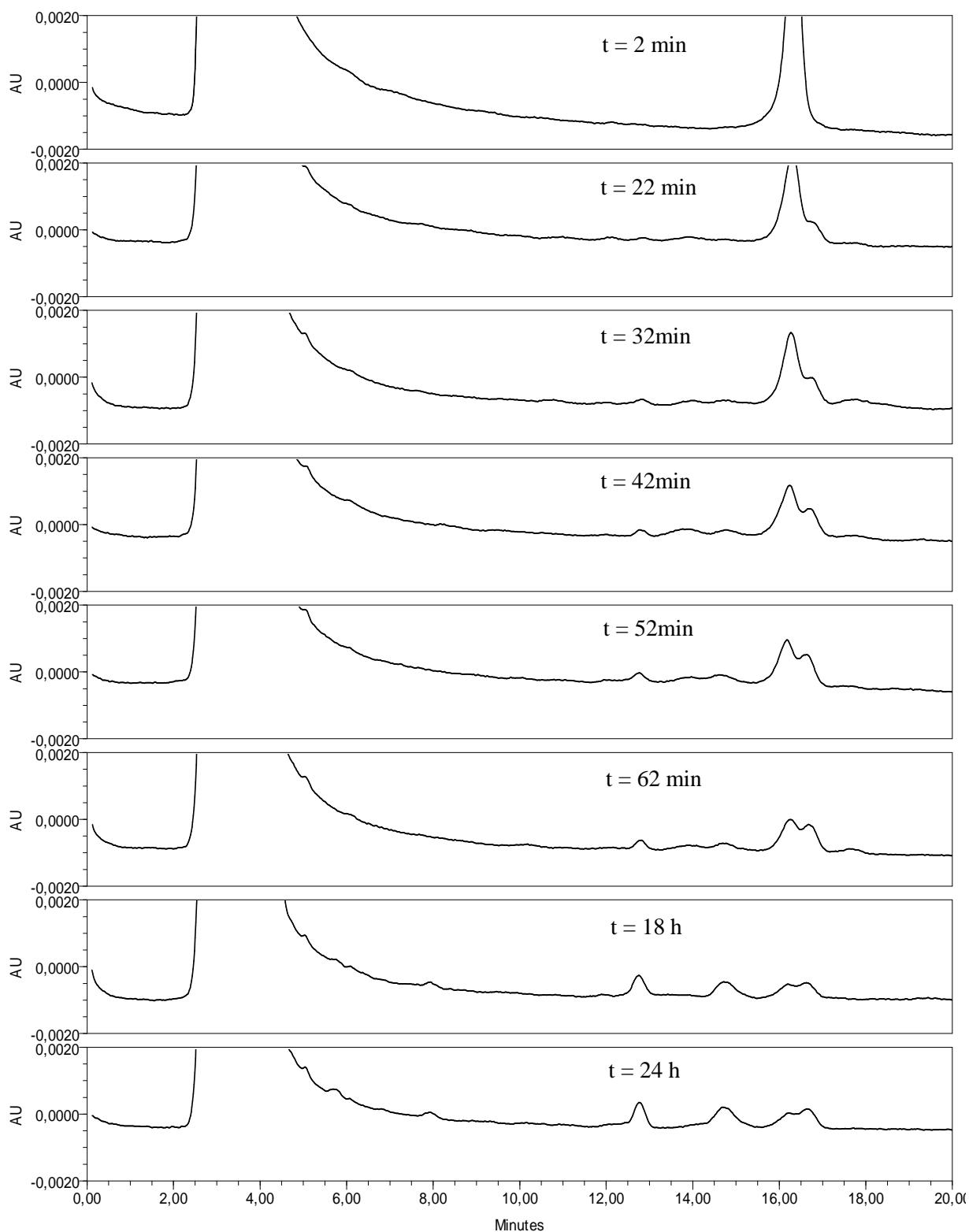
4.6 Cinetic of metabolisation

This study was performed by Dr Emmanuelle Lipka within the Laboratory of analytica chemistry (EA 4481, Lille).

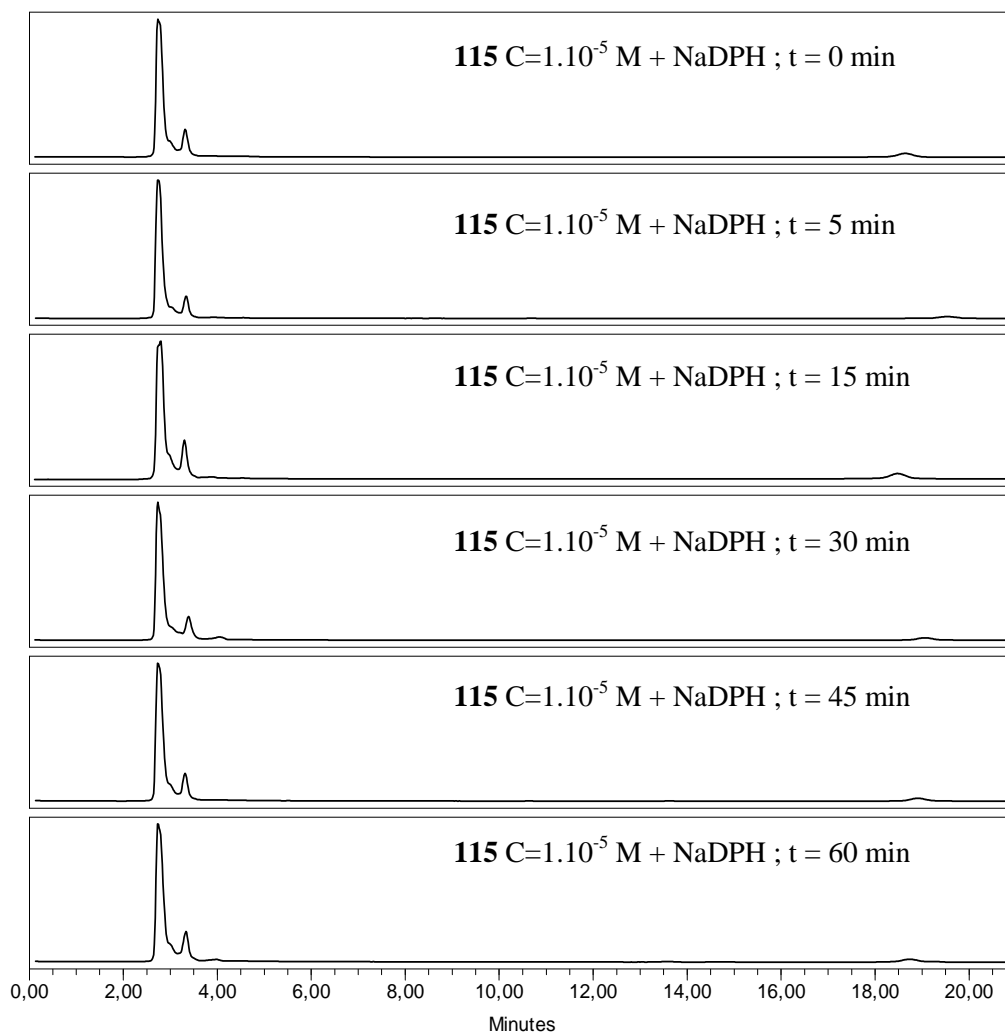
Human liver microsomes (0.3 mg/mL) and mouse liver microsomes (0.3 mg/mL) were used for this study. At each end of incubation at each of the time points (0, 15, 30, 45, 60 minutes), an equal volume of a cold organic solvent (acetonitrile) was added to the incubation mixture followed by centrifugation. Samples were analyzed by HPLC-UV. Peak areas corresponding to the analytes were determined by HPLC-UV. The ratio of precursor compound remaining at the end of the incubation relative to the amount remaining at time zero, expressed as percent, is reported as metabolic stability.

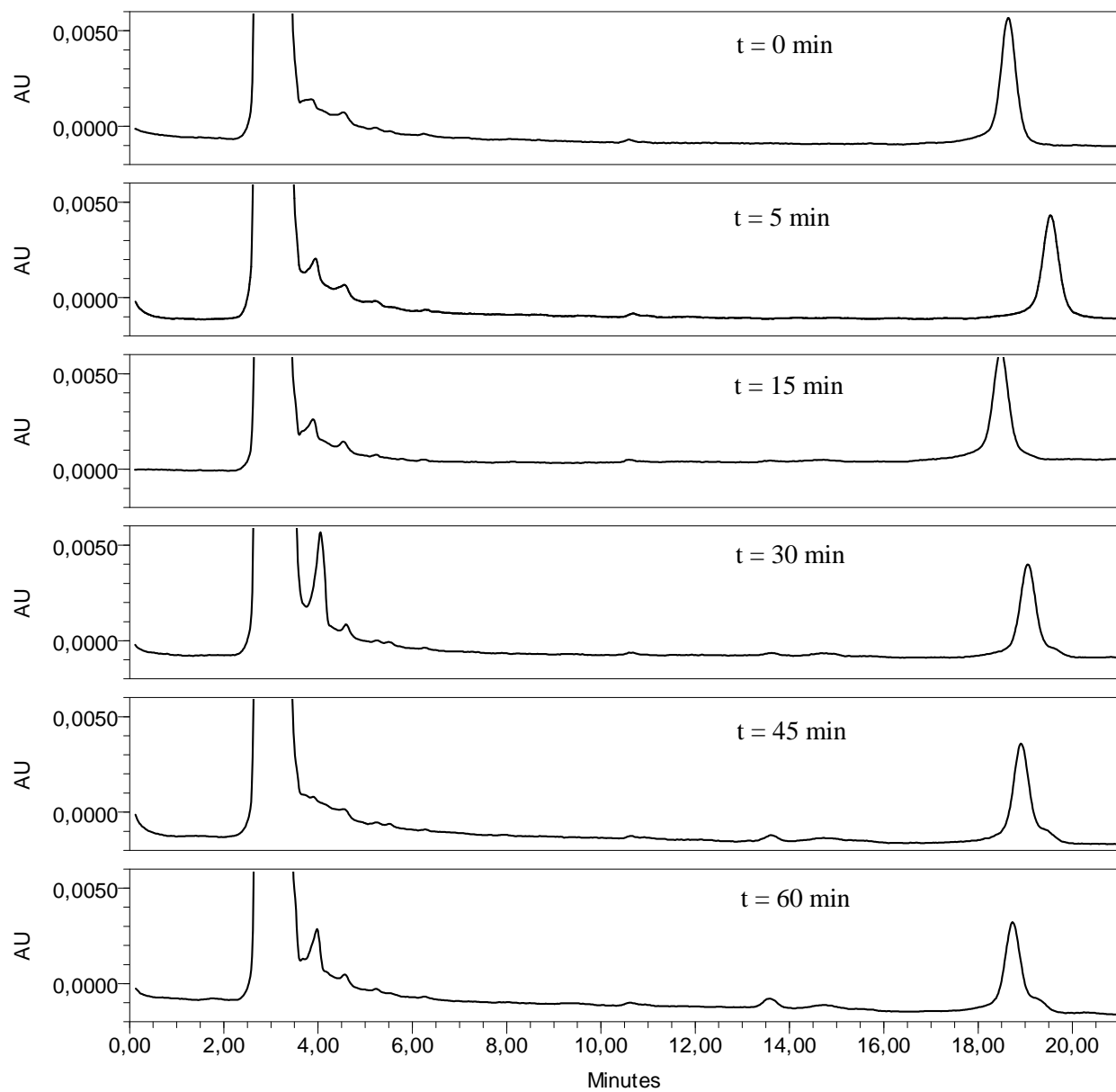
HPLC chromatograms: Mouse liver microsomes





HPLC chromatograms: Human liver microsomes





5. Behavioral tests

The study was performed by Amylgen (Montpellier, France).

5.1 Experimental design

Two hundred and sixty (260) mice were used. Behavioral testing started one week after the arrival of the animals in the AMYLGEN animal facility. Twenty two groups were used as follows:

Treatments	Mice
1. Vehicle + vehicle	16
2. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + vehicle	16
3. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 38 (0.1 mg/kg)	8
4. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 38 (0.5 mg/kg)	8
5. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 38 (1 mg/kg)	12
6. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 38 (5 mg/kg)	8
7. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 38 (10 mg/kg)	8
8. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 79 (0.1 mg/kg)	12
9. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 79 (0.5 mg/kg)	12
10. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 79 (1 mg/kg)	16
11. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 79 (5 mg/kg)	8
12. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 79 (10 mg/kg)	8
13. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 115 (0.1 mg/kg)	18
14. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 115 (0.5 mg/kg)	18
15. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 115 (1 mg/kg)	16
16. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 115 (5 mg/kg)	8
17. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 115 (10 mg/kg)	8
18. Vehicle + vehicle	12
19. Dizocilpine + vehicle	12
20. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 115 (0.5 mg/kg)	12
21. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + 115 (0.5 mg/kg) + NE-100 (3 mg/kg)	12
22. Dizocilpine (0.15 mg/kg) + NE-100 (3 mg/kg)	12

The compounds **38** and **115** appeared hardly soluble in saline solution or water. A vehicle solution of DMSO 2% in water was chosen for these two compounds. Only compound **79** was solubilized in

water. Vehicle solutions were physiological saline for dizocilpine, DMSO 2% in water for **38** and **115**, water for **79**.

Animals were used at day 1 in the Y-maze test and at days 2 and 3 in the passive avoidance test, with training at day 2 and retention at day 3.

Test compounds, **38**, **79**, **115**, and antagonist NE-100 were administered 10 minutes before dizocilpine or vehicle.

Dizocilpine (at 0.15 mg/kg *i.p.*) or vehicle was administered 20 minutes before the Y-maze test session on day 1 and the passive avoidance training session on day 2. Drugs were not injected before the retention session on day 3.

5.2 Animals

Male Swiss mice, 6 weeks old and weighing 30-35 g, from JANVIER (Saint Berthevin, France), were kept for housing and experiments took place in AMYLGÉN's animal facility in the University of Montpellier 2 (CECEMA, Office of Veterinary Services agreement # B-34-172-23). Animals were housed in groups with access to food and water *ad libitum*, except during experiments. They were kept in a temperature and humidity controlled animal facility on a 12 h/12 h light:dark cycle (lights on at 7:00 am). Behavioral experiments were carried out between 09:00 am and 05:00 pm, in a sound attenuated and air-regulated experimental room, to which mice were habituated at least 30 min. Mice were numbered by marking their tail using permanent markers and sacrificed immediately after the passive avoidance retention session. All animal procedures were conducted in strict adherence to the European Union Directive 86-609, modified by the decrees 87-848 and 2001-464.

5.3 Spontaneous alternation performances

Animals were tested for spontaneous alternation performance in the Y-maze, an index of spatial working memory. The Y-maze is made of grey polyvinylchloride. Each arm is 40 cm long, 13 cm high, 3 cm wide at the bottom, 10 cm wide at the top, and converging at an equal angle. Each mouse was placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze during an 8 min session. The series of arm entries, including possible returns into the same arm, were checked visually. An alternation was defined as entries into all three arms on consecutive occasions. The number of maximum alternations was therefore the total number of arm entries minus two and the percentage of alternation was calculated as: (actual alternations / maximum alternations) x 100. Parameters included the percentage of alternation (memory index) and total number of arm entries (exploration index). Animals showing an extreme behavior (alternation < 20% or > 90% or number of arm entries < 10) are usually discarded from the calculations.

5.4 Step-through passive avoidance test

The apparatus is a two-compartment (15 × 20 × 15 cm high) box with one illuminated with white polyvinylchloride walls and the other darkened with black polyvinylchloride walls and a grid floor. A guillotine door separates each compartment. A 60 W lamp positioned 40 cm above the apparatus lights up the white compartment during the experiment. Scrambled footshocks (0.3 mA for 3 s) could be delivered to the grid floor using a shock generator scrambler (Lafayette Instruments, Lafayette, USA). The guillotine door is initially closed during the training session. Each mouse was placed into the white compartment. After 5 seconds, the door was raised. When the mouse entered the dark compartment and placed all its paws on the grid floor, the door was closed and the footshock delivered for 3 seconds. The step-through latency (the latency spent to enter the dark compartment) and the number of vocalizations was recorded. The retention test was carried out after 24 hours. Each mouse was placed again into the white compartment. After 5 seconds, the door was opened. The step-through latency was recorded up to 300 seconds. When the mouse entered the dark compartment or 300 seconds has elapsed (they were therefore manually placed in it), the escape latency (latency to exit from the dark compartment) was recorded up to 300 seconds.

6. Multiple sclerosis: EAE model

The evaluation of neuroprotective properties was performed by Dr Benedicte Oxombre-Vanteghem within the laboratory of immunity (EA 8626, Lille).

6.1 Animals

Female SJL/J mice were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France) and bred under conventional barrier protection at the Lille Pasteur Institut (Lille, France). All experiments protocols and procedures were in compliance with the European Communities Council Directives of 24 November 1986 (86/609/EEC) and were approved by the local ethical committee (AF 10/2009). Efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. Animals that reached score 3 were isolated, and hydration and food access were facilitated.

6.2 EAE induction and treatment

The method of EAE induction was similar to those published previously.²⁸⁶ Randomized SJL/J mice were inoculated s.c. in the neck with an emulsion containing 100 µg of PLP₁₃₉₋₁₅₁ peptide and an equal volume of CFA containing 4mg/ml of heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Labs., Detroit, MI, USA) on day 0. Additionally, mice received 0.3 µg of BPT (Sigma–Aldrich) *i.p.* on days 0 and 3. Compounds **A₅** and **115** were dissolved in physiological saline and

²⁸⁶ C. Lee-Chang *et al.*, *Immunol. Lett.*, **2011**, 135, 108-117

injected *i.p* on day 0. Control animals received one administration of saline solution. SJL/J that only received CFA and BPT or PBS, were also included in the experiments. Mice showed no apparent toxic side effects of any treatment protocols.

6.3 Clinical scoring of EAE

Mice were weighed daily, and arbitrary graded by a double blinded investigator according to the following scale: grade 0 = no disease, grade 0.5 = tail slightly hypotonic, grade 1 = moderate tail hypotonia and/or slight clumsy gait, grade 1.5 = severe tail hypotonia and/or slight clumsy gait, grade 2 = tail atony and/or clumsy gait, grade 2.5 = moderate hind limb paresis, grade 3 = severe hind limb paresis, grade 3.5 = one hind limb paralysis, grade 4 = paraplegia, grade 4.5 = three limb paralysis, grade 5 = tetraplegia. Incidence of EAE corresponds to the frequency of the new cases reaching grade 2. For compound **A₅**, 19 mice per group in 2 independent experiments were analyzed. For compound **115**, 15 mice per group in only one experiment were analysed.

6.4 Histology

After spleen and CLNs isolation, mice were intracardiac perfused with 4% of paraformaldehyde (Carlo Erba Reactifs, France) solution in saline. Brain and spinal cord were removed, post-fixed for at least 4h in the same fixative followed by 12h in 20% sucrose solution before embedded in ice-cold OCT (Optimal Cutting Temperature embedding medium, Cell Path, United Kingdom), frozen in isopentane (-55 °C), and stored at -80 °C until sectioning.

Using a cryostat, 12µm serial coronal sections from 5 levels of the neuroaxis (corpus callosum/striatum, cerebellum/brainstem, cervical, thoracic and lumbar spine cords) were cut and collected on Superfrost/Plus slides (Thermo Scientific, France) and kept at -80 °C until use. Brain and spinal cord sections were stained by conventional hemalum/eosin (H&E) or luxol fast blue (LFB) and examined by light microscopy in a blinded manner. Inflammation was quantified by counting the mononuclear cell infiltration foci (at least 20 clustered mononuclear cells) in the meninges and parenchyma by a double blinded investigator. An arbitrary score from 0 to 4 was determined as follows: 0 = no mononuclear cell infiltration, 1 = few cellular infiltrates only in perivascular and/or meninges area, 2 = mild cellular infiltrates (≤ 10), 3 = moderate cellular infiltrates (11–20), 4 = severe cellular infiltrates (>20). The mean histological score was calculated for each group.

BIBLIOGRAPHIE

279. Altenbach, R. J.; Black, L. A.; Strakhova, M. I.; Manelli, A. M.; Carr, T. L.; Marsh, K. C.; Wetter, J. M.; Wensink, E. J.; Hsieh, G. C.; Honore, P.; Garrison, T. R.; Brioni, J. D.; Cowart, M. D., Diaryldiamines with Dual Inhibition of the Histamine H3 Receptor and the Norepinephrine Transporter and the Efficacy of 4-(3-(Methylamino)-1-phenylpropyl)-6-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy)naphthalen-1-ol in Pain. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7869-7873.
280. Turk, C. F.; Krapcho, J., 1-(3-Dimethylaminopropyl)-2-methyl-2-phenyl-1-indanol and Related Compounds. A New Class of Analgesic Agents. *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 823-825.
281. Kucherova, N. F.; Aksanova, L. A.; Sharkova, L. M.; Zagorevskii, V. A., A new synthesis of benzofuro[3,2-c]pyridines. *Chem. Heterocycl. Comp.* **1973**, *9*, 835-837.
282. Harbert, C. A.; Plattner, J. J.; Welch, W. M.; Weissman, A.; Koe, B. K., Neuroleptic activity in 5-aryltetrahydro- γ -carbolines. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 635-643.
283. Hau, C.-K.; He, H.; Lee, A. W. M.; Chik, D. T. W.; Cai, Z.; Wong, H. N. C., Enantioselective Brønsted base catalyzed [4+2] cycloaddition using novel amino-substituted tetraphenylene derivatives. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9860-9874.
284. Zlatev, I.; Giraut, A.; Morvan, F.; Herdewijn, P.; Vasseur, J.-J., δ -Di-carboxybutyl phosphoramidate of 2'-deoxycytidine-5'-monophosphate as substrate for DNA polymerization by HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7008-7014.
285. 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 Del. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
286. Lee-Chang, C.; Lefranc, D.; Salleron, J.; Faveeuw, C.; Allet, C.; Vermersch, P.; Oxombre, B.; Prin, L., Susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with altered B-cell subsets distribution and decreased serum BAFF levels. *Immunol. Lett.* **2011**, *135*, 108-117.

Conception, synthèse et évaluation de nouveaux ligands de la protéine sigma-1 à visée neuroprotectrice.

Les maladies neurodégénératives (MNDs) sont les troubles neurologiques les plus fréquents chez l'homme et touchent des millions de personnes à travers le monde. Elles affectent le fonctionnement du système nerveux de façon chronique et progressive et conduisent souvent au décès du malade. L'évolution de ces maladies est très variable et les traitements disponibles actuellement ne permettent pas de modifier leur progression mais seulement d'atténuer les manifestations symptomatiques.

Les récepteurs σ_1 correspondent à une classe unique de récepteurs transmembranaires du réticulum endoplasmique. Exprimés au niveau du SNC et en particulier dans les neurones, les lymphocytes et les oligodendrocytes, ces récepteurs sont connus pour être impliqués dans la régulation de nombreux neurotransmetteurs. Même si les mécanismes de transduction après leur activation ne sont pas complètement élucidés, de plus en plus d'études mettent en évidence le potentiel thérapeutique de ces récepteurs. En effet, depuis leur découverte, les récepteurs σ_1 ont été impliqués dans de nombreuses pathologies dont des MNDs.

Ces travaux de thèse s'inscrivent donc dans ce contexte. Le projet consistait à concevoir, synthétiser et évaluer de nouveaux ligands σ_1 pour une utilisation en neuroprotection. Les dérivés tétrahydroquinolin-hydantoïnes préalablement conçus au laboratoire, ont montré des affinités nanomolaires envers la protéine σ_1 , une bonne sélectivité, une faible cytotoxicité et des propriétés ADME compatibles avec un développement thérapeutique. Évalués dans différents modèles, ces composés ont montrés des propriétés anti-inflammatoires associées à une action neuroprotectrice. Cependant, bien que les Tic-hydantoïnes soient des composés chimiquement stables, ils ont montré une faible stabilité métabolique. Trois nouvelles familles de composés ont donc été conçues et synthétisées afin de pallier ces problèmes. Leurs affinités, sélectivités, cytotoxicités et propriétés ADME ont été évaluées. Des tests comportementaux ont également été réalisés sur les composés les plus intéressants afin de déterminer leur profil agoniste ou antagoniste. Finalement, le meilleur candidat, évalué dans un modèle *in vivo* de sclérose en plaques, a montré des propriétés neuroprotectrices intéressantes.

Conception, synthesis and evaluation of novel sigma-1 receptor ligands as neuroprotective agents

Neurodegenerative diseases are the most common neurological disorders in humans, affecting millions of people worldwide. They affect the nervous systems in chronic and progressive way and often lead to the death of the patient. The evolution of these diseases is highly variable and currently available treatments do not alter their growth but only moderate symptomatic manifestations.

σ_1 receptors represent a structurally unique class of transmembrane receptors of the endoplasmic reticulum. Expressed in the central nervous system and especially in neurons, lymphocytes and oligodendrocytes, these receptors are known to be involved in the regulation of numerous neurotransmitters. Even if the signal transduction pathway after activation of σ_1 receptors is not completely understood, more and more evidences suggest that they represent a potential therapeutic target in many diseases. Indeed, since their discovery, the σ_1 receptors have been implicated in various pathologies including neurodegenerative disorders.

Thus, it is in this context that our interest is focused on the conception and synthesis of novel σ_1 receptors ligands for the treatment of neurodegenerative diseases. Fused and optimized tetrahydroquinoline-hydantoin derivatives designed in our laboratory showed nanomolar σ_1 affinity, σ_2/σ_1 selectivity, very low cytotoxicity and ADME properties compatible with therapeutic development. Evaluated in different models, these compounds showed an anti-inflammatory activity associated with a neuroprotective action. However, while the Tic-Hydantoin derivatives are chemically stable, they showed a low metabolic stability. Thus, three novel families of compounds were synthesized in order to compensate for these problems. Their affinities, selectivities, cytotoxicities and their ADME properties were evaluated. Behavioural testing was carried out on the most interesting compounds to determine the agonist or antagonist profil. Finally, evaluated in *in vivo* model of multiple sclerosis, the best compound showed interesting neuroprotective properties.