



HAL
open science

Conception et synthèse de sondes fluorescentes et d'agonistes des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine : application mécanistique et thérapeutique

Elsa Pffimlin

► To cite this version:

Elsa Pffimlin. Conception et synthèse de sondes fluorescentes et d'agonistes des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine : application mécanistique et thérapeutique. Biophysique. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAF055 . tel-01408451

HAL Id: tel-01408451

<https://theses.hal.science/tel-01408451>

Submitted on 5 Dec 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
UMR 7200-Laboratoire d'Innovation Thérapeutique

THÈSE

présentée par

Elsa PFLIMLIN

soutenue le **31 octobre 2013**

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline / Spécialité : Chimie biologique thérapeutique

**Conception et synthèse de sondes fluorescentes et d'agonistes
des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine :
application mécanistique et thérapeutique.**

THÈSE dirigée par :

HIBERT Marcel

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

BRION Jean-Daniel

Professeur, Université Paris Sud

MAHUTEAU-BETZER Florence

Docteur, Institut Curie

AUTRES MEMBRES DU JURY :

DURROUX Thierry

Docteur, Université de Montpellier, INSERM

KLYMCHENKO Andrey

Docteur, Université de Strasbourg

BONNET Dominique

Docteur, Université de Strasbourg

Table des matières

| | |
|---|----|
| Table des matières | 1 |
| Remerciements | 13 |
| Liste des abréviations..... | 19 |
| Introduction..... | 25 |
| Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)..... | 26 |
| 1. Contexte historique | 26 |
| 2. Caractérisations des RCPG | 26 |
| i. Structure des RCPG..... | 26 |
| ii. Classification des RCPG..... | 28 |
| a. Famille de la sécrétine..... | 29 |
| b. Famille de l'adhésine..... | 29 |
| c. Famille du récepteur glutamate..... | 30 |
| d. Famille des récepteurs frizzled et des récepteurs du goût | 30 |
| e. Famille de la rhodopsine | 30 |
| iii. Structure des protéines G..... | 31 |
| a. Famille de protéines $G\alpha$ | 31 |
| b. Familles de protéines $G\beta$ et γ | 32 |
| c. Interaction du complexe hétérotrimérique avec le récepteur | 32 |
| 3. Mécanisme d'activation des RCPG | 33 |
| i. Evolution des modèles | 33 |
| ii. Classifications des ligands | 35 |
| iii. Transduction du signal | 36 |
| iv. Activation du récepteur..... | 36 |
| v. Activation de la protéine G hétérotrimérique..... | 36 |
| vi. Transduction du signal | 37 |
| a. Les protéines $G\alpha$ | 37 |
| b. Les β -arrestines | 38 |
| vii. Arrêt de la transduction du signal | 39 |
| a. Désensibilisation..... | 39 |
| b. Internalisation | 40 |
| I. Les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine..... | 40 |

| | | |
|------|---|----|
| 1. | Contexte historique | 40 |
| i. | Classification des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine..... | 40 |
| ii. | Le récepteur de la vasopressine V_{1a} | 41 |
| iii. | Le récepteur de la vasopressine V_{1b} | 41 |
| iv. | Le récepteur de la vasopressine V_2 | 41 |
| v. | Le récepteur de l'ocytocine | 42 |
| 2. | Génomique..... | 42 |
| 3. | Pharmacologie des récepteurs vasopressine et ocytocine..... | 42 |
| 4. | Architecture fonctionnelle des récepteurs ocytocine et vasopressine | 44 |
| 5. | Rôles centraux des récepteurs V_{1a} et OT | 50 |
| i. | Attachement mère-enfant et père-enfant | 51 |
| ii. | Attachement au sein d'un couple | 51 |
| iii. | Attachement dans un groupe..... | 52 |
| iv. | Spectre de l'autisme..... | 53 |
| a. | Etudes chez les souris, rats et campagnols | 53 |
| b. | Etudes chez le singe..... | 54 |
| c. | Etudes chez l'homme | 54 |
| II. | Les ligands des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine..... | 55 |
| 1. | Biosynthèse et sécrétion..... | 55 |
| 2. | Structure | 57 |
| 3. | Ligands synthétiques..... | 58 |
| i. | Ligands du récepteur de l'ocytocine | 59 |
| a. | Antagonistes non-peptidiques | 59 |
| b. | Agonistes non-peptidiques..... | 63 |
| ii. | Ligands du récepteur de la vasopressine V_{1a} | 64 |
| a. | Antagonistes non-peptidiques | 64 |
| b. | Agonistes non-peptidiques..... | 68 |
| | Objectifs | 71 |
| | Partie 1 : Développement des tests de liaisons par TR-FRET des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine et étude de l'hétérodimérisation des récepteurs V_{1a} et V_2 | 75 |

| | |
|--|-----|
| Partie 1 Chapitre 1 : Développement de tests de liaison par TR-FRET pour les récepteurs de la vasopressine V _{1a} et de l'ocytocine | 77 |
| I. Introduction..... | 81 |
| 1. Fluorescence | 81 |
| 2. FRET..... | 83 |
| 3. TR-FRET | 85 |
| II. Conception des premiers ligands fluorescents non-peptidiques des récepteurs V _{1a} de la vasopressine et de l'ocytocine | 87 |
| 1. Introduction | 87 |
| 2. Synthèse et évaluation de ligands fluorescents non-peptidiques..... | 89 |
| III. Développement de tests de liaisons par TR-FRET pour les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine | 92 |
| 1. Introduction | 92 |
| 2. Validation des tests de liaison par TR-FRET | 93 |
| IV. Conclusion | 96 |
| I. Introduction..... | 103 |
| 1. Rôle de la dimérisation des RCPG | 103 |
| i. Maturation et adressage cellulaire | 104 |
| ii. Régulation par le ligand..... | 105 |
| iii. Diversité Pharmacologique | 106 |
| iv. Transduction du signal | 106 |
| v. Internalisation | 107 |
| vi. Nouveaux traitements basés sur l'oligomérisation des RCPG | 107 |
| 2. Dimérisation des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine | 108 |
| II. Conception des ligands fluorescents des récepteurs de la vasopressine V _{1a} et V ₂ | 108 |
| 1. Conception des ligands fluorescents du récepteur de la vasopressine V _{1a} | 109 |
| 2. Conception des ligands fluorescents du récepteur de la vasopressine V ₂ | 110 |
| III. Etude de l'hétérodimérisation des récepteurs V _{1a} et V ₂ | 111 |

| | | |
|---|---|-----|
| 1. | Introduction | 111 |
| 2. | Etude de l'hétérodimérisation V_{1a}/V_2 avec des ligands fluorescents peptidiques et non-peptidiques | 111 |
| 3. | Etude de l'hétérodimérisation V_{1a}/V_2 avec des ligands fluorescents non-peptidiques..... | 113 |
| 4. | Détection de l'affinité des ligands pour l'hétérodimère V_{1a}/V_2 | 114 |
| IV. | Conclusion | 116 |
| Partie 2 : Conception et synthèse d'agonistes non-peptidiques des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine. | | |
| | | 117 |
| Partie 2 Chapitre 1 : Criblage à haut débit pour accélérer la découverte d'agonistes non-peptidiques des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine V_{1a} | | |
| | | 119 |
| I. | Chimiothèques à cribler | 123 |
| II. | Criblage à haut débit sur le récepteur de l'ocytocine..... | 123 |
| III. | Criblage à haut débit sur le récepteur de la vasopressine V_{1a} | 124 |
| 1. | Criblage par liaison..... | 124 |
| 2. | Criblage par fonction..... | 125 |
| IV. | Criblage à haut débit d'extraits de substances naturelles | 128 |
| 1. | 1 ^{re} campagne..... | 128 |
| 2. | 2 ^{ème} campagne | 129 |
| V. | Conclusion | 129 |
| Partie 2 Chapitre 2 : Conception, synthèse et évaluation d'agonistes non-peptidiques du récepteur de l'ocytocine dérivés de benzodiazépines..... | | |
| | | 133 |
| I. | Introduction..... | 137 |
| 1. | Agonistes non-peptidiques décrits dans la littérature | 137 |
| i. | Affinités et fonctions | 137 |
| ii. | Mesures pharmacocinétiques et pharmacodynamiques..... | 140 |
| 2. | Travaux effectués précédemment au laboratoire..... | 142 |

| | | |
|------|--|-----|
| 3. | Objectifs du projet | 144 |
| II. | Synthèse des dérivés du Ferring-1 | 146 |
| 1. | Synthèse du châssis benzodiazépine | 146 |
| 2. | Synthèse des parties aromatiques centrales..... | 147 |
| 3. | Synthèse des chaînes | 151 |
| 4. | Assemblage des ligands | 152 |
| i. | Synthèse des dérivés proline et glycine | 152 |
| ii. | Synthèse des dérivés rigidifiés | 154 |
| iii. | Synthèse du dérivé urée cyclisé | 156 |
| III. | Affinité, sélectivité et fonction pour les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine | 159 |
| 1. | Ligands de référence..... | 159 |
| i. | Affinité..... | 159 |
| ii. | Fonction..... | 161 |
| 2. | Ligands avec modulation de la chaîne | 162 |
| i. | Affinité..... | 162 |
| ii. | Fonction..... | 164 |
| 3. | Ligands avec modulation des substituants sur le cycle benzylique..... | 164 |
| i. | Affinité..... | 164 |
| ii. | Fonction..... | 165 |
| 4. | Ligands rigidifiés..... | 165 |
| i. | Affinité..... | 165 |
| ii. | Fonction..... | 166 |
| 5. | Conclusion..... | 167 |
| IV. | SL-II-135 et analogues : profil pharmacocinétique et pharmacodynamique - Agonisme biaisé..... | 167 |
| 1. | Estimation du passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE)..... | 167 |
| i. | LogP | 167 |
| ii. | LogD..... | 168 |

| | | |
|--|--|-----|
| iii. | PSA..... | 168 |
| iv. | LogBB..... | 168 |
| v. | Calculs des mesures pharmacodynamiques..... | 168 |
| 2. | Agoniste biaisé : activation des sous-types de protéine G..... | 172 |
| i. | Voies de signalisation du récepteur de l'ocytocine..... | 172 |
| ii. | Mesure de l'activation des sous-types de protéines G α du récepteur de l'ocytocine.... | 173 |
| V. | Conclusion | 176 |
| Partie 2 Chapitre 3 : Nouvelles plates-formes pour concevoir des agonistes du récepteur de l'ocytocine | | |
| | | 181 |
| I. | Modélisation moléculaire | 185 |
| II. | Les 1,2,4-triazine-3,6-diones ou aza-dicétopipérazines..... | 188 |
| 1. | Introduction | 188 |
| i. | Dicétopipérazine..... | 188 |
| ii. | Aza-dicétopipérazines | 191 |
| 2. | Développement et synthèse des 1,2,4-triazine-3,6-diones..... | 192 |
| i. | Voie de synthèse en solution | 192 |
| ii. | Etude des déterminants essentiels pour une cyclisation en aza-DCP en milieu acide ... | 192 |
| iii. | Voie de synthèse sur support solide | 195 |
| 3. | Structure des 1,2,4-triazine-3,6-diones : Etude RMN et RX | 196 |
| 4. | Synthèse et évaluation du dérivé aza-dicétopipérazine 115 comme mime de l'ocytocine | 201 |
| i. | Synthèse du dérivé aza-dicétopipérazine 115..... | 201 |
| ii. | Evaluation des dérivés aza-dicétopipérazine 115 et 145 | 203 |
| 5. | Dicétopipérazine versus aza-dicétopipérazine : importance du châssis pour l'activité biologique | 204 |
| i. | Bioisostérie | 204 |
| ii. | Etude de l'influence du châssis sur l'activité biologique : modification d'un antagoniste dérivé de dicétopipérazine du récepteur de l'ocytocine en dérivé aza-dicétopipérazine..... | 205 |
| III. | Les 1,4-diazépin-2-ones | 210 |
| 1. | Introduction | 210 |

| | | |
|------|---|-----|
| 2. | Synthèse du dérivé 1,4-diazépin-2-one 116 | 211 |
| 3. | Evaluation du dérivé 1,4-diazépin-2-one 116..... | 215 |
| IV. | Les aza-peptides | 215 |
| 1. | Introduction | 215 |
| 2. | Synthèse d'aza-peptides cycliques, une réaction secondaire inattendue | 218 |
| i. | Première voie de synthèse | 218 |
| c. | Influence de la température..... | 221 |
| d. | Influence de l'activation | 221 |
| ii. | Deuxième voie de synthèse : synthèse des semicarbazides en solution et incorporation sur support | 223 |
| iii. | Troisième voie de synthèse : étude de la cyclisation en milieu basique..... | 224 |
| 3. | Synthèse sur support et évaluation de peptides contenant une aza-dicétopipérazine..... | 226 |
| i. | Première voie de synthèse : cyclisation en solution par couplage peptidique..... | 227 |
| ii. | Deuxième voie de synthèse : cyclisation sur support par chimie Click | 230 |
| iii. | Evaluation des dérivés peptides cycliques 228 et 246 contenant une aza-dicétopipérazine 234 | |
| iv. | Conclusion | 235 |
| V. | Conclusion et perspectives..... | 235 |
| | Conclusion générale et perspectives | 239 |
| | Méthodes d'évaluation biologique | 245 |
| I. | Principe des tests de liaison | 247 |
| 1. | Méthodes de saturation | 248 |
| 2. | Méthode de déplacement (ou de compétition) | 248 |
| II. | Principe des tests fonctionnels | 249 |
| III. | Protocoles..... | 250 |
| 1. | Caractérisation des ligands non peptidiques du récepteur de l'ocytocine : tests de liaisons par TR-FRET sur les lignées V _{1a} , V ₂ et OT..... | 250 |
| 2. | Caratérisation des ligands non peptidiques du récepteur de l'ocytocine : mesure de la réponse fonctionnelle..... | 250 |

| | |
|----------------------------|-----|
| Partie expérimentale | 253 |
| Bibliographie | 325 |

Remerciements

Cette thèse a été effectuée au sein du laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR 7200) dans l'équipe de Chimie et Biologie Intégrative sous la direction du Prof. Marcel Hibert et du Dr. Dominique Bonnet et financée par une allocation du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

Au terme de ce travail de thèse, je souhaite tout d'abord remercier le Prof. Marcel Hibert qui m'a accueillie au sein de ce laboratoire et m'a confié ce sujet original et passionnant. Je souhaite également remercier le Dr. Dominique Bonnet pour son encadrement, sa disponibilité et sa confiance qu'il m'a accordée tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de lire et de juger ce travail : Jean-Daniel Brion, Florence Mahuteau-Betzer, Thierry Durroux et Andrey Klymchenko.

Je remercie tout particulièrement les biologistes de Montpellier : Thierry Durroux, Thiéric Rodrigues et toute l'équipe du département de Pharmacologie Moléculaire de l'Institut de Génomique Fonctionnelle qui m'ont accueillie chaleureusement lors de mon séjour à Montpellier. Je tiens également à remercier les biologistes de la plateforme PCBIS, plus particulièrement Christel Valencia, Sophie Gioria et Pascal Villa qui ont effectué un travail considérable dans la cadre de ce projet.

Mes remerciements vont également à Marie-Céline Frantz et Stéphanie Loison pour leur remarquable travail effectué avant mon arrivée au laboratoire. Je tiens à remercier Aurélia Spenlinhauser et Elena Wolf qui ont été d'une grande aide dans ce projet.

Je remercie Didier Rognan pour sa disponibilité concernant les travaux de modélisation.

Je remercie l'ensemble de mes collègues (Stéphanie, Corinne, Pierre-Michel, Jean-François, Claire, Maria, Iuliia) et anciens collègues de travail pour leur sympathie, disponibilité, convivialité qui ont contribué à travailler dans une excellente ambiance. Merci à toutes les belles rencontres que j'ai pu faire durant ces trois années de thèse, je garderai un très bon souvenir des bons moments passés ensemble. Je tiens à remercier Emilie et Christelle, Séverine, Claude, Cécile, Aicha, Maud, Vava, Michaelis, Marion, Anne-Marie et tous ceux que j'oublie.

Je tiens à remercier Pascale Buisine, Patrick Wehrung et Cyril Antheaume du service commun d'analyse ainsi que les secrétaires de l'UMR 7200, Françoise et Marianne.

Merci à mes amies de lycée et de fac qui ont toujours été là pour moi : Lucie, Audrey, Nana, Nonette, Pargol, Nathalie et Stéphanie pour tous les week-ends et bons moments partagés durant ma thèse.

Mes derniers remerciements vont à ma famille sur laquelle je peux toujours compter: ma maman, ma sœur Léo, Mamie, Papi, Tatie, Tonton, Mimi, Jean, Kiki, Jean-Toto, Manu, Mag, Béné, Chimain, Kimono, Boris, Sylvain, Marie, Lisa, Gaston, Adèle, la petite dernière Eugénie et tous ceux que j'oublie.

Une pensée particulière à Fred et Zeth avec qui j'aurais aimé partager ce moment.

Liste des abréviations

| | |
|---------------------------------|---|
| °C | degrés Celsius |
| μM | micromolaire(s) |
| 4-DMAP | 4-diméthylaminopyridine |
| Å | angström(s) |
| AC | adényl-cyclase |
| Ac | acétyle |
| Ac ₂ O | anhydride acétique |
| ACN | acétonitrile |
| AcOEt | acétate d'éthyle |
| AcOH | acide acétique |
| ADDP | 1,1'-(azodicarbonyl)pipéridine |
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| AMPc | adénosine monophosphate cyclique |
| ARN | acide ribonucléique |
| AVP | arginine-vasopressine |
| Aza-DCP | aza-dicétopipérazine |
| BC | benzylcytosine |
| BG | benzylguanine |
| BHE | barrière hémato-encéphalique |
| Bn | benzyle |
| Boc | <i>tert</i> -butoxycarbone |
| Boc ₂ O | dicarboxylate de di- <i>tert</i> -butyle |
| BRET | bioluminescence resonance energy transfer |
| CaSR | récepteur sensible au calcium |
| cat. | catalytique |
| CCP | clathrin-coated pits (vésicules tapissés de clathrine) |
| CDI | 1,1'-carbonyldiimidazole |
| CH ₂ Cl ₂ | dichlorométhane |
| CHCl ₃ | chloroforme |
| CHO | chinese hamster ovary (ovaire de hamster chinois) |
| DAG | diacylglycérol |
| DBU | 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène |
| DCE | dichloroéthane |
| DCP | dicétopipérazine |
| DEAD | diéthyl azodicarboxylate |
| DIEA | <i>N,N</i> -diisopropyléthylamine |
| DMF | diméthylformamide |
| DMSO | diméthylsulfoxyde |
| DPP4 | dipeptidyl peptidase 4 |
| DSM | diagnostic and statistical manual of mental disorders |
| E | boucle extracellulaire |
| EC ₅₀ | concentration d'agoniste nécessaire pour obtenir 50% de la réponse maximale |
| EDCI | 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide |
| EDTA | acide éthylène diamine tétraacétique |
| EGF | epidermal growthfactor |
| EGFP | enhanced green fluorescent protein (protéine fluorescente verte mutante) |

| | |
|--------------------|--|
| EI | électrospray ionization (ionisation par électrospray) |
| eq | équivalent |
| ERK | enzymes kinases qui régulent le signal extracellulaire |
| ES | électrospray |
| Et ₂ O | éther diéthylique |
| Et ₃ N | triéthylamine |
| EtOH | éthanol |
| Fmoc | 9-fluorénylméthoxycarbonyl |
| FRET | Förster (ou fluorescence) resonance energy transfer (transfert par résonance d'énergie de fluorescence) |
| g | gramme(s) |
| GABA | acide γ-aminobutyrique |
| GDP | guanine diphosphate |
| GFP | green fluorescent protein (protéine fluorescente verte) |
| GMPc | Guanine monophosphate cyclique |
| GPS | site protéolytique des RCPG |
| grad | gradient |
| GRK | protéines kinases de la classe des sérine/thréonine |
| GTP | guanine triphosphate |
| h | heure(s) |
| hAGT | o ₆ -alkylguanine alkyltransférase (protéine de la réparation de l'ADN |
| HATU | <i>N</i> -[(diméthylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-yl)méthylène]- <i>N</i> -méthylméthanaminium hexafluorophosphate <i>N</i> -oxide |
| HBTU | <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate |
| HEK | human embryonic kidney (cellules rénales embryonnaires humaines) |
| HMBA | acide hydroxyméthyle benzoïque |
| HMBC | heteronuclear multiple bond correlation |
| HOBT | 1-hydroxybenzotriazole |
| HPLC | high-pressure liquid chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance) |
| HRMS | high resolution mass spectrometry (spectrométrie de masse à haute résolution) |
| HSQC | heteronuclear single quantum coherence |
| I | boucle intracellulaire |
| IAM | 2-hydroxyisophthalamide |
| IC ₅₀ | concentration d'antagoniste nécessaire pour inhiber 50% de la liaison induite par l'agoniste endogène |
| InsP ₃ | inositol-1,4,5-triphosphate |
| IP | inositol phosphate |
| <i>i</i> PrOH | iso-propanol |
| K | kelvin |
| kDa | kilodalton(s) |
| K _i | constante d'inhibition |
| K _{inact} | constante d'inactivation |
| LC-MS | liquid chromatography mass spectrometry (chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse) |
| MAPK | protéines kinases activées par les mitogènes |
| Me | méthyle |

| | |
|----------------------|---|
| MeOH | méthanol |
| mg | milligramme(s) |
| min | minute(s) |
| MM | masse moléculaire (en g/mol) |
| MS | mass spectrometry (spectrométrie de masse) |
| MW | micro-waves (micro-ondes) |
| n | nombre de déterminations indépendantes |
| nd | non-déterminé |
| NFAT | nuclear factor of activated T-cells |
| NH(Boc) ₂ | iminodicarboxylate de di- <i>tert</i> -butyle |
| nM | nanomolaire |
| nm | nanomètre |
| NMM | 4-méthylmorpholine |
| NMN | <i>N</i> -méthylmorpholine |
| NMP | <i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone |
| ns | non-significatif |
| NsCl | chlorure de nosyle |
| OT | ocytocine |
| OXTR | récepteur de l'ocytocine |
| PAI-1 | plasminogène-1 |
| PAMPA | parallel artificial membrane permeability assay |
| PBS | phosphate buffered saline (tampon phosphate salin) |
| PBu ₃ | tributylphosphine |
| PDE | phosphodiesterase |
| Pf | point de fusion |
| Ph | phényle |
| PIPI ₂ | phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate |
| PKA | protéine kinase A |
| PKC | protéine kinase C |
| PLCβ | phospholipase Cβ |
| PPh ₃ | triphénylphosphine |
| PPlase | peptidylprolyl isomérase |
| ppm | partie(s) par million |
| PSA | polar surface area (Å) |
| <i>p</i> -TsOH | acide paratoluènesulfonique |
| PTX | paclitaxel |
| PyBOP | (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate |
| quant. | quantitatif |
| RAS | relation structure-activité |
| RCPG | récepteur couplé aux protéines G |
| rdt(s) | rendement(s) |
| RE | réticulum endoplasmique |
| Rf | rapport frontal |
| RMN | résonance magnétique nucléaire |
| s | seconde(s) |
| SEM | standard error of the mean |
| TA | température ambiante |

| | |
|-------------------|---|
| TBAB | bromure de tétra-n-butyle ammonium |
| TBAF | fluorure de tétra-n-butyle ammonium |
| TBAI | iodure de tétra-n-butyle ammonium |
| TBDMS | <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle |
| TBDMSCI | chlorure de <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle |
| TBTA | tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine |
| TFA | acide trifluoroacétique |
| TFAA | anhydride trifluoroacétique |
| THF | tétrahydrofurane |
| TM | domaine transmembranaire |
| TMOF | triméthyl orthoformate |
| TMsOTf | triméthylsilyl trifluorométhanesulfonate |
| TNBS | acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique |
| t_R | temps de rétention |
| TR-FRET | time-resolved Förster (ou fluorescence) resonance energy transfer |
| Ts | tosyle |
| TsCl | chlorure de tosyle |
| UV | ultraviolet |
| V _{1a} R | récepteur de la vasopressine V _{1a} |
| V _{1b} R | récepteur de la vasopressine V _{1b} |
| V ₂ R | récepteur de la vasopressine V ₂ |
| WT | wild-type (sauvage) |
| α_D | pouvoir rotatoire |

Introduction

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

1. Contexte historique

L'idée qu'une molécule se lie sur un site spécifique ou sur des récepteurs à la surface cellulaire a émergé en Allemagne avec les travaux de Paul Ehrlich (1854-1915) par visualisation et quantification de l'affinité de colorants sur des structures biologiques. Il démontre avec Leppman dans les années 1890 que le bleu de méthylène interagit de préférence avec les tissus nerveux et a des effets analgésiques¹. Le terme de « substance réceptive » a été pour la première fois formulée par John Langley (1852-1925), physiologiste à Cambridge, et développée par Sir Henry Dale, pharmacologiste anglais et prix Nobel de médecine en 1936². Les premières expériences sur tissus ont permis de mesurer des réponses à des stimulants (agonistes) et des inhibiteurs (antagonistes). Dans la première moitié du 20^{ème} siècle, la théorie du récepteur se développe avec les notions de loi d'action de masse et de données de doses-réponses. La synthèse de ligands radioactifs a permis de démontrer l'existence de ces récepteurs couplés aux protéines G. Le pionnier dans ce domaine est l'un des deux prix Nobel de Chimie en 2012, R Lefkowitz, qui par marquage de l'hormone adrénocorticotropique avec de l'iode radioactif a observé sa fixation sur les préparations membranaires adrénales³.

2. Caractérisations des RCPG

i. Structure des RCPG

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires et transmettent des signaux cellulaires modulés par des messagers de la communication intercellulaire et par des messagers sensoriels (lumière, odeur, molécules du goût). Ces messagers sont des molécules de nature très diverse comme des ions, lipides, peptides, protéines, nucléosides, nucléotides et peuvent également être des photons (Figure 1). Plus de 1% du génome humain encode des RCPG (plus de 700 protéines). Ces récepteurs sont la cible de plus de 40% des médicaments actuellement sur le marché et notamment des 25% du top 100 des médicaments les plus vendus.

Les récepteurs couplés aux protéines G sont constitués de 7 hélices transmembranaires (de 30 à 40 résidus) reliés par trois boucles extracellulaires (E1, E2, E3) et trois boucles

intracellulaires (I1, I2, I3). La partie N-terminale est extracellulaire et la partie C-terminale est cytoplasmique. Elles sont de longueurs différentes suivant les familles.

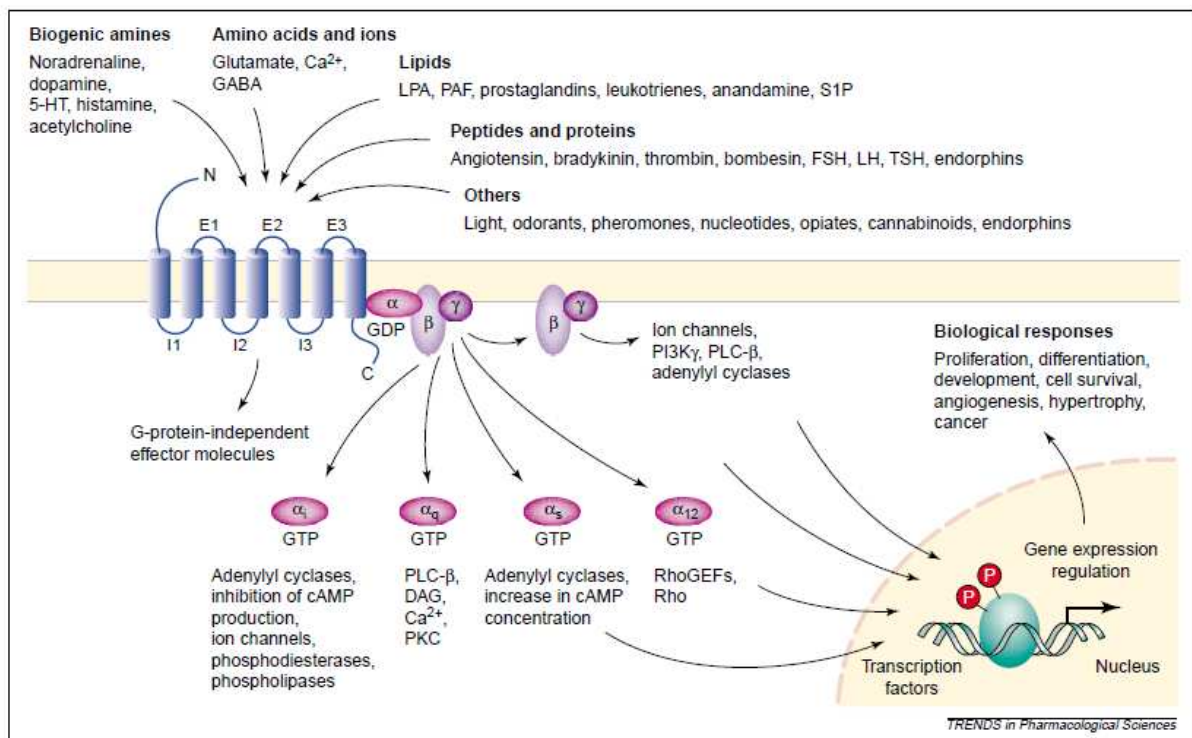


Figure 1 : Diversité des RCPG⁴

La structure tertiaire des RCPG a été visualisée pour la première fois avec le modèle de Hibert⁵ puis celui de Baldwin⁶. La structure cristalline de la rhodopsine obtenue en 2000 par diffraction des rayons X a permis de confirmer la structure 3D générale des RCPG⁷. Le ligand de la rhodopsine (11-*cis*-rétinal) est lié de façon covalente (par la Lys²⁹⁶) au récepteur et permet de stabiliser le récepteur dans un état inactif en présence de lumière. Après absorption d'un photon, le ligand isomérisé en all-*trans*-rétinal, entraînant le changement de conformation du récepteur et la génération d'une réponse biologique. La structure de la rhodopsine a permis de prédire l'arrangement des hélices. Les hélices transmembranaires (TM) sont globalement perpendiculaires à la membrane et arrangées autour d'une poche centrale profonde d'environ 20 Å dans le tiers supérieur du domaine transmembranaire. Les hélices TM 1, 2, 3 et 5 sont plus inclinées que les hélices TM 4, 6 et 7 (Figure 2). On trouve également une 8^{ème} hélice α dans le domaine C-terminale, parallèle au plan de la membrane.

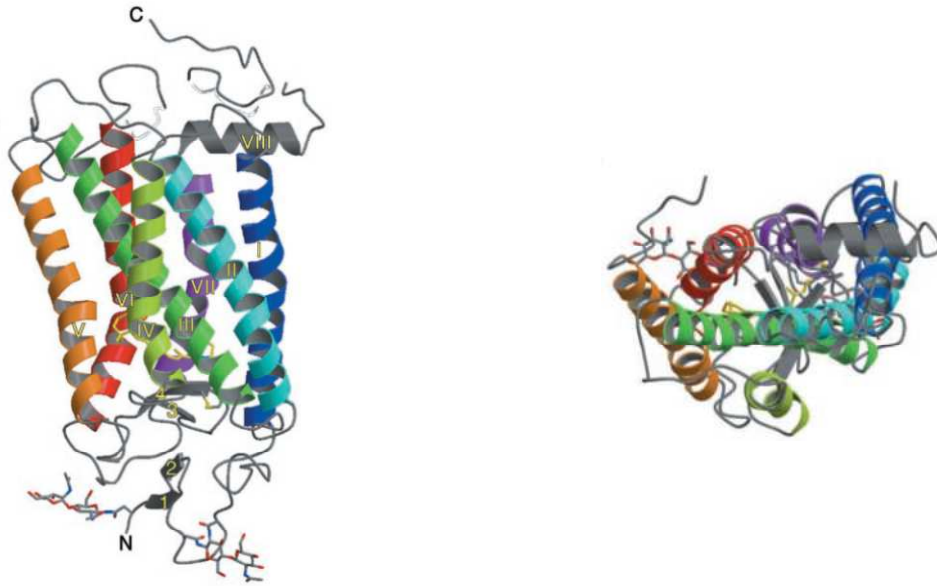


Figure 2 : Structure de la rhodopsine sous forme de ruban vue parallèle à la membrane et vue dans le plan de la membrane depuis le côté cytoplasmique⁷

Depuis, plus d'une vingtaine de structures de RCPG ont été résolues comme par exemple les structures cristallines du récepteur CXCR1, des récepteurs adrénergiques β_1 et β_2 , récepteur de l'adénosine, récepteur D_3 de la dopamine, récepteur de l'histamine H_1 , récepteurs opioïde μ , κ , et δ dans leur forme active ou non. Ces structures montrent que le site de liaison des agonistes endogènes est variable en fonction du récepteur. Les études de mutagenèse dirigée, de marquage covalent et par photo-affinité permettent de proposer des modèles 3D de la structure de la poche et de la modification de la structure lors de l'activation. C'est ce petit changement de conformation qui va induire le couplage au complexe hétérotrimérique de protéines $G\alpha\beta\gamma$ ⁸.

ii. Classification des RCPG

En se basant sur les similarités de séquences, les RCPG peuvent être classés dans 5 familles différentes. Cette classification est appelée GRAFS pour (G) Glutamate, (R) Rhodopsine, (A) Adhésine, (F) Frizzled/Goût 2 et (S) Sécrétine. Un arbre phylogénétique de ces récepteurs a été construit (Figure 3). Ces récepteurs partagent une signature structurale composée de 7 hélices transmembranaires avec un côté N-terminale extracellulaire et un côté C-terminale intracellulaire. Les segments des hélices transmembranaires partagent une forte homologie de séquence alors que la partie C-terminale, la boucle extracellulaire entre les hélices

transmembranaires 5 et 6 et la partie N-terminale présentent une forte variabilité suivant les familles⁹.

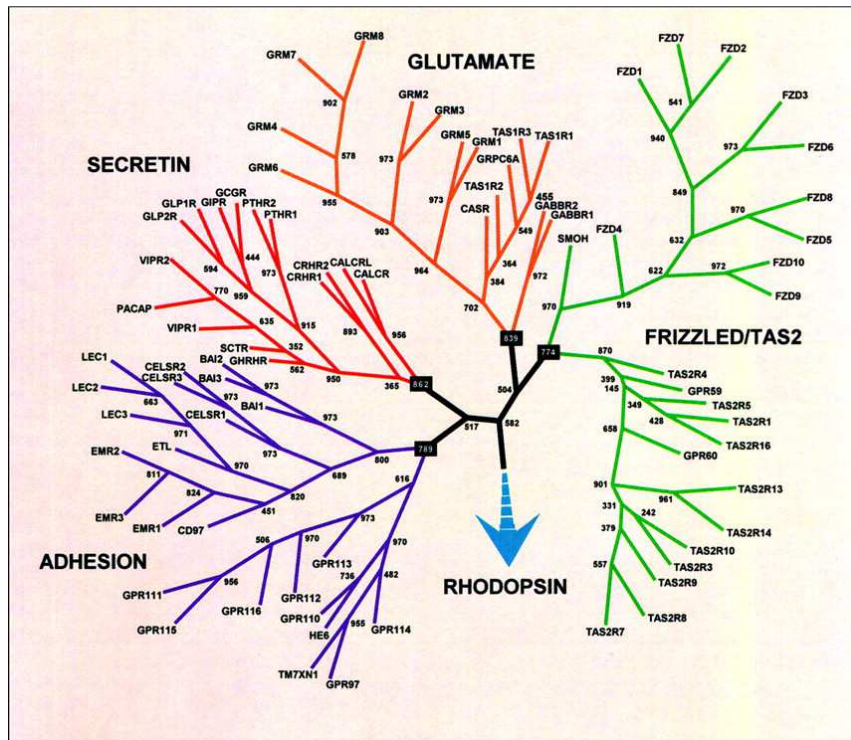


Figure 3 : Relations phylogénétiques entre les RCPG dans le génome humain¹⁰.

a. Famille de la sécrétine

La famille de la sécrétine partage des similarités avec la famille de l'adhésine. Les récepteurs de la famille de la sécrétine ont une longue partie N-terminale souvent comprise entre 60 et 80 acides aminés qui contiennent des ponts disulfures entre cystéines. La partie N-terminale pour ces récepteurs est importante pour la fixation des ligands. La plupart de ces récepteurs sont la cible de ligands peptidiques plutôt de grande taille et modulent une signalisation paracrine¹¹.

b. Famille de l'adhésine

On attribue plusieurs noms à cette famille notamment EGF-TM7 qui reflète la présence du domaine du facteur de croissance épidermique (EGF, epidermal growth factor) sur la partie N-terminale. Leurs longues parties N-terminales contiennent un pourcentage élevé de résidus sérine et thréonine qui sont des sites de O- et N-glycosylation. La plupart de ces récepteurs ont un domaine protéolytique de RCPG (GPS, GPCR proteolytic site) situé sur la partie N-terminale et reconnu par un grand nombre d'autres protéines comme par exemple la cadhérine, la lectine, la laminine, l'immunoglobuline. Ce groupe de récepteurs s'est formé

tôt dans l'évolution, a de nombreux membres chez les nématodes et est retrouvé dans tous les organismes¹¹.

c. Famille du récepteur glutamate

Ce groupe contient les 8 récepteurs métabotropes du glutamate, les deux récepteurs du GABA présents sous deux variantes (a et b), le récepteur sensible au calcium (CaSR) et les récepteurs du goût de type 1 (TAS). Le glutamate est un neurotransmetteur important retrouvé dans les synapses dans les cerveaux des mammifères mais également dans les jonctions neuromusculaires des insectes. Ces récepteurs ont un domaine de reconnaissance des ligands dans la partie N-terminale¹¹.

d. Famille des récepteurs frizzled et des récepteurs du goût

Cette famille est relativement récente. Les récepteurs frizzled contrôlent la prolifération et la mort cellulaire ainsi que la polarité durant le développement des métazoaires en transmettant les signaux des glycoprotéines Wnt sécrétées. Les récepteurs frizzled ont été découverts pour la première fois chez la drosophile et doivent leur nom au ligand Wnt entortillé. La partie N-terminale comprend environ 200 acides aminés et participe à la fixation de Wnt. Le rôle et la fonction des récepteurs du goût de type 2 (TAS2) restent obscurs. On sait cependant qu'ils sont retrouvés dans la langue et permettent la détection du goût amer. Il est surprenant que ces deux types de récepteurs montrent une relation phylogénétique proche en n'ayant que très peu de similarité. Un doute persiste sur le fait que ces deux familles de récepteurs partagent une histoire commune dans l'évolution¹¹.

e. Famille de la rhodopsine

La famille de la rhodopsine est la plus grande famille de récepteurs couplés aux protéines G chez tous les vertébrés. Cette famille a plusieurs traits caractéristiques qui permettent de dire que les récepteurs ont un ascendant commun : on trouve notamment un motif NSxxNPxxY dans la TM7, le motif DRY ou D(E)-R-T(F) entre le TM3 et la boucle intracellulaire 2. Certains récepteurs n'ont pas ces motifs mais ont d'autres régions conservées en commun. Cette famille de récepteurs diffère des autres familles par sa partie N-terminale courte. Les ligands se fixent dans une cavité entre les régions transmembranaires. Il y a quelques exceptions pour les récepteurs se liant à des glycoprotéines (LH, FSH, TSH, LG) où le domaine de fixation du ligand est la partie N-

terminale. La diversité des ligands de la famille de la rhodopsine est large¹¹. Les récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine sont retrouvés dans cette famille de récepteurs.

iii. Structure des protéines G

La stimulation des récepteurs couplés aux protéines G active un groupe de protéines appelées protéines G (car elles interagissent avec la GTP) qui régulent un bon nombre d'enzymes et de canaux ioniques et sont responsables du changement d'activité de ces cibles et de la variation du taux de messagers secondaires (taux de AMPc et d'inositol triphosphate par exemple). Ces protéines G sont retrouvées sous la forme d'un complexe hétérotrimérique constitué de trois sous-unités : α , β et γ . On dénombre 17 gènes codant pour la sous-unité $G\alpha$, 5 pour les sous-unités $G\beta$ et 12 pour les sous-unités $G\gamma$. Des données structurales obtenues avec une résolution de 2 et de 2.1 Å ont permis de mieux connaître la structure et les interactions du complexe hétérotrimérique $\alpha\beta\gamma$ ¹²¹³.

a. Famille de protéines $G\alpha$

Il existe chez l'homme 20 différentes sous-unités $G\alpha$. Les différentes protéines $G\alpha$ peuvent être classées en 4 catégories suivant leur similarité de séquence qui est comprise entre 56% et 95%.

- La famille $G\alpha_s$ qui inclut $G\alpha_{olf}$
- La famille $G\alpha_i$ qui inclut la transducine, $G\alpha_t$, la gustducine, $G\alpha_i$, $G\alpha_o$, $G\alpha_z$.
- La famille $G\alpha_q$ qui inclut $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$ et $G\alpha_{16}$.
- La famille $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$

A part les protéines G retrouvées dans les organes sensoriels (comme α_1 , α_{gust} , α_{olf}) et quelques sous-types exprimés principalement dans les cellules hématopoïétiques (α_{16}) ou dans les cellules neurales (α_o), la plupart des sous unités α sont largement exprimées. La protéine $G\alpha$ est constituée de deux domaines : un domaine GTPase qui contient la poche guanine nucléotide ainsi que le site de fixation au récepteur, aux protéines $G\beta$ et $G\gamma$ et aux effecteurs et un second domaine hélicoïdal dont la structure n'est pas bien connue et qui contribue également à la fixation des effecteurs¹⁴.

La plupart des RCPG sont couplés à un membre ou deux membres des trois familles principales de protéines $G\alpha$: G_i/G_o , G_q et G_s . Les récepteurs couplés aux sous-unités G_i/G_o inhibent l'adénylcyclase, activent les canaux potassium ou inhibent les canaux calciques. Les

récepteurs couplés aux sous-unités G_q activent la phospholipase $C\beta$ ($PLC\beta$). Les récepteurs couplés aux sous-unités G_s activent l'adénylcyclase (AC)¹⁵.

b. Familles de protéines $G\beta$ et γ

Il existe 5 protéines $G\beta$ qui ont entre 53% et 90% d'homologie de séquence et 6 protéines $G\gamma$ qui sont beaucoup plus différentes les unes des autres que les protéines $G\alpha$ et $G\beta$. Théoriquement, on pourrait former 30 combinaisons différentes de dimère $\beta\gamma$ mais toutes les paires ne sont pas retrouvées. La protéine $G\beta$ contient deux types de structures: une région N-terminale en hélice α amphipatique suivie de 7 régions répétées de 43 acides aminés environ. Cette région n'est pas seulement engagée dans la transduction du signal mais également dans le contrôle de la division cellulaire, de la transcription, de la fusion de vésicule, etc. Cette région de séquence répétée est constituée de 23 à 41 résidus conservés séparés par des régions variables (entre 7 et 11 acides aminés)¹⁴.

La sous-unité $\beta\gamma$ interagit avec au moins 7 effecteurs : les protéines $G\alpha$, l'adényl cyclase, la phospholipase $C\beta$, les β -arrestines, la calmoduline et la phosphoducine et sans doute aussi avec la phospholipase A_2 , les canaux potassium et la kinase phosphoinositol 3. La sous-unité $G\gamma$ est principalement en forme d'hélice α . Les deux sous-unités $G\beta\gamma$ sont liées fortement entre elles et ne peuvent être séparées qu'en utilisant des agents dénaturants (Figure 4)¹⁴.

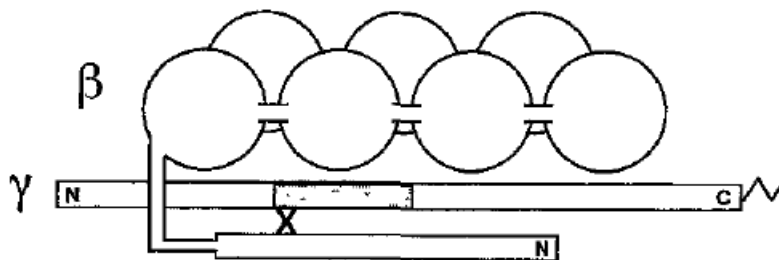
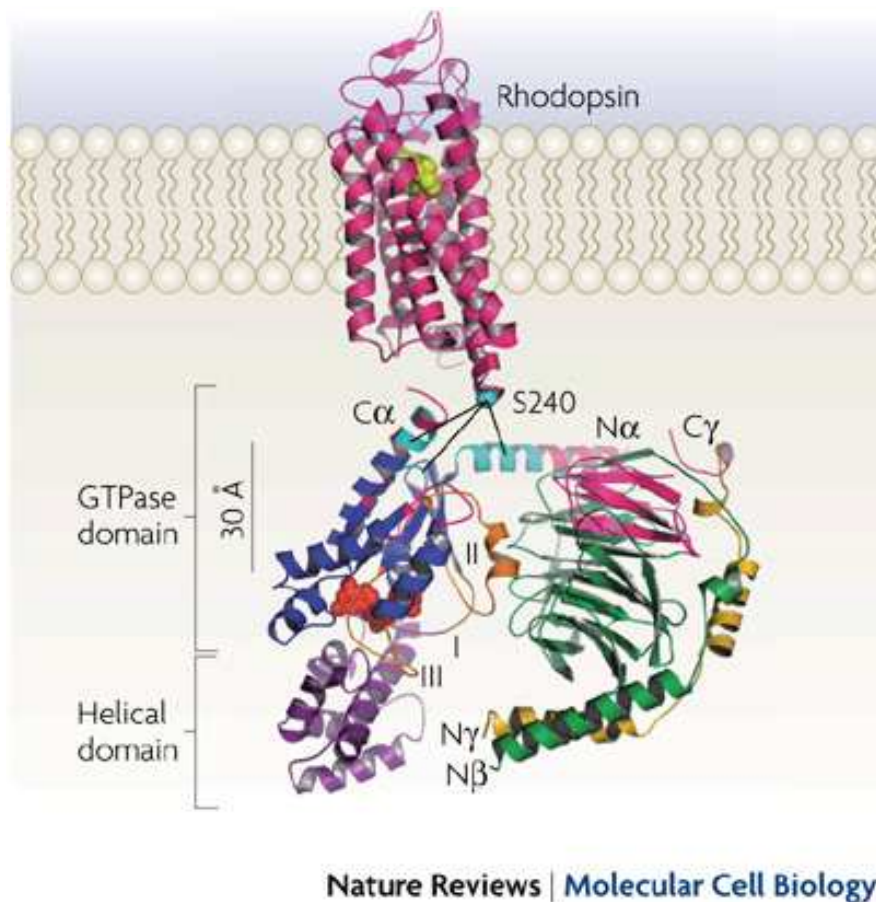


Figure 4 : Modèle de la sous-unité $\beta\gamma$ ¹⁴

c. Interaction du complexe hétérotrimérique avec le récepteur

Des études biochimiques ont permis d'identifier plusieurs sites de contact du complexe hétérotrimérique $G\alpha\beta\gamma$ avec le récepteur (partie rose et cyan). D'autres études ont permis d'identifier plus spécifiquement des résidus impliqués dans les interactions comme la Ser^{240} sur la boucle intracellulaire 3 du récepteur (sphère cyan) avec les régions spécifiques de la protéine $G\alpha$: la partie C-terminale, N-terminale et la boucle $\alpha_4\text{-}\beta_6$ (cyan). La GDP (sphère rouge) se trouve dans la poche à plus de 30 Å du plus proche site de contact avec le

récepteur (Figure 5). La question comment le récepteur peut-il provoquer la libération de GDP à cette distance se pose encore¹⁶.



Modèle de la rhodopsine (PDB ID 1GZM) juxtaposé avec l'hétérotrimère Gαβγ (PDB ID 1GOT). La rhodopsine est représentée en rose. L'activation du récepteur expose le site de liaison de la protéine G qui est formé par la boucle intracellulaire du récepteur.

Figure 5 : Interface récepteur - protéines G¹⁶

3. Mécanisme d'activation des RCPG

i. Evolution des modèles

La théorie de la pharmacologie des récepteurs couplés aux protéines G est basée sur la loi d'action de masse pour la première fois évoquée au début du XX^{ème} siècle. Cette loi postule la réversibilité de la fixation d'un ligand sur son récepteur et est caractérisée par des constantes d'association et de dissociation. La complexité croissante des systèmes révélée par l'approfondissement de la connaissance de la régulation des récepteurs a nécessité des modèles de plus en plus élaborés.

Différents modèles d'activation des RCPG ont été ainsi décrits au fil des années.

- Simple liaison et activation

Ce modèle prend en compte le fait qu'une protéine peut avoir deux conformations différentes et une affinité différente pour son ligand en fonction de sa conformation. Un agoniste, A, se fixe sur un récepteur inactif, R_i , pour former le complexe AR_i qui après changement conformationnel passe en forme activée AR_a ¹⁷.



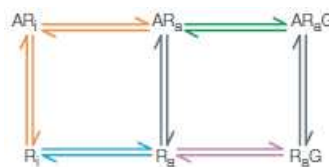
- Modèle simple du complexe ternaire

Ce modèle comprend trois partenaires : le récepteur, le ligand et la protéine G. Dans le modèle du complexe ternaire, l'activation du récepteur est suivie par la fixation du récepteur activé avec la protéine G, G. Le complexe ternaire correspondant, AR_aG , active l'effecteur¹⁷.



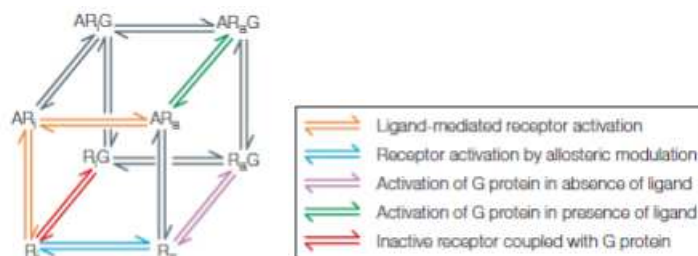
- Modèle étendu du complexe ternaire

Deux états différents du récepteur coexistent, R_i (inhibé) et R_a (activé), avec une constante d'équilibre allostérique. La liaison de la protéine G à la forme active du récepteur conduit à une réponse biologique. Ce modèle inclut la situation où un récepteur est activé indépendamment d'un ligand (R_a turquoise) et peut alors interagir avec et activer une protéine G (rose). Le ligand A peut se fixer sur toutes les formes du récepteur¹⁸¹⁹.



- Modèle cubique ternaire complexe

Ce modèle reprend les mêmes concepts que précédemment mais inclut la formation d'un complexe qui n'induit pas de signalisation entre la forme inactive du récepteur et la protéine G (R_iG , rouge). Ce modèle est le plus approprié et proche de la réalité¹⁹²⁰.



- Modèle complexe prenant en compte l'oligomérisation

Une ultime complexification est apportée au modèle en prenant en compte la notion d'oligomérisation des RCPG. La modélisation du système en tenant compte des dimères donne lieu à des modèles mathématiques complexes²¹

ii. Classifications des ligands

Les ligands des RCPG peuvent être classés en trois catégories :

- Les agonistes qui augmentent la proportion de récepteurs activés et induisent une réponse biologique.
- Les agonistes inverses qui diminuent la proportion de récepteurs activés, et par conséquent l'activité basale constitutive du récepteur est réduite.
- Les antagonistes qui inhibent les actions des autres ligands.

Dans les systèmes avec une activité basale faible ou inexistante, un agoniste inverse va sembler avoir un faible effet sur l'activité basale et garde la capacité d'inhiber les actions des agonistes. Dans un système avec une activité constitutive forte du récepteur, la même molécule va tout de suite être classée comme agoniste inverse. La plupart des molécules classées comme antagonistes sont en fait des agonistes inverses. Si une molécule inhibe l'action d'un ligand endogène en n'ayant aucun effet sur la distribution de la population de récepteur alors on peut parler d'antagoniste neutre (Figure 6)¹⁷.

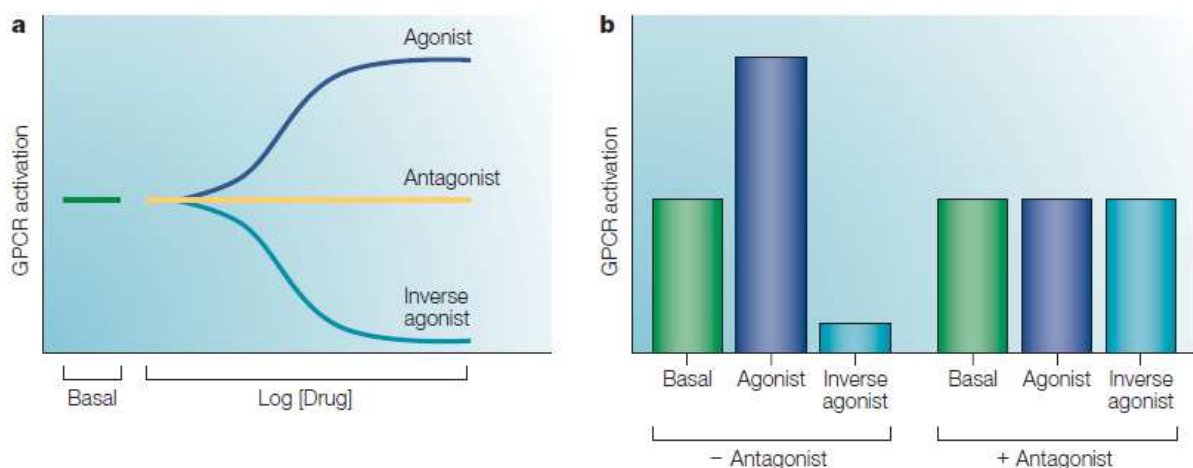


Figure 6 : Classification des ligands des RCPG¹⁷

Les ligands des RCPG peuvent également être classés suivant leur mode de liaison. La plupart des ligands se lient sur le même domaine que celui reconnu par les agonistes endogènes,

appelé site orthostérique. De nombreux RCPG ont des sites allostériques bien distincts. Une molécule se fixant sur le site allostérique peut indirectement réguler l'activité des ligands orthostériques et/ou moduler les effets des agonistes et agonistes inverses¹⁷.

iii. Transduction du signal

La synthèse des RCPG est initiée dans le réticulum endoplasmique (RE) où le repliement est contrôlé par des protéines chaperonnes. Déjà dans le RE, de nombreux RCPG se trouvent sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Les RCPG transitent dans l'appareil de Golgi où des modifications comme l'oligosaccharisation ont lieu. Dans la partie distale de l'appareil de Golgi, des vésicules formées par exocytose transportent les RCPG vers la membrane cellulaire. Plusieurs protéines comme la spinophiline, la filamine ou la muskeline influencent la stabilité des RCPG à la surface de la membrane cellulaire²².

iv. Activation du récepteur

La fixation d'un agoniste active les récepteurs couplés aux protéines G ce qui entraîne une réaction d'échange de nucléotide sur la protéine $G\alpha$. Après la fixation du ligand, on observe une modification de la conformation du récepteur et une augmentation de l'affinité pour le complexe hétérotrimérique. La forme inactive du récepteur est stabilisée par une arginine sur l'hélice TM3 et le glutamate sur l'hélice TM6. Une liaison ionique entre l'hélice TM3 et l'hélice TM6 stabilise la forme inactive du récepteur²³. Une ouverture des domaines transmembranaires 3, 6 et 7 dans la zone cytoplasmique expose différentes régions à la protéine G. L'hélice 3 est contrainte du fait de sa situation centrale alors que l'hélice 6 effectue une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre²⁴.

v. Activation de la protéine G hétérotrimérique

La liaison du message sur le récepteur catalyse l'échange de la guanine diphosphate (GDP) par une guanine triphosphate (GTP) sur la sous-unité $G\alpha$ de l'hétérotrimère de protéine G (constitué de trois sous-unités α , β et γ) entraînant un changement conformationnel : la sous-unité $G\alpha$ se dissocie du dimère $G\beta\gamma$. $G\alpha$ et le dimère $G\beta\gamma$ interagissent avec des effecteurs identiques ou différents (canaux, enzymes). L'hydrolyse du GTP met fin à l'interaction de $G\alpha$ -GTP avec son effecteur. $G\alpha$ se réassocie avec le dimère $G\beta\gamma$ ce qui met fin à l'interaction du dimère avec son effecteur (Figure 7).

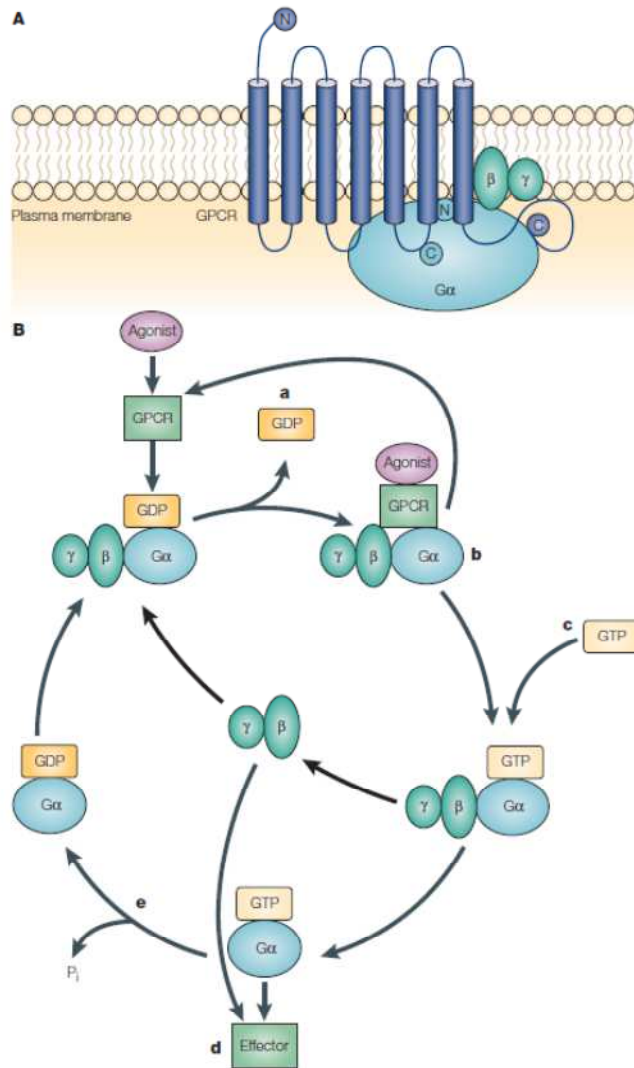


Figure 7 : Activation des récepteurs couplés aux protéines G (A. Schéma du RCPG couplé à la protéine G, B. Cycle d'activation de la protéine G)¹⁷

vi. Transduction du signal

a. Les protéines G α

La plupart des récepteurs couplés aux protéines G sont couplés à un ou deux membres des trois familles de protéines G : G_i/G_o, G_q, et G_s. A la suite de la liaison du ligand sur le récepteur, un récepteur peut activer plusieurs protéines G différentes résultant en l'activation de nombreuses cascades cellulaires.

Les récepteurs couplés aux sous-unités G_i/G_o inhibent l'adényl cyclase (AC), activent les canaux potassium ou inhibent les canaux calcium. Les récepteurs couplés aux sous-unités G_q activent la phospholipase C β (PLC β). Cette enzyme clive le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) en inositol-1,4,5-triphosphate (InsP₃) et en diacylglycérol (DAG). Ces

deux messagers secondaires agissent comme des effecteurs : le DAG augmente l'activité de la protéine kinase C (PKC) qui favorise l'ouverture des canaux calciques et InsP_3 se lie sur les canaux calciques du RE et permet d'augmenter la concentration intracellulaire cytoplasmique de calcium. Les récepteurs couplés aux sous-unités G_s activent AC (Figure 8).

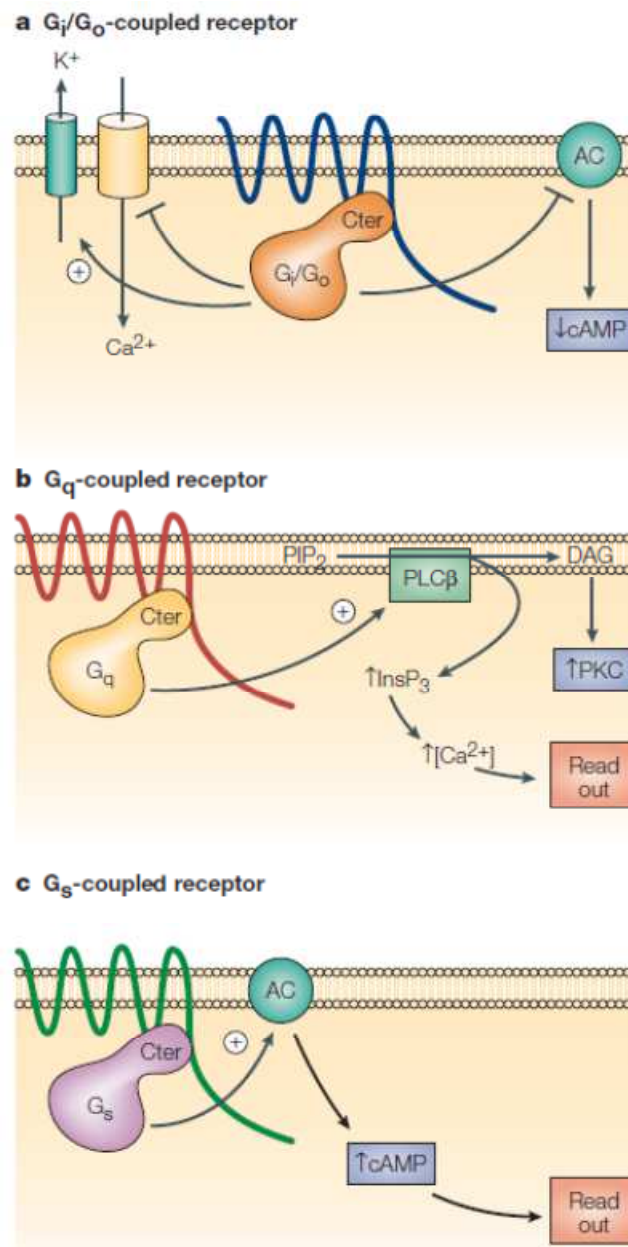


Figure 8 : Transduction du signal par les différents sous-types de protéines G¹⁷

b. Les β -arrestines

Il existe également une signalisation qui n'est pas dépendante de l'activation des protéines G hétérotrimériques. Parmi les protéines impliquées dans les cascades de signalisation, la β -

arrestine intervient. Il a été démontré que les RCPG peuvent avoir des voies de signalisation à travers les β -arrestines. Différentes cascades de signalisation ont été décrites : la β -arrestine est par exemple un intermédiaire dans la transduction d'un signal RCPG dépendant (absence de couplage aux protéines G) et peut activer les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK). (Figure 9)²².

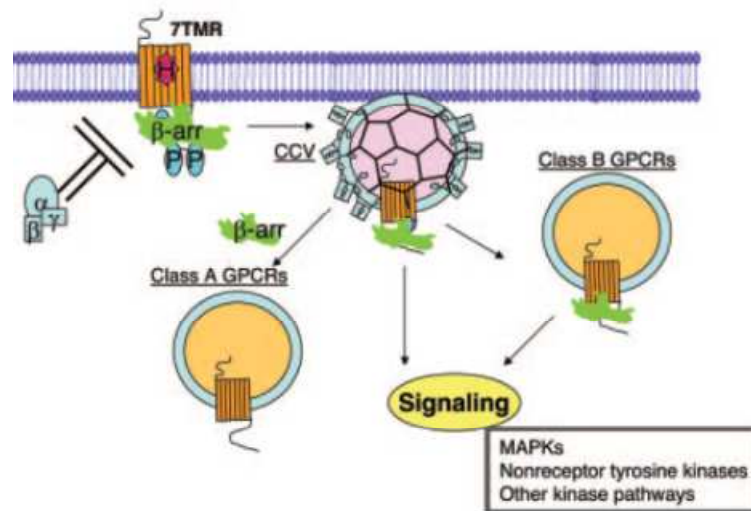


Figure 9 : Implication de la β -arrestine dans les cascades de signalisation²²

vii. Arrêt de la transduction du signal

a. Désensibilisation

Un ligand qui se fixe sur un récepteur, en plus d'activer le récepteur et d'entraîner une cascade de signalisation cellulaire, initie le processus de désensibilisation qui est une réponse utilisée par les cellules pour arrêter la signalisation du récepteur afin d'éviter les effets néfastes que l'on pourrait avoir avec une stimulation persistante du récepteur. L'action de deux familles de protéines, les β -arrestines et les sérine et thréonine kinases de RCPG (GRK) coordonnent les actions de désensibilisation. Une fois activés, les RCPG sont la cible de un ou plusieurs GRKs et sont phosphorylés sur les résidus intracellulaires et sur la partie C-terminale. Le motif structural commun au RCPG qui permet de recruter les protéines kinases reste inconnu. La phosphorylation de ces résidus entraîne le recrutement des β -arrestines qui bloquent toute interaction avec le complexe hétérotrimérique. La phosphorylation par les protéines kinases A et C permet également de conduire à la désensibilisation du récepteur²⁵.

b. Internalisation

Chez les humains, il existe deux isoformes de la β -arrestine (β -arrestine 1 et β -arrestine 2). Ces β -arrestines servent au recrutement des RCPG et font un lien avec la machinerie d'endocytose. Le recrutement de la β -arrestine entraîne la formation de vésicules tapissées de clathrine ou « clathrin-coated pits » (CCP). La β -arrestine elle-même se fixe sur des éléments de la machinerie des CCP : les complexes hétérotrimériques AP-2 et les clathrines. La β -arrestine 1 est phosphorylée par les enzymes kinases qui modulent le signal extracellulaire (ERK) et la β -arrestine 2 par la kinase caséine 2 (Figure 10).²²

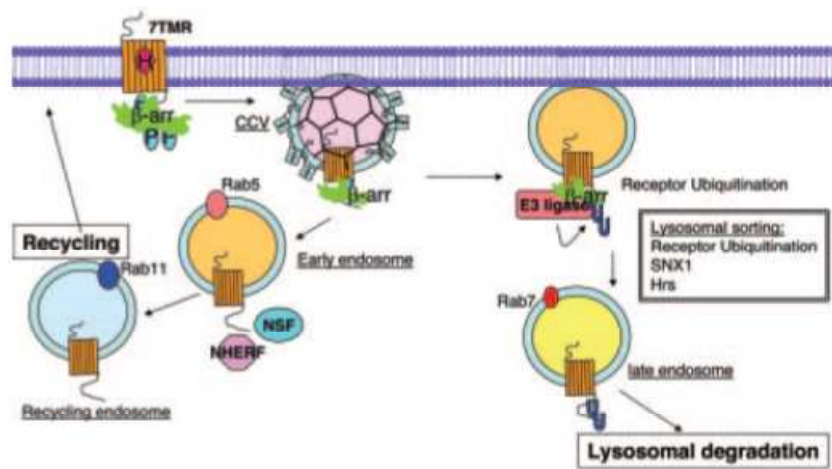


Figure 10 : Implication des β -arrestines dans l'internalisation des RCPG, la machinerie de l'endocytose²²

I. Les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine

1. Contexte historique

L'ocytocine est la première hormone peptidique dont la structure a été déterminée et à avoir été synthétisée sous sa forme biologiquement active. Le nom ocytocine vient du latin « naissance rapide » due à son implication dans les contractions utérines lors de l'accouchement. La structure du gène de l'ocytocine a été élucidée en 1984 et la séquence du récepteur de l'ocytocine a été décrite en 1992.

i. Classification des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine

Les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine sont des récepteurs couplés aux protéines G de la famille de la rhodopsine. Il existe trois sous-types de récepteurs de la vasopressine : les récepteurs V_{1a} , V_{1b} et V_2 et un seul récepteur de l'ocytocine. Les

récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine ont des rôles centraux en plus de leurs rôles périphériques (Tableau 1).

| Récepteur | Couplage | Action |
|-----------|--|---|
| V_{1a} | Gq | Vasoconstriction |
| | Activation PLC Libération calcium intracellulaire | Agrégation plaquettaire Rôles centraux |
| V_{1b} | Gq | Sécrétion de corticotropine |
| | Activation PLC Libération de calcium intracellulaire | |
| V_2 | Gs | Réabsorption d'eau au niveau rénale |
| | Activation de AC Libération de AMPc | |
| OT | Gq | Contractions utérines |
| | Activation de PLC Libération de calcium intracellulaire | Lactation Rôles centraux |

Tableau 1 : Classification des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine

ii. Le récepteur de la vasopressine V_{1a}

Le récepteur V_{1a} est retrouvé dans les cellules du foie, des reins et des muscles lisses entourant les vaisseaux sanguins. Il est également retrouvé au niveau des plaquettes, des adipocytes, sur les organes reproducteurs et dans le cerveau. Le récepteur de la vasopressine V_{1a} est responsable de la vasoconstriction des vaisseaux sanguins. La vasoconstriction est due à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire sous l'influence de l'InsP₃ formé.

Des antagonistes non-peptidiques de ce récepteur peuvent être utilisés dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et de l'hypertension ainsi que de l'agrégation plaquettaire.

iii. Le récepteur de la vasopressine V_{1b}

Ce récepteur est retrouvé dans les cellules corticotropes du lobe antérieur de l'hypophyse. Il intervient dans la réponse au stress. Des antagonistes de ce récepteur auraient un effet anxiolytique ou antidépresseur. Le récepteur V_{1b} a également été détecté dans les tissus périphériques comme le rein, le thymus, le poumon, la rate, l'utérus, le sein et serait impliqué dans une multitude de rôles mal connus.

iv. Le récepteur de la vasopressine V_2

Le récepteur de la vasopressine V_2 est retrouvé principalement au niveau du tube collecteur du rein et est impliqué dans la réabsorption d'eau en régulant la perméabilité de l'urine au niveau de la membrane apicale du tube collecteur. Il est responsable de l'effet

antidiurétique de la vasopressine. Des antagonistes de ce récepteur peuvent être utilisés pour traiter les syndromes de sécrétions inappropriés de l'hormone mais également dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et de cirrhose hépatique décompensée. Ce récepteur est responsable du diabète insipide néphrogénique, altération de l'adressage des récepteurs à la surface des cellules résultant en une incapacité du rein à réabsorber l'eau et à concentrer les urines.

v. Le récepteur de l'ocytocine

On retrouve le récepteur de l'ocytocine dans les cellules musculaires lisses de l'utérus et dans les glandes mammaires. L'utérus est une des cibles majeures de l'ocytocine. L'ocytocine est l'un des agents utérotoniques les plus efficaces et joue un rôle majeur dans l'induction des contractions utérines lors de l'accouchement. Le récepteur de l'ocytocine permet l'éjection du lait en stimulant la contraction des cellules myoépithéliales des canaux entourant les alvéoles des glandes mammaires et stimule également la production de prolactine. Le développement d'antagonistes spécifiques du récepteur de l'ocytocine a permis de développer des traitements pour prévenir les contractions utérines avant terme et de réguler les dysménorrhées.

2. Génomique

Le gène du récepteur de l'ocytocine est localisé sur le chromosome 3p25 et contient 4 exons et 3 introns. Ce gène encode pour un polypeptide de 389 acides aminés qui va se replier sous forme de 7 hélices transmembranaires pour former un récepteur couplé aux protéines G. Le gène du récepteur de la vasopressine V_2 est localisé sur le chromosome Xq28 et contient 3 exons et 2 introns. Le gène de V_{1a} , situé sur le chromosome 12q14.2 et le gène de V_{1b} , situé sur le chromosome 1q32.1 sont constitués de deux exons et un intron.

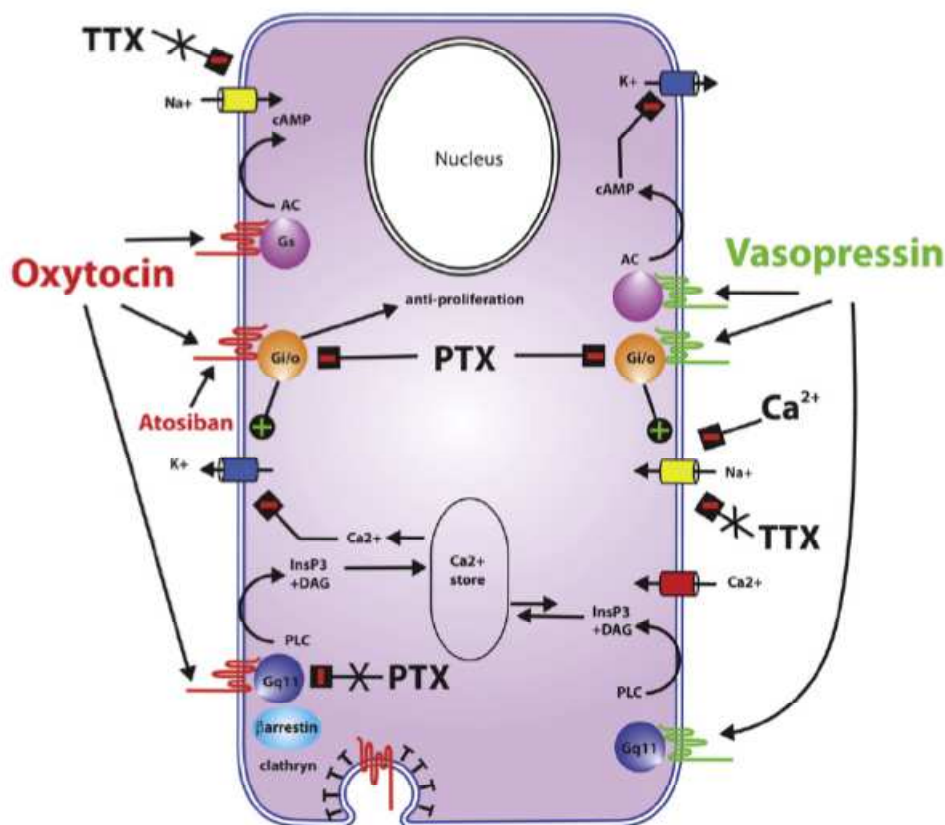
3. Pharmacologie des récepteurs vasopressine et ocytocine

L'activation des récepteurs de la vasopressine V_{1a} , V_{1b} et OT entraîne la production de phospholipases C (PLC), d'InsP₃ et de diacylglycérol : il y a libération de calcium intracellulaire. Le récepteur V_2 , quant à lui, conduit à l'activation de l'adénylate cyclase (AC) qui entraîne la production d'AMP-cyclique.

Le récepteur de l'ocytocine (OXTR) peut être couplé à différentes protéines G conduisant à des effets fonctionnels différents (Figure 11). L'OXTR couplé à une protéine

hétérotrimérique $G_{q/11}$ insensible à la pertussis qui active la phospholipase $C\beta$ ($PLC\beta$), entraîne l'accumulation des phosphoinositides et la mobilisation du calcium intracellulaire. Cette voie de signalisation contrôle les contractions utérines, entraîne l'augmentation de la production d'oxyde nitrique qui peut favoriser une cardiomyogenèse et inhiber les courants rectifiants entrants. Dans les neurones, l'OT peut également activer des courants rectifiants entrants par l'activation de protéines $G_{i/o}$ sensible à la pertussis. A travers le couplage G_s , l'OT active l'adényl cylase et augmente la production de AMPc qui est directement responsable, sans activation de PKA, d'un courant calcique rectifiant entrant résistant à TTX. Des voies de signalisation différentes peuvent être retrouvées entre les tissus neuronal et périphérique²⁶.

Le récepteur de la vasopressine V_{1a} peut activer indépendamment $PLC\beta$, PKC et le changement de la concentration en calcium intracellulaire.



Différentes voies d'activation activées par l'ocytocine ou la vasopressine suivant la protéine G activée, entraînant une activation des canaux sodium TTC-insensible ou l'inhibition des canaux potassium. Le recrutement sélectif de la β -arrestine par G_{q11} activé par l'OT entraîne l'internalisation du récepteur, contrairement à l'atosiban qui active seulement les sous unité $G_{i/o}$.

Figure 11 : Signalisation intramoléculaire de l'ocytocine et de la vasopressine²⁶

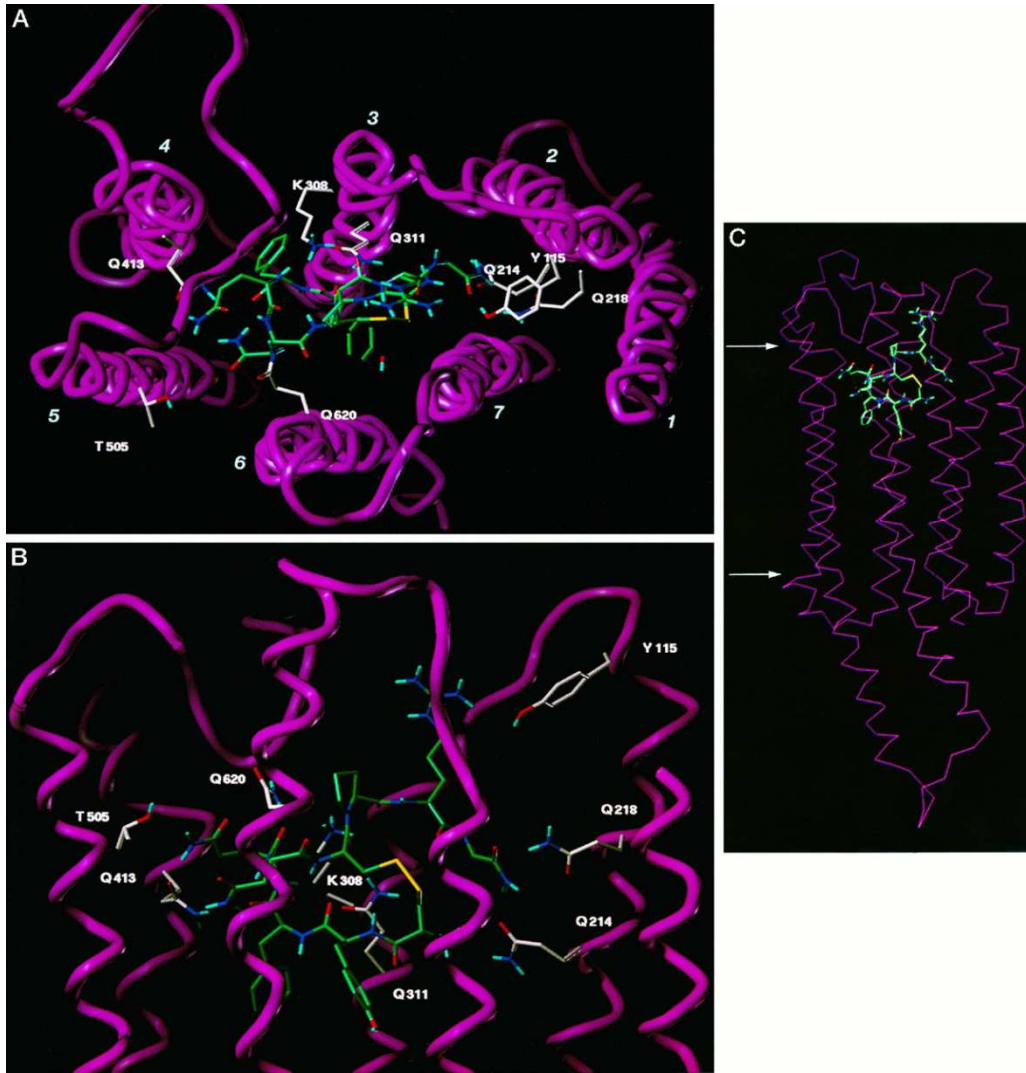
4. Architecture fonctionnelle des récepteurs ocytocine et vasopressine

Les récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine font partie de la famille rhodopsine des récepteurs couplés aux protéines G : ils sont constitués de 7 hélices transmembranaires, liées par des boucles extracellulaires et intracellulaires, une partie N-terminale extracellulaire et une partie C-terminale cytoplasmique. Ces récepteurs ont les marqueurs caractéristiques de pratiquement tous les RCPG : glycosylation des résidus Asn présents sur les domaines extracellulaires, un pont disulfure entre les deux résidus cystéines conservés dans le 2^{ème} et 3^{ème} domaine extracellulaire (nécessaire pour un bon repliement) et deux résidus cystéines conservés dans la partie C-terminale²⁷.

En 1995, Chini et al. mettent en évidence que la Tyr¹¹⁵ dans la première boucle extracellulaire interagit avec le résidu 8 des hormones endogènes et qu'elle est cruciale pour la sélectivité des récepteurs vasopressine et ocytocine²⁸. Ufer et al. démontrent que l'Asp¹⁰³ située sur la première boucle extracellulaire du récepteur de la vasopressine V₂ est responsable de la spécificité des agonistes²⁹.

Un modèle 3D de l'AVP complexée dans le récepteur de la vasopressine V_{1a} est décrit la même année par Mouillac *et al.*³⁰. Pour vérifier le modèle, des expériences de mutagenèse dirigées des résidus impliqués dans la reconnaissance d'agonistes sont effectuées. Le modèle permet de prédire que la partie carboxamide C-terminale de l'AVP forme des liaisons hydrogène avec la Gln²¹⁸ sur la TM2. Gln²¹⁴ forme également des liaisons H avec le groupement amine de la Cys¹ en partie N-terminale de l'AVP et avec la carboxamide de la partie C-terminale. La mutation de ces deux Gln diminue l'affinité de agonistes mais ne change pas l'affinité des antagonistes. La partie carboxamide C-terminale n'est pas nécessaire chez les antagonistes du récepteur de la vasopressine V_{1a}. Le squelette Pro⁷-Arg⁸-Gly⁹ est situé dans la partie transmembranaire du récepteur de la vasopressine V_{1a}.

La chaîne latérale de l'Arg⁸ est localisée dans le voisinage de la Tyr²²⁵ située sur la première boucle extracellulaire. La Tyr²²⁵ est une position clé responsable de la reconnaissance et de la fixation des agonistes. La Gln³¹¹ stabilise l'AVP dans sa structure active et positionne correctement les agonistes dans la cavité par une liaison hydrogène avec le squelette carbonyle de l'Arg⁸ de l'AVP. La Gln³¹¹ peut également faire des liaisons hydrogène avec le carbonyle de l'amide de la Cys⁶ et le proton de l'amide de la Gln⁴ de l'AVP. Un rôle structural similaire est accordé à la Lys³⁰⁸. La mutation de la Gln⁴¹³ sur le TM4 est intéressante car elle influence énormément la fixation des agonistes et des antagonistes.



(A) Vue du complexe depuis la surface extracellulaire du récepteur dans une direction perpendiculaire à la membrane. (B), (C) vue de côté d'une direction parallèle à la surface de la membrane cellulaire. (B) montre le détail des interactions entre l'hormone et le récepteur. (C) montre que la poche de fixation de l'AVP est localisée dans la partie haute des régions transmembranaires. Les flèches blanches indiquent les limites hautes et basses de la membrane lipidique. Dans les cases, le positionnement des domaines transmembranaires 1-7 est dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. Le squelette C α des TM est représenté en magenta. Le squelette de la vasopressine est représenté en vert. Le squelette carbone des chaînes latérales des résidus choisis pour des expériences de mutagenèse dirigées est représenté en blanc. Les atomes d'oxygène sont rouge, les atomes d'azote sont bleu foncé et les atomes de soufre sont jaune. Seuls les atomes d'hydrogène impliqués dans des liaisons H sont représentés (bleu clair). Sauf pour la Tyr115 (nombre de la séquence primaire du récepteur) localisée dans la première boucle extracellulaire, les résidus sont marqués suivant le code suivant : le nombre à gauche indique le numéro de l'hélice α transmembranaire, les deux chiffres suivant indiquent le rang du résidu dans cette région transmembranaire.

Figure 12 : AVP complexée dans le récepteur de la vasopressine V_{1a} de rat³⁰

La complexation de l'AVP révèle deux liaisons H : une liaison H entre la Gln⁴ et la Gln⁴¹³ et une autre liaison H entre la chaîne latérale de la Gln⁴¹³ et le groupement carbonyle de la Phe³ de l'AVP. La très grande différence d'affinité par la mutation de Gln⁴¹³ ne peut être expliquée seulement par la perte de deux liaisons H. La Gln⁴¹³ est adjacente à un dérivé

proline (qui est un élément charnière des hélices α). La Gln⁴¹⁸ peut stabiliser l'hélice α par des liaisons intramoléculaires à travers les chaînes latérales du squelette de l'hélice. Dans ce modèle, la chaîne latérale de la Gln⁴ est engagée dans une liaison H avec la Thr⁵⁰⁵ de la TM5. Cependant la mutation de ce résidu n'affecte pas l'affinité et l'efficacité que ce soit pour les agonistes ou les antagonistes. Il se peut que le résidu ne soit que peu impliqué dans le processus de reconnaissance ou que la liaison H dans laquelle il est impliqué ait une contribution énergétique faible. Il y a une corrélation linéaire entre K_{act} et K_i ce qui suggère que les résidus hydrophiles sont impliqués dans l'affinité des ligands. L'AVP est enfoncée dans la cavité du récepteur à une profondeur comprise entre 15 et 20 Å et interagit avec des acides aminés des hélices transmembranaires. Tous les résidus mutés et impliqués dans la fixation et la reconnaissance des agonistes (Gln²¹⁴, Gln²¹⁸, Gln³¹¹, Gln⁴¹³, Gln⁶²⁰, Lys³⁰⁸) sont conservés dans les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine, ce qui laisse à supposer que le site de fixation des agonistes est donc conservé dans tous les sous-types de récepteurs vasopressine et ocytocine. La fixation des antagonistes n'est pas altérée par la mutation des résidus, il y a donc un site de fixation des agonistes et des antagonistes différent pour le récepteur de la vasopressine V_{1a}.

En 1996, Chini et al. décrivent l'importance de deux résidus aromatiques dans le récepteur de l'ocytocine: Tyr⁵⁰⁹ et Phe⁶⁰⁹. Le remplacement de ces deux résidus par les acides aminés retrouvés dans les récepteurs de la vasopressine (Phe et Tyr respectivement) fait passer l'AVP d'agoniste partiel à agoniste entier. Ces deux résidus modulent donc l'activation du récepteur de l'ocytocine.³¹ Deux autres études d'un groupe allemand³²³³ ont permis de définir le site de liaison d'agonistes peptidiques et non-peptidiques en transférant des domaines du récepteur de l'ocytocine dans le récepteur de la vasopressine V₂. Les hélices transmembranaires 1, 2 et 7 ont une contribution majeure à l'affinité des antagonistes et forment leur site actif. Pour la fixation des agonistes, les trois premières boucles extracellulaires sont plus importantes. Une interaction entre la partie N-terminale du récepteur de l'ocytocine et la partie C-terminale tripeptidique de l'ocytocine est démontrée. La deuxième boucle extracellulaire interagit avec la partie cyclique de l'hormone.

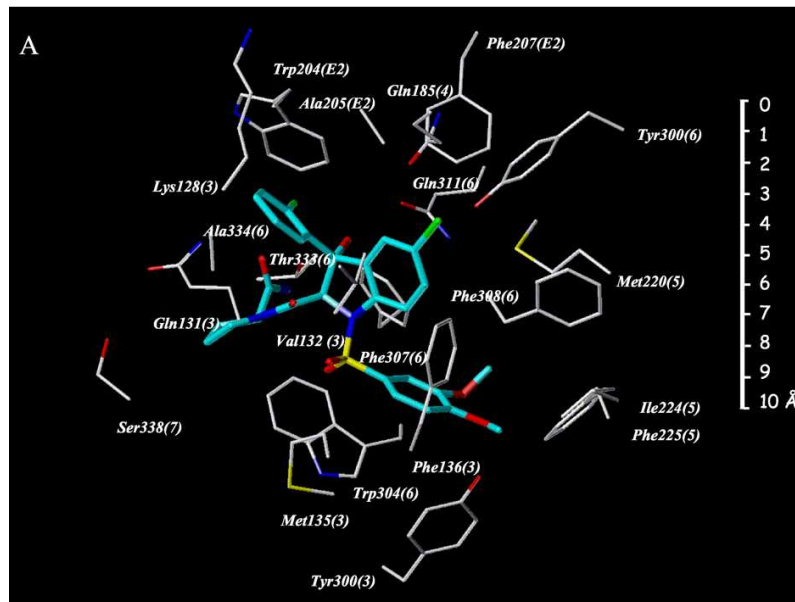
En 1999, Phalipou *et al.*³⁴ décrivent un modèle 3D de la liaison de deux antagonistes au récepteur de la vasopressine V_{1a}. Ce modèle a été validé par des expériences de mutagenèse dirigée et de marquage par photoaffinité. Les deux peptides linéaires antagonistes adoptent une conformation pseudocyclique similaire aux peptides endogènes agonistes.

Etonnamment ces deux peptides antagonistes ($[^{125}\text{I}][\text{Lys}(3\text{N}_3\text{Phpa})^8]\text{HO-LVA}$ et $[^{125}\text{I}]\text{N}_3\text{Phpa-LVA}$) interagissent selon un mode de fixation similaire à l'AVP. La première boucle extracellulaire et la partie supérieure du domaine transmembranaire 7 de $V_{1a}\text{R}$ interagissent avec ces deux antagonistes.

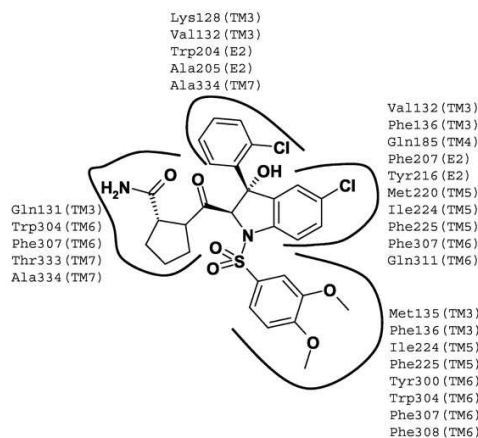
En 2000, Cotte et al. décrivent les résidus qui discriminent la fixation d'un agoniste versus un antagoniste³⁵. Des expériences de mutagenèse dirigée de résidus aromatiques et hydrophobes conservés et non conservés ont été réalisées dans la cavité du récepteur de l'ocytocine. Les mutations des résidus W304, F307 et F308 dans la région TM 6 réduisent l'affinité pour la $\text{d}(\text{CH}_2)_5[\text{Tyr}(\text{Me})_2]\text{AVP}$ et pour l'antagoniste non-peptidique SR49059. La mutation des résidus aromatiques Q108, K128 et Q185 dans les régions TM 2, 3, 4 respectivement, entraîne une diminution de l'affinité pour les agonistes et les antagonistes. Les résidus non conservés T333 et A334 dans la région TM 7 contrôlent la sélectivité V_{1a}/V_2 pour les antagonistes peptidiques cycliques et non-peptidiques. Les résidus aromatiques conservés chez le $V_{1a}\text{R}$ dans la cavité semblent essentiels pour l'agonisme et ne contribuent pas du tout à la fixation des agonistes.

En 2001, des expériences de marquages par photoaffinité à partir d'un antagoniste du récepteur de l'ocytocine a permis de mettre en évidence les domaines de fixation ($\text{Val}^{126}\text{-Val}^{127}\text{-Lys}^{128}$)³⁶. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés précédemment. Le groupement amine protonné de la Lys^{128} peut être impliqué dans une interaction π -cation avec le nuage électronique du phényle de la Phe^9 de l'AVP.

Un groupe de l'université de Birmingham met en évidence l' Arg^{46} localisée à la partie N-terminale du récepteur de la vasopressine V_{1a} comme importante pour l'affinité de l'AVP seulement pour les agonistes^{37,38}. Des études complémentaires quelques années plus tard mettent en évidence 12 résidus du récepteur de la vasopressine V_{1a} conservés trouvés dans les boucles extracellulaires (Arg^{116} , Arg^{125} , Asp^{204} important pour la fixation d'agonistes et pour l'activation du récepteur). L' Arg^{125} stabilise la TM3 en interagissant avec la membrane lipidique. Asp^{204} avec sa charge négative se trouve près du pont disulfure et est essentiel pour la fixation des agonistes et la signalisation. Ce résidu est également important pour maintenir le repliement en épingle à cheveux nécessaire pour que le récepteur soit fonctionnel³⁹. Quatre résidus aromatiques (Phe^{189} , Trp^{206} , Phe^{209} , et Tyr^{218}) sont identifiés pour être importants pour la fixation d'agonistes et pour l'activation du récepteur⁴⁰. Ces résidus sont retrouvés dans la boucle extracellulaire 2.



B



Le logiciel Gold a été utilisé pour docker l'antagoniste non-peptidique sélectif SR49059. (A) Les résidus sont nommés en fonction de leur position dans la séquence primaire. Les nombres entre parenthèses correspondent au numéro de l'hélice TM. Trp²⁰⁴, Ala²⁰⁵ et Phe²⁰⁷ appartiennent à la boucle extra cellulaire 2. Les atomes de carbone pour le SR49059 et le récepteur V_{1a} sont représentés en cyan et en blanc respectivement. (B) Vue schématique du modèle d'interaction. Tous les résidus qui interagissent avec le SR49059 sont représentés. La numérotation des résidus et des hélices TM est la même que pour (A).

Figure 13 : SR49059 complexé dans la cavité du récepteur de la vasopressine V_{1a}⁴¹

En 2003, afin d'identifier le site de fixation de l'antagoniste non-peptidique SR49059, des expériences de marquage irréversible qui combine le mutagenèse et l'utilisation de ligands sulfhydryl réactifs ont été développées⁴². Basées sur le modèle d'un antagoniste complexé dans le récepteur V_{1a}, les hypothèses d'interactions ligand-récepteur ont été étudiées. Le résidu Phe²²⁵ retrouvé dans le domaine transmembranaire 5 participe directement à la fixation de l'antagoniste non-peptidique SR49059 (Figure 13).

En 2005 et 2006, le groupe de Ciarkowski en Pologne décrit une étude de l'interaction de la desmopressine dans le récepteur de la vasopressine V_2 versus les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine. La desmopressine ([1-deamino, 8-D]-AVP) est un agoniste du récepteur de la vasopressine V_2 . Des modèles 3D des récepteurs ont été construits en partant de l'alignement de séquences multiples et du complexe de la rhodopsine activée.

Le modèle plus récent de Rodrigo et al. basé sur la structure de la rhodopsine et validé par des expériences de mutagenèse dirigée montre l'existence d'une interaction électrostatique entre l'Arg⁸ de l'AVP et les acides aminés Glu⁵⁴, Asp¹¹² et Tyr¹¹⁵⁴³.

En 2005, par des expériences de mutagenèse dirigée et modélisation moléculaire, les sites de fixation de l'AVP et des antagonistes non-peptidiques ont été identifiés comme se superposant partiellement. L'AVP se fixe sur la partie extracellulaire du récepteur V_2 de la vasopressine alors que les antagonistes non-peptidiques s'enfoncent plus profondément dans la cavité (en particulier l'OPC12168). Les différences de site de fixation des antagonistes entre le récepteur de la vasopressine V_{1a} et V_2 correspondent à une différence de forme de la poche dans laquelle se fixe les antagonistes⁴⁴.

En 2011, l'entreprise Ferring décrit la Glu¹³⁵ située sur la TM1 comme conservée dans tous les récepteurs de l'ocytocine clonés à ce jour. Ce résidu confère une forte affinité aux agonistes mais n'est pas requis pour la fixation des antagonistes peptidiques comme des non-peptidiques. La modélisation moléculaire laisse à penser que la chaîne latérale interagit avec la chaîne peptidique principale de l'ocytocine ou la partie C-terminale pour orienter le ligand dans la cavité du récepteur⁴⁵.

A partir de toutes ces données, un schéma synthétique de la poche du récepteur de la vasopressine V_{1a} a été réalisé en faisant apparaître les résidus importants pour l'affinité et la sélectivité (Figure 14). Les différentes poches accueillant les ligands sont nommées par analogie avec le site catalytique des enzymes : Pw est la poche au contact du tryptophane de l'hélice 6 contrôlant l'activation, P1 et P2 sont en amont de cette poche d'activation, P'1 et P'2 sont en aval.

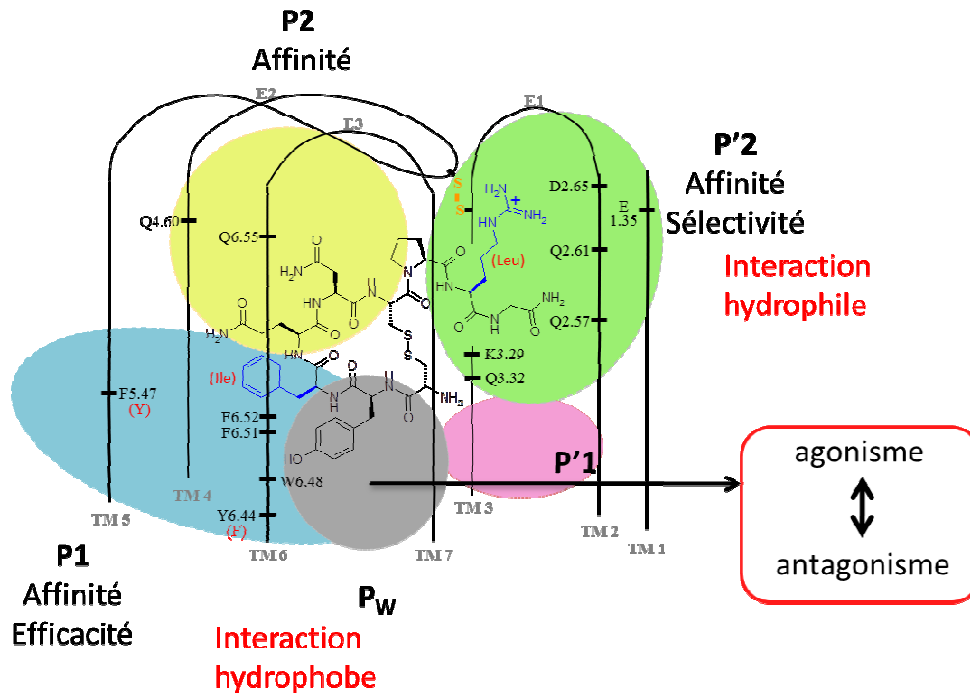


Figure 14 : Cartographie du récepteur V_{1a} comprenant les résidus importants modulant l'affinité et la sélectivité

En perspective, nous attendons les structures cristallines des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine qui nous permettront d'optimiser les modèles 3D et nous donnerons des informations plus précises sur les domaines responsables de la liaison d'agonistes ou d'antagonistes et de l'activation des protéines G.

5. Rôles centraux des récepteurs V_{1a} et OT

Au cours des dernières années, de nombreuses études montrent l'implication du récepteur de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine tout au long du cycle de la vie comme dans l'attachement des individus dans un couple, l'attachement de la mère et du père à leur enfant, l'attachement de l'individu au groupe social. Ces deux hormones semblent agir de manière importante dans de nombreux systèmes essentiels à la survie de l'espèce. Ces deux récepteurs sont également impliqués dans le spectre de l'autisme et pourraient être une possible voie thérapeutique.

Dès les années 90, des scientifiques comme Young et Insel s'intéressent à des espèces de campagnols d'Amérique, petits rongeurs de la taille d'une souris. Ces études ont initié la compréhension de l'attachement parental, la fidélité chez les couples, l'anxiété, l'agressivité et le comportement social.

En 1997, Insel fait des études chez deux populations de campagnols : les campagnols des montagnes qui sont polygames et qui ont un faible instinct maternel et les campagnols des plaines qui sont monogames et qui ont un fort instinct maternel. Ces études montrent une différence de distribution des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine dans le cerveau. Après injection d'antagoniste du récepteur de l'ocytocine chez les campagnols des plaines, le comportement maternel est supprimé et le petit reste en marge du groupe social⁴⁶.

i. Attachement mère-enfant et père-enfant

Le taux d'ocytocine plasmatique augmente à la fois chez la mère et chez le père pendant les 6 mois après la naissance de leur enfant et sont corrélés⁴⁷. L'ocytocine joue un rôle dans le développement des liens d'attachements de la mère pour son enfant dès la grossesse⁴⁸. Le taux d'ocytocine maternel est corrélé au comportement d'affection parentale alors que le taux d'ocytocine paternel est corrélé au comportement de stimulation parentale. L'activité du cerveau de mères regardant une image de leur enfant a été enregistrée par IRM. Les régions du cerveau riches en récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine sont activées. Ces mêmes régions sont également activées lorsqu'une personne regarde son conjoint. L'attachement maternel et l'attachement romantique activent certaines régions similaires du cerveau⁴⁹. Lors de l'allaitement (contact par succion et mains du nourrisson), la mère montre une augmentation de la concentration ocytocine plasmatique⁵⁰. L'administration d'ocytocine en ICV induit un comportement d'attachement maternel persistant chez la ratte vierge⁵¹.

Des souriceaux knock-out du gène *MAGEL* montrent un réflexe de succion altéré et montrent 50% de mortalité infantile. Ces souris montrent également une diminution de l'expression d'ocytocine au niveau de l'hypothalamus. L'injection d'ocytocine permet aux souris mutées de survivre et l'injection d'un antagoniste OT chez les souris sauvages induit une déficience dans la succion. L'ocytocine apparaît comme étant essentielle pour les réflexes de succion chez le nourrisson⁵².

ii. Attachement au sein d'un couple

L'ocytocine est impliquée dans la formation des couples et dans les relations dans un couple. Les études des campagnols des prairies et des montagnes ont permis de comprendre en grande partie la régulation de l'attachement au sein d'un couple⁴⁶. Après avoir perdu son

partenaire le campagnol des prairies ne se retrouve pas de nouveau partenaire alors que le campagnol des montagnes qui n'avait pas de lien d'attachement n'hésite pas à trouver de nouveaux partenaires. L'administration d'ocytocine chez les campagnols des prés facilite la formation du couple. Par contre chez les campagnols monogames, c'est la vasopressine qui est nécessaire pour l'attachement du mâle à la femelle et à ses petits⁵³.

En 2012, une étude porte sur le dosage de l'ocytocine chez de nouveaux couples (3 mois après le début de leur romance). Le taux d'ocytocine est significativement plus élevé chez les nouveaux couples : il y a une augmentation du système ocytocinergique au début d'une relation amoureuse. Le taux d'ocytocine des couples qui resteront ensemble après 6 mois est plus élevé que ceux qui vont se séparer. Le taux d'ocytocine pour les couples qui restent ensemble après 6 mois reste constant au cours du temps⁵⁴. Après un orgasme, il est observé une augmentation de la concentration circulante en ocytocine. Des études chez l'animal ont montré que la libération d'ocytocine après l'orgasme permet 40 min plus tard de réduire les comportements d'anxiété⁵⁵.

iii. Attachement dans un groupe

L'ocytocine et la vasopressine jouent un rôle important dans le maintien du lien social et dans les comportements émotionnels dans un groupe. Avec une injection avant la rencontre sociale chez les souris knock-out OT, la reconnaissance sociale est retrouvée⁵⁵. Le lien social doit faire intervenir la notion de mémoire sociale. Les souris comportant une délétion dans le gène de l'ocytocine montrent une amnésie sociale⁵⁵. En 2005, Kosfeld montre que l'ocytocine augmente la confiance chez les humains. Après inhalation d'ocytocine, les personnes accordent plus facilement des prêts d'argent lors d'un jeu de rôle⁵⁶. L'ocytocine permet donc également d'augmenter la confiance envers autrui. Les fonctions cognitives impliquées dans l'apprentissage sont également régulées par l'ocytocine et la vasopressine⁵⁷. L'ocytocine permet de gérer le stress et d'avoir de l'empathie⁵⁸. Une dose d'ocytocine permettrait de diminuer les conflits dans les couples⁵⁹.

L'ocytocine peut également avoir un rôle dans l'émergence de conflits inter-groupes et dans l'émergence de violence. L'ocytocine provoque un favoritisme du lien intra-groupe et par ce biais un conflit avec les groupes environnants. Cet ethnocentrisme accorde de la valeur aux individus de leur groupe mais prépare le chemin aux conflits intergroupes, pas de façon offensive mais défensive^{60,61}. Les personnes avec une dépression majeure montrent des taux

d'ocytocine plus élevés que la normale. Cela résulte sans doute d'une dérégulation de la synthèse de l'ocytocine. Il reste à déterminer le rôle de l'ocytocine dans ces désordres psychiatriques⁶².

iv. Spectre de l'autisme

L'autisme vient du grec autos qui signifie soi-même. En 1943, l'autisme est décrit pour la première fois par Léo Kanner, pédopsychiatre hongrois, comme « une incapacité innée à établir le contact affectif habituel avec les personnes, biologiquement prévue, exactement comme d'autres enfants viennent au monde avec des handicaps physiques ou intellectuels ». Certains cas d'autisme sont plus atypiques comme le syndrome d'Asperger où les troubles sont les mêmes que ceux de l'autisme mais avec un QI plus élevé. En 1980, le DSM II (Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders) classe l'autisme sous le terme de troubles envahissant du développement (TED). Auparavant l'autisme était classé sous le terme de schizophrénie infantile. Les symptômes associés à l'autisme sont des troubles relationnels, des troubles du langage (écholalie : tendance à répéter tout ou une partie des phrases) et des troubles du comportement (répétitivité).

a. Etudes chez les souris, rats et campagnols

Des études de comportement sur des souris knock-out du récepteur de l'ocytocine ($Oxtr^{-/-}$) ainsi que des souris hétérozygotes du récepteur de l'ocytocine ($Oxtr^{+/-}$) montrent que ces souris ont un phénotype de souris autistes avec une sociabilité perturbée et une augmentation du comportement agressif. Les souris $Oxtr^{+/-}$ ont 50% de récepteurs ocytocine en moins. Une diminution partielle de l'expression du récepteur de l'ocytocine suffit à affecter le comportement social. Seules les souris $Oxtr^{-/-}$ montrent un caractère agressif. L'administration d'ocytocine permet de retrouver un comportement social normal même chez la souris $Oxtr^{-/-}$. Il est postulé que cet effet est médié par les récepteurs de l'ocytocine chez les souris $Oxtr^{-/+}$ et par le récepteur de la vasopressine V_{1a} chez les souris $Oxtr^{-/-}$ ⁶³.

Les souris knock-out du récepteur V_{1a} montrent une réduction des comportements anxieux et des troubles du comportement social. Le récepteur V_{1a} pourrait être également impliqué dans les troubles du spectre de l'autisme⁶⁴.

En 2004, des souris knock-out du récepteur V_{1a} montrent une réduction des comportements liés à l'anxiété et une forte difficulté dans la reconnaissance sociale⁶⁴.

L'administration d'ARN interférant spécifique du récepteur V_{1a} chez des campagnols des prairies entraîne une profonde diminution de la préférence de la femelle et une réduction des comportements liés à l'anxiété. La variation de l'expression du récepteur V_{1a} a un effet profond sur les différences individuelles dans l'attachement social et émotionnel⁶⁵.

Toutes ces études chez les souris et campagnols laissent à supposer que les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine sont impliqués dans l'autisme.

b. Etudes chez le singe

La manipulation pharmacologique chez les primates montre que les comportements sociaux sont altérés après administration d'antagonistes⁶⁶. Des études chez le singe montrent qu'après inhalation d'ocytocine, les individus ont une réduction de l'attention envers les visages avec des expressions négatives mais cela n'altère pas l'attention envers les visages neutres ou des images. Leur attention envers les visages qui détournent le regard des yeux tend à augmenter. L'ocytocine affecte l'évaluation émotionnelle des images pendant les premières phases de l'analyse de l'information⁶⁷. Une étude de 2011 montre que l'inhalation d'ocytocine chez les macaques rhésus augmente leur comportement de donation sociale (récompense partagée avec l'autre)⁶⁸.

c. Etudes chez l'homme

En 1998, une étude sur la concentration plasmatique d'ocytocine chez un groupe autiste et un groupe normal montre que le groupe autiste présente une concentration plasmatique moyenne d'ocytocine plus faible que le groupe normal. En regardant individuellement les concentrations chez les personnes autistes, on peut voir que certains individus ont des concentrations d'OT normales, voire élevées. Une mutation dans la cascade de l'ocytocine ne serait pas l'unique cause de l'autisme, les causes seraient multiples et variées⁶⁹. Une étude de la concentration en précurseur de l'ocytocine est effectuée dans un groupe d'enfants autistes. Le précurseur de l'ocytocine possède trois acides aminés en plus sur la partie C-terminale et est clivé par deux enzymes : les pré-hormones convertases 2 et 5. On trouve une forte concentration en précurseur : il pourrait y avoir un problème dans la cascade métabolique de l'OT ou une altération des pré-hormones convertases (PC2 et PC5)⁷⁰.

En 2003, un groupe décrit la mesure des comportements répétitifs après l'administration d'ocytocine par voie intraveineuse à un groupe de patients autistes. Tous les patients

montrent une diminution des comportements répétitifs et compulsifs⁷¹. En 2007, le même groupe mesure cette fois-ci la compréhension du langage après administration d'ocytocine par voie intraveineuse chez des patients autistes. Tous les patients montrent une amélioration de la compréhension des émotions par la parole et une rétention de la capacité à associer une signification à l'intonation du langage. L'ocytocine apparaît comme un moyen de faciliter l'analyse de l'information sociale chez les autistes⁷².

En 2010, une étude du groupe d'Angela Sirigu portant sur un groupe d'autistes montre qu'après inhalation d'ocytocine, le temps de fixation des patients sur les différentes parties du visage est modifié. Les patients regardent les visages plus directement dans les yeux. Un jeu de balle virtuel montre que les patients transmettent la balle préférentiellement vers le bon joueur (et non vers le mauvais). L'ocytocine permet de faciliter l'apprentissage et de mieux comprendre le contexte social. En 2010, Guastella montre qu'après administration d'ocytocine par inhalation, on augmente la reconnaissance des émotions chez les jeunes patients autistes (12-19 ans)⁷³. En 2012, Hollander publie une étude d'administration d'ocytocine chez des patients autistes pendant 6 semaines. Une amélioration de la compréhension sociale et de la qualité de vie chez les patients est constatée⁷⁴. En 2013, une étude d'administration d'ocytocine chez de jeunes autistes (7-16 ans) ne montre aucune amélioration de la reconnaissance sociale ou des interactions sociales. L'effet bénéfique de l'administration d'ocytocine chez de jeunes patients est à prendre avec prudence.⁷⁵

Toutes ces études montrent que l'ocytocine apparaît comme être une possible voie thérapeutique pour les autistes. Cependant, l'ocytocine a une demi-vie de 20 minutes et ne passe la barrière hémato-encéphalique que par inhalation. Pour une utilisation thérapeutique, il est donc nécessaire de concevoir une molécule plus petite, stable et sélective pour le récepteur de l'ocytocine.

II. Les ligands des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine

L'ocytocine est la première hormone à être séquencée et synthétisée par Vincent du Vigneaud qui obtient le prix Nobel de Chimie pour ces travaux en 1955.

1. Biosynthèse et sécrétion

L'ocytocine et la vasopressine sont synthétisées dans les neurones magnocellulaires dans le noyau paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus et sont transportées le long des

projections axonales vers le lobe supérieur de l'hypophyse (ou glande pituitaire). Les deux hormones sont stockées sous forme de vésicules et sont relarguées dans la circulation périphérique par exocytose en fonction de l'activation électrique de ces terminaisons. En plus du relarguage au niveau des terminaisons axonales, il y a une libération dendritique d'AVP et d'OT dans l'espace extra-cellulaire. Cette libération n'est pas seulement locale, il y a une diffusion dans le cerveau. Les petits neurones parvocellulaire du noyau paraventriculaire produisent également de l'ocytocine et de la vasopressine qui sont libérées directement dans les autres parties du cerveau par transport le long des projections axonales. Les différentes régions du cerveau ciblées sont : amygdale, hippocampe, striatum, noyau supra-chiasmatique, noyau des stries terminales et moelle épinière. Ces hormones jouent le rôle de neuromodulateurs ou de neurotransmetteurs et contrôlent une partie de la neurotransmission. Par exemple, la population neurale de l'amygdale est contrôlée par l'OT et l'AVP (Figure 15)⁷⁶.

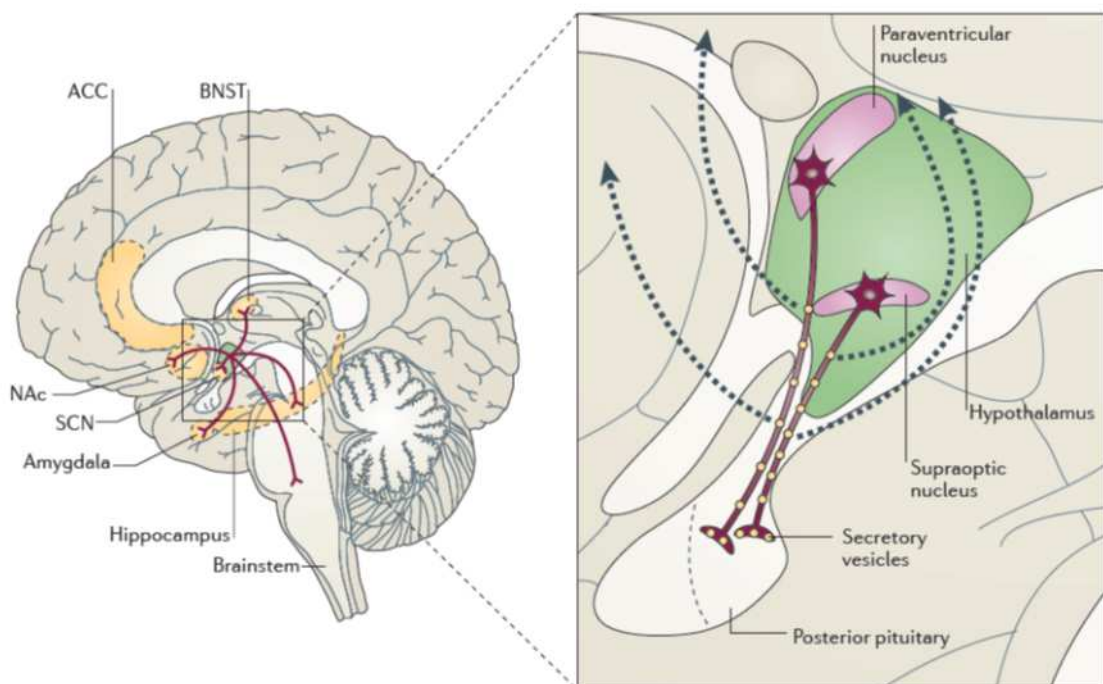


Figure 15 : Neurophysiologie de l'ocytocine et de la vasopressine. ACC: cortex cingulate antérieur ; BNST : noyau de la strie terminale ; NAc : noyau accumbens ; SCN : noyau supra-chiasmatique⁷⁶

Ces neurohormones sont synthétisées sous la forme de précurseurs plus gros et sont attachées à une neurophysine. Le précurseur de l'AVP est la prépro-arginine vasopressine qui est constituée d'une séquence de tête (19 acides aminés), suivie de l'hormone et d'un glycopeptide. Le précurseur de l'ocytocine est la prépro-ocytocine qui a la même

composition que le précurseur de l'AVP mais ne contient pas de glycoprotéine. Ces deux précurseurs sont synthétisés dans les ribosomes des corps cellulaires des neurones. Dans l'appareil de Golgi, ces précurseurs sont empaquetés sous forme de granules de sécrétion après l'excision de la séquence de tête. Ces granules de sécrétions sont transportés jusqu'aux terminaisons de l'hypophyse postérieure par le flux axoplasmique. Pendant le transport, les précurseurs sont clivés et les hormones AVP et ocytocine sont libérées⁷⁷. Dans le RE s'effectue le repliement du précurseur qui est sujet à un contrôle qualité qui ne tolère aucun repliement anormal de la préprohormone. L'association neurophysine-préprohormone permet ce repliement adéquat⁷⁸.

2. Structure

L'ocytocine et la vasopressine sont des hormones nonapeptidiques comprenant un pont disulfure entre la cystéine 1 et la cystéine 6. Ces deux peptides ont une très grande homologie structurale puisque ils ne se distinguent que par deux acides aminés en position 3 et en position 8 (Figure 16).

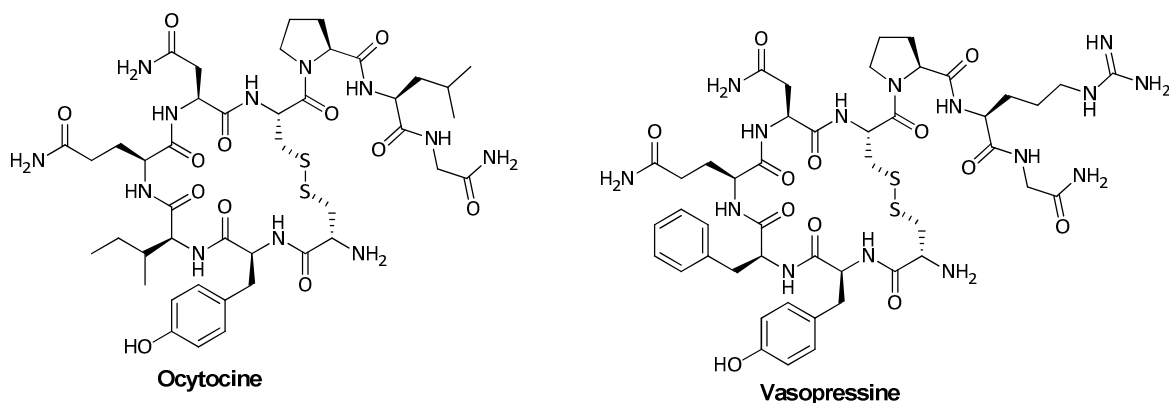


Figure 16 : Structure de l'ocytocine et de la vasopressine

La vasopressine se fixe sur les quatre sous-types de récepteurs de façon nanomolaire. L'ocytocine a une affinité préférentielle pour le récepteur de l'ocytocine mais a une activité agoniste sur les récepteur de la vasopressine V_{1a} et V_2 (Tableau 2).

| | K_i (nM) | | | |
|-----|------------|-----------|----------|--------|
| | $V_{1a}R$ | $V_{1b}R$ | $V_{2}R$ | $OXTR$ |
| AVP | 1.1 | 0.68 | 1.2 | 1.7 |
| OT | 120 | 1782 | 1544 | 0.79 |

Tableau 2 : Affinités des peptides endogènes AVP et OT pour les différents sous-types de récepteurs

3. Ligands synthétiques

Il existe plusieurs agonistes peptidiques et antagonistes non-peptidiques du récepteur de l'ocytocine. La carbétocine⁷⁹ possède une modification du pont disulfure et de la partie N-terminale qui lui confère une plus grande stabilité et durée d'action. Ce peptide est commercialisé sous le nom de Duratocin[®] et est utilisé en injection intraveineuse dans le cas des hémorragies postpartum (Figure 17, Tableau 3).

Un des premiers antagonistes du récepteur de l'ocytocine est l'atosiban⁸⁰. Cette molécule a été développée par les laboratoires *Ferring Pharmaceuticals* © et est commercialisée en Europe pour le traitement des accouchements avant terme (Tractocile[®]). Le Barusiban⁸¹, plus stable, puissant, sélectif et avec une durée d'action plus longue a été également développé par *Ferring Pharmaceuticals* © (Figure 17, Tableau 3).

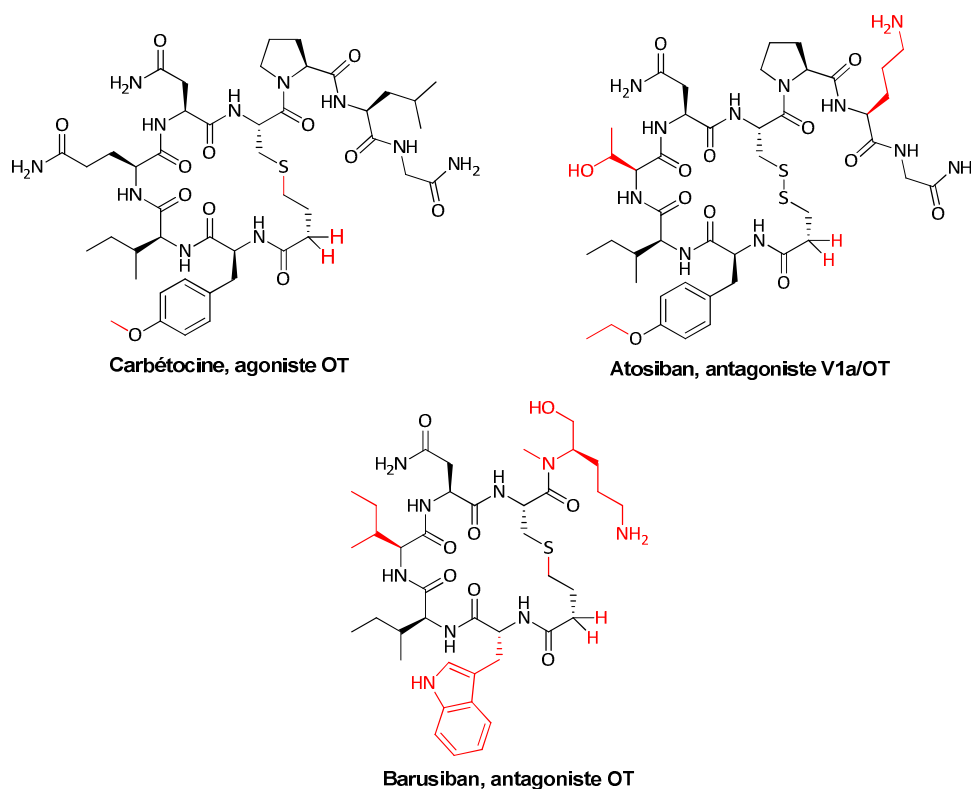


Figure 17 : Structure des principaux ligands peptidiques synthétiques des récepteurs de l'AVP et de l'OT

| | K _i (nM) | | | |
|-------------------------|---------------------|-------------------|------------------|------|
| | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| Carbétocine | 7.24 | - | 61.3 | 1.96 |
| Atosiban | 4.7 | 256 | >1000 | 397 |
| Barusiban ⁸¹ | 85 | - | - | 0.31 |

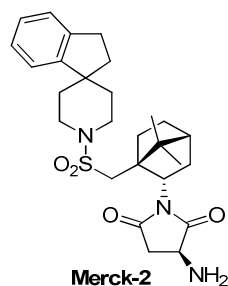
Tableau 3 : Affinités des ligands peptidiques pour les récepteurs humains de la vasopressine et de l'ocytocine

i. Ligands du récepteur de l'ocytocine

a. Antagonistes non-peptidiques

De nombreux antagonistes non-peptidiques sont décrits dans la littérature. Un recensement des **principaux antagonistes de l'ocytocine sélectifs** est décrit ci-dessous.

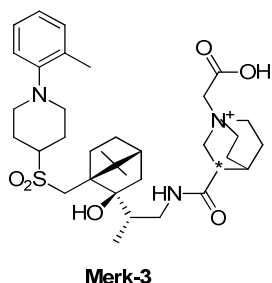
Dans les années 1990, les laboratoires Merck® s'intéressent au développement d'antagonistes non-peptidiques du récepteur de l'ocytocine dérivés de spiroindène-pipéridine. Le composé **Merck-2** est la molécule de la série la plus aboutie avec une bonne sélectivité et disponibilité par voie orale. (Figure 18).



| | IC ₅₀ (nM) | | | |
|-----------------------|-----------------------|-------------------|------------------|------|
| | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| Merck-2 ⁸² | 610 | / | 1300 | 12 |

Figure 18 : Structure et affinité de l'antagoniste du récepteur de l'ocytocine Merck-2

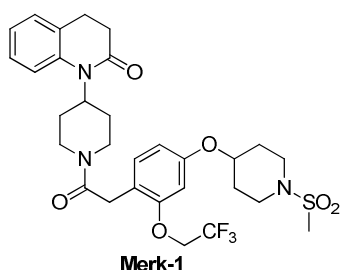
Par la suite le motif spiroindène-pipéridine est remplacé par une sous-structure de type o-tolylpipéridine apportant une configuration similaire. Un des dérivés le plus puissant de cette famille est le composé **Merck-3** avec une sélectivité de 40 pour V_{1a}R et de 230 pour V₂R (Figure 19).



| | K _i (nM) | | | |
|-----------------------|---------------------|-------------------|------------------|------|
| | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| Merck-3 ⁸³ | 400 | / | 2100 | 9.2 |

Figure 19 : Structure et affinité de l'antagoniste du récepteur de l'ocytocine Merck-3

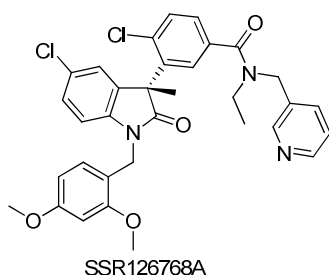
En 2002, les *laboratoires Merck* © décrivent la synthèse d'un antagoniste non-peptidique sélectif du récepteur de l'ocytocine (**Merck-1**) et qui peut être utilisé comme radioligand par marquage au soufre 35 (Figure 20).



| | Cellules | K _i (nM) | | | |
|------------------------------|----------|---------------------|-------------------|------------------|-----------|
| | | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| Merck-1 ⁸⁴ | Humaine | 556±216 | >1000 | 657±269 | 0.29±0.17 |
| | Rat | 3.5±1.7 | / | 44±21 | 1.1±0.73 |

Figure 20 : Structure et affinité de l'antagoniste du récepteur de l'ocytocine Merck-1

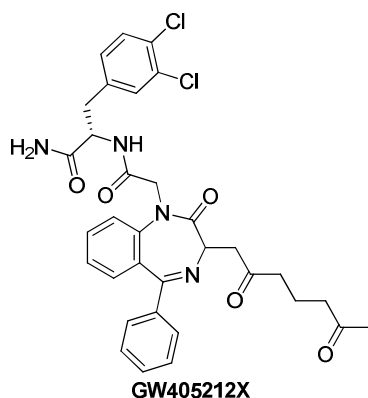
Le **SSR126768A** est un antagoniste sélectif du récepteur de l'ocytocine actif développé par *Sanofi*©. Cette molécule est active par voie orale et prévient les contractions utérines chez le rat (Figure 21)⁸⁵.



| | K _i (nM) | | | |
|-------------------|---------------------|-------------------|------------------|---------|
| | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| SSR126768A | 143±23 | >1000 | >1000 | 1.5±0.8 |

Figure 21 : Structure et affinité de l'antagoniste sélectif du récepteur de l'ocytocine de la classe des indolinones

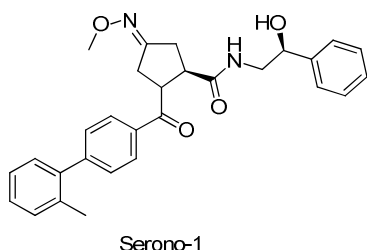
En 2001, *GlaxoSmithKline* © cherche à optimiser la touche **GW4052212X** (mauvaise pharmacocinétique et trop gros poids moléculaire) issue d'un criblage⁸⁶. Il s'avère que toutes les modifications entraînent une perte d'affinité (Figure 22)⁸⁷.



| | K _i (nM) | | | |
|-------------------|---------------------|-------------------|------------------|------|
| | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| GW4052212X | >1000 | >1000 | >1000 | 9.5 |

Figure 22 : Structure et affinité des antagonistes du récepteur de l'ocytocine de la classe des 1,4-benzodiazépines

En 2003, *Serono* © décrit la synthèse du **Serono-1** qui a une activité *in vitro* et *in vivo* sur les contractions utérines (Figure 23)⁸⁸.



| | K _i (nM) | | | |
|-----------------|---------------------|-------------------|------------------|------|
| | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| Serono-1 | 170 | >10000 | >10000 | 28 |

Figure 23: Structure et affinité de l'antagoniste Serono-1 du récepteur de l'ocytocine de la classe des pyrrolidines

En 2005, *Serono* © reporte une classe d'antagonistes non-peptidiques sélectifs du récepteur de l'ocytocine de la famille des hydrazones sulfanilides⁸⁹. Deux campagnes de criblage ont permis d'identifier le composé **Serono-2**. Des premières études de RSA permettent d'aboutir au composé **Serono-3** sélectif du récepteur OT mais qui ne présente pas de biodisponibilité par voie orale du fait de sa faible solubilité dans l'eau. Suite à une deuxième série de RSA, le composé **Serono-4** est identifié pour avoir une bien meilleure biodisponibilité et inhiber les contractions utérines chez la ratte enceinte de 30% à une dose de 30 mg/kg (Figure 24).

| Nom | Structure | R ₁ | R ₂ | K _i (nM) sur récepteurs humains | | | |
|-------------------------------|-----------|----------------|----------------|--|-------------------|------------------|---------------|
| | | | | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| Serono-2 ⁸⁹ | | -H | -H | >10000 | / | / | 90 |
| Serono-3 ⁸⁹ | | -Me | -OEt | 1410 | >1000 | >1000 | 14±18 |
| Serono-4 ⁸⁹ | | -Cl | | 42±18 | / | / | 0,65± 0.16 |

Figure 24 : Structure et affinités des antagonistes non-peptidiques du récepteur de l'ocytocine dérivés de hydrazone-sulfonamides

Le groupe *Pfizer* © a identifié une touche dérivée du châssis triazole par criblage à haut débit de leur chimiothèque. Une série de ligands dérivés 1,2,4-triazoles (**Pfizer 2005**) furent développés et brevetés⁹⁰. En 2008 est publié le composé **Pfizer 2008** qui montre une biodisponibilité par voie orale tout en gardant la sélectivité pour le récepteur de l'ocytocine.

C'est en cherchant à améliorer les propriétés pharmacocinétiques que le composé **Pfizer 2010** est développé. Cette molécule montre une augmentation de la solubilité aqueuse et de la sélectivité mais ne possède pas d'activité antagoniste *in vivo* (Figure 25)⁹¹.

| Nom | Structure | K _i (nM) sur récepteurs humains | | | |
|----------------------------------|-----------|--|-------------------|------------------|------|
| | | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| Pfizer 2005 ⁹⁰ | | / | / | / | 3 |
| Pfizer 2008 ⁹² | | 388 | >10000 | >10000 | 6 |
| Pfizer 2010 ⁹³ | | 1120 | >10000 | >10000 | 9.5 |

Figure 25 : Structure et affinité des antagonistes du récepteur de l'ocytocine de la classe des 1,2,4-triazoles

GlaxoSmithKline © développe des antagonistes du récepteur de l'ocytocine dérivés de dicétopipérazine. En 2005, une première publication décrit le composé **GSK-3** issu des premières études de RSA. Dans la foulée, les **GSK-4** et le **GSK-5** sont issus d'une deuxième étude RSA. Les **GSK-3** et **GSK-4** montrent une exposition orale modérée chez le rat. Une légère augmentation de la disponibilité orale est obtenue avec le composé **GSK-5**. Le composé **GSK-6** développé par la suite possède une très bonne biodisponibilité. Décrit en 2008, le **GSK221149A** montre une très bonne sélectivité ainsi qu'un très bon profil pharmacocinétique chez le rat (Figure 26).

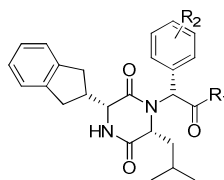
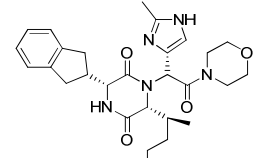
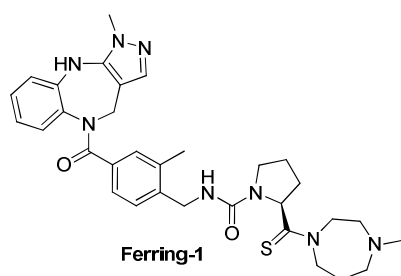
| Nom | Structure | R ₁ | R ₂ | K _i (nM) sur récepteurs humains | | | |
|---------------------------|---|---------------------|--------------------|--|-------------------|------------------|------|
| | | | | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| GSK-3 ⁹⁴⁹⁵ |  | NHCHMe ₂ | 4-F | >6300 | >6300 | 1250 | 4.0 |
| GSK-4 ⁹⁵ | | NHCHMe ₂ | 4-NMe ₂ | >40000 | >50000 | >80000 | 3.2 |
| GSK-5 ⁹⁵ | | NHCHMe ₂ | 2,4-diF | 6300 | >6300 | 630 | 1.2 |
| GSK-6 ⁹⁶ | | NMe ₂ | 2,4-diF | >6300 | >6300 | 300 | 0.63 |
| GSK-221149A ⁹⁷ |  | / | / | >10000 | >10000 | 950 | 0.65 |

Figure 26 : Structures et affinités des antagonistes non-peptidiques du récepteur de l'ocytocine dérivés de dicetopipérazines

b. Agonistes non-peptidiques

Il n'existe que deux agonistes non-peptidiques décrits comme tels dans la littérature.

Le premier agoniste non-peptidique **Ferring-1** est décrit dans la littérature en 2004⁹⁸ par les laboratoires *Ferring Pharmaceuticals* ©. Cette molécule est issue de deux campagnes de criblage et est décrite pour avoir une EC₅₀ de 33±15 nM pour le récepteur de l'ocytocine et de 850±280 nM pour le récepteur de la vasopressine V_{1a} (mesure par gène rapporteur NFAT-luciférase). Cet agoniste resynthétisé au laboratoire a été testé en fonction⁹⁹ : le Ferring-1 est peu sélectif par rapport au récepteur de la vasopressine V_{1a} avec un facteur 2 (Figure 27).

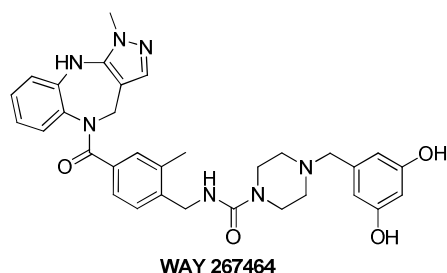


| Ferring-1 ⁹⁹ | K _i (nM) | | | |
|-------------------------|---------------------|-------------------|------------------|--------|
| | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| | 330±38 | / | >1000 | 147±11 |

Figure 27 : Structure et affinité de l'agoniste non-peptidique du récepteur de l'ocytocine Ferring-1

En 2010 est décrit un deuxième agoniste non-peptidique du récepteur de l'ocytocine, le **WAY-267464** par les laboratoires *Wyeth* ©. Cette molécule est construite autour du même châssis benzodiazépine que le Ferring-1. (Figure 28). Le **WAY-267464** est sélectif du récepteur de l'ocytocine et a une EC₅₀ de 29.0±14.3 nM avec un pourcentage de réponse maximale de 93% (mesure du signal calcique)¹⁰⁰. En 2012, le groupe de McGregor¹⁰¹ montre

que cette molécule ne serait pas sélective du récepteur de l'ocytocine et serait faiblement agoniste du récepteur de l'ocytocine avec une EC₅₀ de 881 nM.



| | Année | K _i (nM) | | | |
|---------------|---------------------|---------------------|-------------------|------------------|-----------|
| | | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| WAY- | 2010 ¹⁰⁰ | > 1000 | >1000 | >1000 | 58.4±11.3 |
| 267464 | 2012 ¹⁰¹ | 113 | / | / | 978 |

Figure 28 : Structure et affinité de l'agoniste non-peptidique du récepteur de l'ocytocine WAY267464

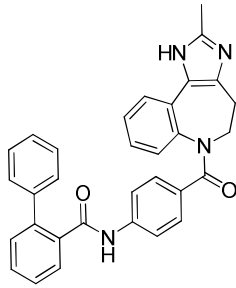
Une discussion et une comparaison des valeurs d'affinité et de fonction de ces deux agonistes non-peptidiques du récepteur de l'ocytocine sont effectuées dans la *Partie 2 Chapitre 2*.

ii. Ligands du récepteur de la vasopressine V_{1a}

a. Antagonistes non-peptidiques

Plusieurs sociétés ont investi dans le développement d'antagonistes V_{1a}/V₂ qui peuvent être utilisés pour traiter l'insuffisance cardiaque ou les désordres rénaux ainsi que des antagonistes sélectifs de V_{1a}R qui pourraient avoir un intérêt thérapeutique dans la dysménorrhée, l'accouchement prématuré, l'hypertension, le syndrome de Raynaud, la dépression, l'anxiété, l'hyponatrémie et l'insuffisance cardiaque.

Le **conivaptan (YM087)** a été découvert par *Yamanouchi Pharmaceutical ©* au Japon et développé par *Astellas Pharma ©* aux Etats Unis (Figure 29)¹⁰². C'est un antagoniste mixte des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V₂ et le seul de la classe des vaptans à avoir été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration). Commercialisé sous le nom de Vaprisol et sous forme d'injection intraveineuse, il est utilisé pour le traitement de l'hyponatrémie. Il est également entré en phase clinique pour la prise en charge de l'insuffisance cardiaque.

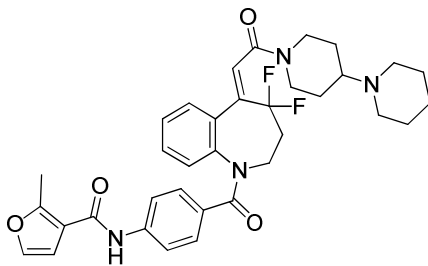


YM 087 ou Conivaptan

| | K _i (nM) | | | |
|----------------------------|---------------------|-------------------|------------------|------|
| | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| YM087 ou Conivaptan | 0.48 | >10000 | 3.0 | 44 |

Figure 29 : Structure et affinités du Conivaptan, antagoniste mixte V_{1a}/V₂

Yamanouchi Pharmaceutical © ont développé par la suite un antagoniste non-peptidique, le **YM218**, sélectif du récepteur de la vasopressine V_{1a} dérivé du même châssis que le conivaptan (Figure 30)¹⁰³.

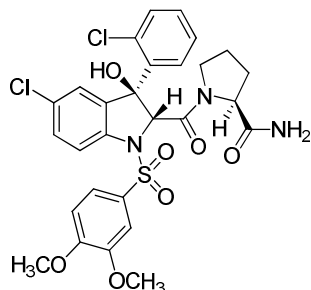


YM 218

| | K _i (nM) | | | |
|--------------|---------------------|-------------------|------------------|------|
| | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| YM218 | 0.3 | 25500 | 381 | 71 |

Figure 30 : Structure et affinité de YM218, antagoniste sélectif du récepteur de la vasopressine V_{1a}

Le **SR49059** ou **Relcovaptan** a été développé par *Sanofi* © en 1993 et resta longtemps l'antagoniste non-peptidique et sélectif du récepteur V_{1a} le plus puissant. Il rentra en études cliniques pour le traitement de l'hypertension, de l'insuffisance cardiaque et de dysménorrhées mais fut stoppé en phase II à cause de sa toxicité hépatique à fortes doses (Figure 31)¹⁰⁴.



SR49059 ou Relcovaptan

| | K _i (nM) | | | |
|----------------|---------------------|-------------------|------------------|------|
| | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| SR49059 | 1.5-6.3 | 220±30 | 275±50 | 130 |

Figure 31 : Structure et affinité de l'antagoniste non-peptidique SR49059 ou Relcovaptan du récepteur de la vasopressine V_{1a}

En 2002, *Kakefuda* © décrit le **Kakefuda-1** comme antagoniste du récepteur de la vasopressine V_{1a} . La sélectivité pour les récepteurs V_{1b} et OT n'a pas été mesurée (Figure 32). Cette molécule a une sélectivité de 9900 par rapport au récepteur de la vasopressine V_2 .

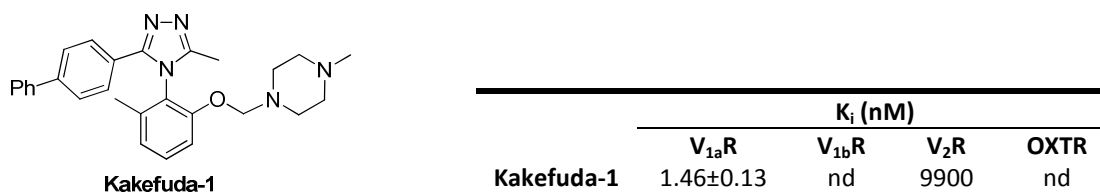


Figure 32 : Structure et affinité du composé Kakefuda-1 décrit par Kakefuda, antagoniste du récepteur V_{1a}

Les ligands **SRX246** et **SRX251** ont été développés par *Azevan Pharmaceuticals* © et montrent une forte affinité et sélectivité pour le récepteur de la vasopressine V_{1a} ainsi qu'un bon passage de la BHE (Figure 33). Le dérivé **SRX246** a passé la phase I de développement (bonne tolérance et sécurité) en 2013 et entre en phase II de développement pour le traitement des personnes souffrant de syndrome de stress post-traumatique et de troubles explosifs intermittents (TEI). Cette molécule passe bien la BHE avec un pourcentage de passage de 20% par rapport au taux plasmatique et un temps de demi-vie de 6 h.¹⁰⁵¹⁰⁶ Des études ont montré que le ligand **SRX251** bloque sélectivement le comportement agressif chez les hamsters¹⁰⁷. Ce dérivé est également allé jusqu'en phase 1 de développement en 2006 pour le traitement de la douleur associée à une dysménorrhée.

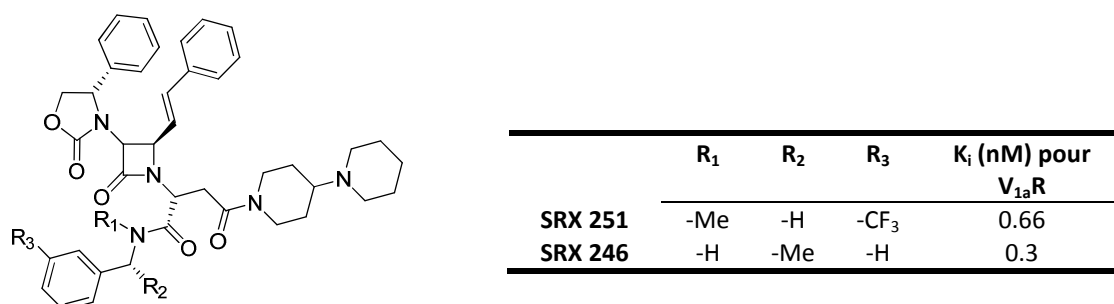
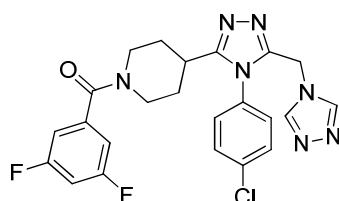


Figure 33 : Structure et affinité des antagonistes non-peptidiques **SRX251** et **SRX246** du récepteur de la vasopressine V_{1a}

En 2011, *Pfizer* © décrit le **PF-00738245** qui est un antagoniste non-peptidique et sélectif du récepteur de la vasopressine V_{1a} issu d'une campagne de criblage. Cet antagoniste bloque les contractions myométriales humaines *in vitro* et des études *in vivo* montrent qu'après administration de **PF-00738245**, on constate une diminution du flux sanguin cutané induit par la capsaïcine (Figure 34)¹⁰⁸.



PF-00738245

K_i (nM) pour V_{1a}R= 2.85 nM

Sélectif pour V_{1b}, V₂ et OT

Figure 34 : Structure et affinité de l'antagoniste PF-00738245 non-peptidique sélectif du récepteur de la vasopressine V_{1a}

RWJ676070, antagoniste mixte V_{1a}/V₂ a été développé par *Johnson&Johnson Pharmaceuticals* © en 2007¹⁰⁹¹¹⁰. Ce ligand est issu de l'optimisation de **RWJ339489**¹¹¹ dont le développement a été arrêté en phase clinique à cause de la toxicité à de fortes doses. **RWJ676070** est sélectif des récepteurs de la vasopressine V_{1b} et de l'ocytocine et se fixe sur les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V₂ avec des affinités de 1.4 et 14 nM respectivement (Figure 35).

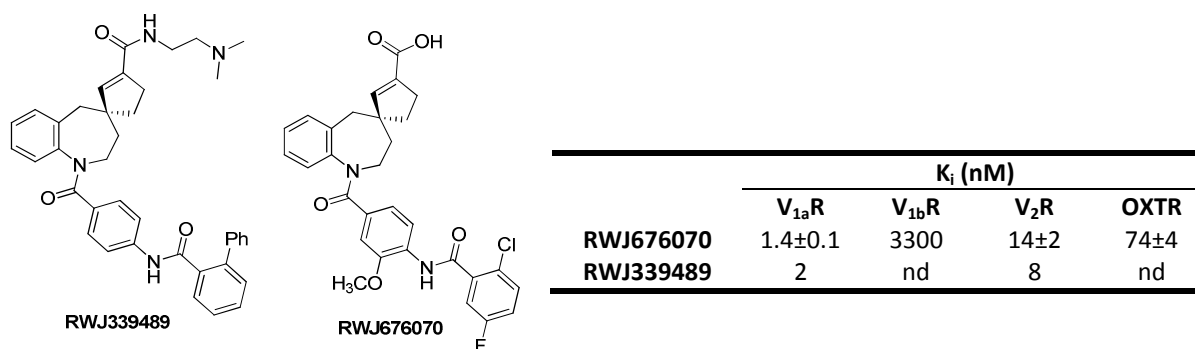
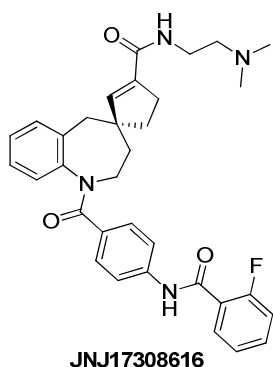


Figure 35 : Structure et affinité des antagonistes non-peptidiques RWJ339489 et RWJ676070 du récepteur de la vasopressine V_{1a}

En 2009, le composé **JNJ17308616** développé par *Johnson & Johnson Pharmaceutical* © est décrit pour être un antagoniste sélectif du récepteur V_{1a} et réduire les comportements d'anxiété chez la souris et chez le rat¹¹². Cependant l'affinité de cette molécule pour le récepteur V_{1a} chez le rat diminue (K_i 216 nM). Elle se fixe également sur le récepteur de l'ocytocine et ne passe que faiblement la BHE. **JNJ17308616** ne constitue pas un bon outil pharmacologique (Figure 36).



| | K _i (nM) | | | |
|--------------------|---------------------|-------------------|------------------|-----------|
| | V _{1a} R | V _{1b} R | V ₂ R | OXTR |
| JNJ17308616 | 5.0±0.5 | >10000 | 421±87 | 6580±1181 |

Figure 36 : Structure et affinité de l'antagoniste non-peptidique JNJ17308616 du récepteur de la vasopressine V_{1a}

En 2011, le composé **Arbuckle-1**¹¹³ est décrit pour être un puissant antagoniste sélectif du récepteur de la vasopressine V_{1a} mais ayant un poids moléculaire élevé, une trop grande lipophilie, une trop grande flexibilité et une pauvre stabilité métabolique dans les microsomes de foie humain. Des travaux de RSA ont été effectués autour de cette molécule afin d'optimiser les propriétés métaboliques et pharmacocinétiques du composé **Arbuckle-1**. Ces études ont abouti au composé **Arbuckle-2** qui est sélectif et passe la BHE avec un pourcentage de 60% (Figure 37).¹¹³

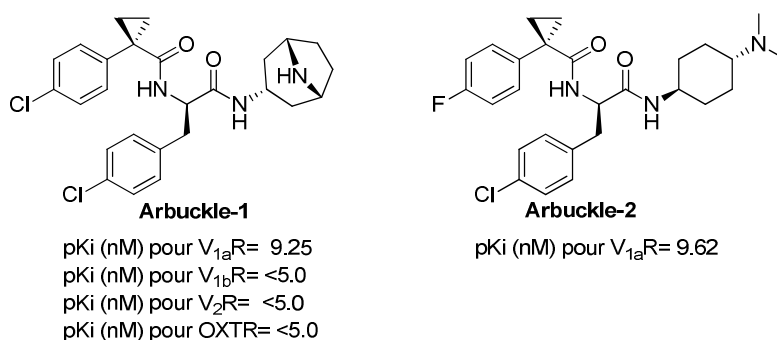


Figure 37 : Structure et affinité des composés Arbuckle-1 et Arbuckle-2 antagonistes non-peptidiques et sélectifs du récepteur de la vasopressine V_{1a}

b. Agonistes non-peptidiques

Aucun agoniste non-peptidique du récepteur de la vasopressine V_{1a} n'a été décrit jusque-là. Cela reste un challenge d'aboutir à une telle molécule qui pourrait permettre d'étudier l'importance du récepteur V_{1a} dans les comportements d'attachement entre individus et avec le groupe social.

Objectifs

Les travaux effectués au cours de cette thèse s'inscrivent dans le cadre de la thématique du laboratoire. Le projet de recherche porte sur les récepteurs couplés aux protéines G et plus particulièrement les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine.

Le projet s'articule autour de deux objectifs majeurs :

- 1) Concevoir des sondes moléculaires fluorescentes spécifiques afin de mieux comprendre l'architecture fonctionnelle des récepteurs étudiés et d'accélérer la découverte de nouveaux ligands.
- 2) Concevoir des agonistes non-peptidiques des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine pour entreprendre des études fonctionnelles *in vitro* puis *in vivo* afin de mieux comprendre l'action de ces hormones et d'ouvrir des perspectives thérapeutiques dans le domaine de l'autisme et des troubles des interactions sociales.

Pour mener à bien ces deux axes du projet, nous nous basons sur deux approches complémentaires : l'approche rationnelle et l'approche accélérée.

L'approche rationnelle repose sur l'analyse des modèles de la vasopressine et de l'ocytocine dans leurs récepteurs (modèles validés par des expériences de mutagenèse dirigée, de marquage covalent et de marquage par photoaffinité) pour nous guider dans notre choix des modifications structurales à apporter autour d'un châssis afin d'optimiser la pharmacocinétique et la pharmacodynamique d'un ligand donné. L'analyse du site de liaison permet de déduire le pharmacophore et les parties à moduler.

L'approche accélérée repose sur un criblage à haut débit de petites chimiothèques de molécules afin d'identifier des touches originales qui pourront par la suite être optimisées rationnellement par étude de relations structure-activité.

Ces deux approches sont utilisées dans un but d'étude mécanistique de ces récepteurs mais également dans un but thérapeutique. Cette thèse s'articule autour de deux grandes parties :

Partie 1 : Conception de ligands fluorescents des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine qui vont servir dans :

- 1) La mise au point de nouveaux tests de liaison par la technologie TR-FRET (*Chapitre 1*).
- 2) L'étude de l'hétérodimérisation des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V_2 sur cellules (*Chapitre 2*).

Partie 2 : La conception et la synthèse d'agonistes non-peptidiques des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine selon trois approches :

- 1) Criblage à haut débit sur le récepteur de la vasopressine V_{1a} de la chimiothèque du laboratoire et de la chimiothèque Prestwick (*Chapitre 1*).
- 2) Conception et synthèse d'agonistes non-peptidiques du récepteur de l'ocytocine dérivés de benzodiazépine (*Chapitre 2*).
- 3) Utilisation de nouvelles plates-formes chimiques pour concevoir des agonistes du récepteur de l'ocytocine (*Chapitre 3*).

Ce projet fait intervenir plusieurs équipes de recherche :

- Pour la conception et la synthèse, l'équipe de Chimie et Biologie Intégrative du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR 7200) dirigée par Marcel Hibert et Dominique Bonnet
- Pour la mise au point des tests de liaison et pour l'étude d'hétérodimérisation, l'équipe du département de Pharmacologie Moléculaire de l'Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF) (Thierry Durroux, Thiéric Rodrigues)
- Pour le criblage et les mesure d'affinité et de fonctions, la plate-forme PCBIS (UMS3286, ESBS) dirigée par Pascal Villa (Sophie Gioria et Christel Valencia) ;
- Pour la modélisation moléculaire, l'équipe de bioinformatique de l'UMR7200 dirigée par Didier Rognan
- Pour les mesures d'activation de sous-unités $G\alpha$, l'équipe de Bice Chini de l'Institut de neuroscience à Milan (Italie).

Partie 1 : Développement des tests de liaisons par TR-FRET des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine et étude de l'hétérodimérisation des récepteurs V_{1a} et V_2 .

Partie 1 Chapitre 1 : Développement de tests de liaison par TR-FRET pour les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine

Les tests de liaison sont nécessaires pour accélérer la découverte de nouveaux candidats-médicaments. Les premiers tests de liaison développés utilisent les ligands radioactifs (tritié ou iodé). Cette technique permet d'étudier les récepteurs sur tissus natifs ou cellules transfectées. Les tests de liaison par radioligand ne peuvent pas être effectués de manière homogène. Il est nécessaire de passer par des étapes de rinçage et filtration avant de lire la radioactivité. Il est donc difficile de miniaturiser et d'automatiser ces essais pour les utiliser dans des criblages à haut débit. Les ligands radioactifs posent également la question de traitement des déchets radioactifs et d'aménagement des zones de travail.

Les tests de liaison basés sur la fluorescence sont une alternative aux tests de liaison par radioactivité. Cette technique permet de contourner l'emploi de ligands radioactifs. Pour concevoir des tests de liaison basés sur la fluorescence, il est nécessaire de concevoir des ligands fluorescents affins et spécifiques pour leur récepteur.

Dans ce premier chapitre, nous présentons les premiers ligands non-peptidiques fluorescents des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine. Une stratégie de synthèse originale a permis de développer deux ligands non-peptidiques fluorescents qui gardent une affinité de l'ordre du nanomolaire pour les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine. Ces ligands ont été utilisés pour développer un test de liaison basé sur la fluorescence, plus précisément sur la technologie TR-FRET.

I. Introduction

1. Fluorescence

La **luminescence** est l'émission de lumière (photons) par une molécule luminescente ; elle est divisée en deux catégories : la photoluminescence (phénomène non radiatif consécutif à une excitation lumineuse comme les photons ou les UV) et la chimioluminescence (phénomène radiatif consécutif à une réaction chimique ou enzymatique). Les phénomènes de photoluminescence sont classés en fonction du mode d'excitation. On distingue la fluorescence et la phosphorescence.

Le diagramme de Jablonski (Figure 38) est utilisé pour visualiser les divers processus mis en jeu : absorption d'un photon, rotation vibrationnelle, conversion interne, fluorescence, phosphorescence, passage intersystème, transition triplet-triplet. Les états électroniques singulets sont notés S_0 (état fondamental), S_1 , S_2 , etc. Les états triplets sont notés T_1 , T_2 , etc. Des niveaux vibrationnels sont associés à chaque état électronique.

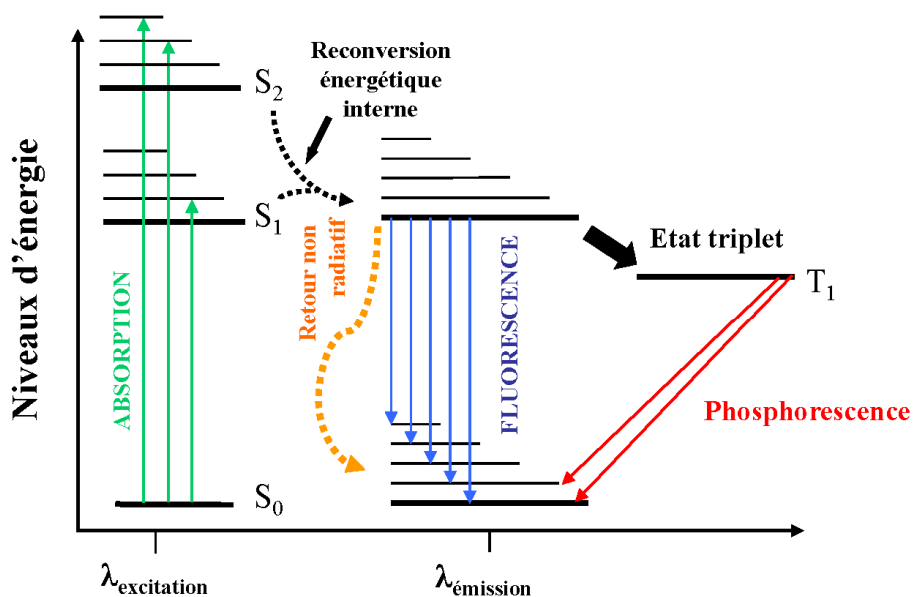


Figure 38 : Diagramme de Jablonski représentant la fluorescence

La **phosphorescence** est une émission de lumière produite entre deux états de multiplicité différents (triplet T_1 -singulet fondamental S_0). Le retour à l'état fondamental S_0 s'effectue lentement (10^{-6} à 1 seconde).

La **fluorescence** est un processus luminescent qui résulte de l'absorption de photons par une molécule. La fluorescence est due à la transition (relaxation) entre un état singulet S_1 à un état fondamental S_0 , entraînant l'émission de photons (lumière). A température ambiante, les molécules sont présentes au plus bas état vibrationnel de l'état fondamental électronique S_0 . En absorbant de la lumière à une certaine longueur d'onde, une molécule peut être excitée à un état vibrationnel du 1^{er} état excité électronique S_1 . L'absorption de ce photon est réalisée dans un délai de 10^{-15} s, ce processus est très rapide. Le fluorophore excité va perdre de l'énergie, se relaxer en 10^{-12} s au plus bas niveau vibrationnel de l'état excité S_1 et retourner à n'importe quel niveau vibrationnel de l'état fondamental S_0 avec l'émission d'un photon. Due à la dissipation d'énergie d'excitation par des processus non radiatifs, la fluorescence émise sera de plus basse énergie¹¹⁴. Le spectre d'émission sera donc décalé vers des longueurs d'ondes plus grandes par rapport au spectre d'absorption. Ce décalage est mesuré par le **déplacement de Stokes**. Le déplacement de Stokes est la distance entre les maxima du spectre d'absorption et d'émission. La détection de fluorescence est d'autant plus facile que le déplacement de Stokes est grand¹¹⁴. **La loi de Stokes** est définie par l'équation suivante :

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

avec h , la constante de Planck ; c la vitesse de la lumière et λ la longueur d'onde. L'énergie emmagasinée par un photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde.

L'efficacité de fluorescence pour une molécule donnée est déterminée par le **rendement quantique**. Le rendement quantique est déterminé par le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés par la molécule. Ce rendement peut également être exprimé avec l'équation suivante :

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

avec I_f , intensité de fluorescence ; I_a , intensité d'absorbance ; k_r , le taux de désexcitation radiative ; k_{nr} , le taux de désexcitation non radiative et τ le temps de vie de fluorescence.

Le temps de vie de fluorescence τ est la durée pendant laquelle un fluorophore demeure à l'état excité. Pour la plupart des fluorophores cette durée est de l'ordre de la nanoseconde. Plus le temps de vie de fluorescence est court, meilleure sera la sensibilité du fluorochrome. Le temps de vie varie également en fonction de l'environnement : milieu, pH.

Plus le rendement quantique est élevé, plus le fluorophore est capable de réémettre sous forme de lumière l'énergie absorbée. Le rendement quantique peut varier en fonction de l'environnement des fluorochromes : de la concentration, de la polarité, du pH. La température va également diminuer le rendement quantique de fluorescence et la durée de vie. En effet, les processus non radiatifs liés à l'agitation thermique sont d'autant plus grands que la température est élevée (collision des molécules du solvant, vibration rotationnelle intermoléculaire).

Le **coefficient d'extinction** ϵ ou absorbance spécifique reflète la probabilité d'absorption d'une molécule. Plus le ϵ est grand, plus intense sera la fluorescence à intensité lumineuse incidente égale. Généralement, les valeurs des coefficients d'extinction sont comprises entre 5000 et 250000 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

L'**absorbance** est calculée à partir de la loi de Beer-Lambert :

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

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

2. FRET

Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) est un transfert de fluorescence entre un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur (Figure 39).

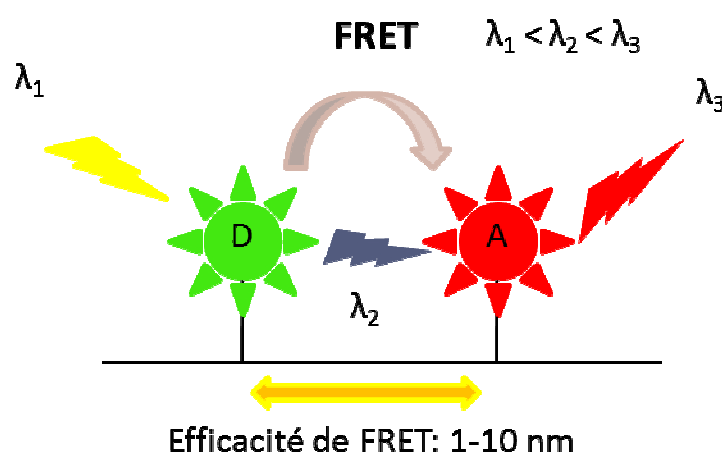


Figure 39 : Transfert de fluorescence entre un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur

Le FRET résulte d'une interaction dipôle-dipôle où le chromophore donneur transfère son énergie d'excitation non radiative à un chromophore accepteur. Pour que le transfert d'énergie puisse avoir lieu, il faut que le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'excitation de l'accepteur (Figure 40), que les deux chromophores soient à une distance comprise entre 1 et 10 nm et que le moment dipolaire d'émission du donneur ne soit pas perpendiculaire au moment dipolaire d'absorption de l'accepteur.

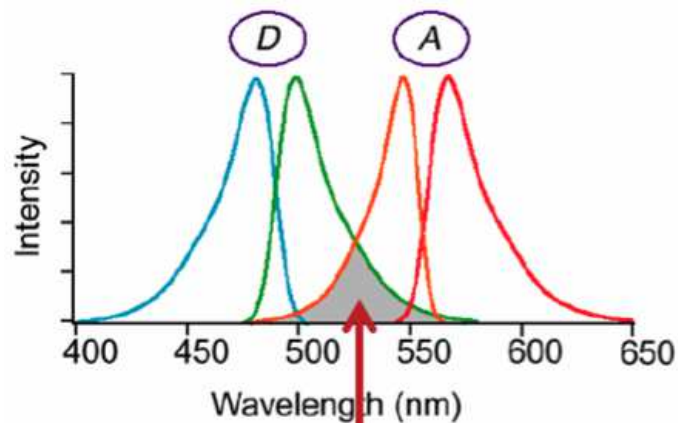


Figure 40 : Compatibilité énergétique entre le fluorophore donneur et le fluorophore accepteur

Les techniques de FRET sont généralement utilisées pour étudier les interactions protéine-protéine (dimérisation de récepteurs par exemple) ou pour étudier les interactions ligand-protéine (détermination de l'affinité d'une molécule). A partir de FRET, on peut quantifier des interactions moléculaires, notamment déterminer une efficacité d'interaction et calculer la distance entre les deux fluorophores.

L'**efficacité de FRET** peut être calculée à partir de l'équation suivante. L'efficacité de FRET E dépend de la distance entre le fluorophore donneur et le fluorophore accepteur.

$$E = \frac{1}{\left(1 + \frac{R}{R_0}\right)^6} = \frac{1}{k_T + k_r + k_{nr}}$$

avec R , la distance donneur accepteur ; R_0 , la distance de Förster ; k_T , la constante de vitesse de transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur; k_r , le taux de désexcitation radiative ; k_{nr} , le taux de désexcitation non radiative.

La sensibilité de FRET est la meilleure pour $R = R_0$, **distance de Förster** pour laquelle $E = 0.5$. Pour la plupart des couples de fluorophore, la distance de Förster est comprise entre 1.0 et 6.5 nm. La **distance de Förster** est exprimée selon l'équation suivante :

$$Ro = (10^{-3}\kappa^2n^{-4}Q_DJ)^{\frac{1}{6}} \times 9736$$

avec κ^2 , le facteur d'orientation fonction de l'orientation relative des dipôles du donneur et de l'accepteur ; n , l'indice de réfraction du milieu ; Q_D , le rendement quantique du donneur en absence de l'accepteur et J , l'intégrale de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur.

La valeur pour le facteur d'orientation est souvent prise par défaut à $2/3$ pour les chromophores pleinement exposés au solvant. Elle correspond à des fluorophore donneurs et accepteurs avec un degré de rotation suffisant pour être aléatoirement orientés dans l'espace. Il est supposé que les sondes sont très mobiles durant la durée de vie à l'état excité. Les moments de transition d'absorption et d'émission vont alors échantillonner toutes les orientations possibles.

Il y a trois manières de mesurer le signal de FRET :

- Mesure de la diminution de l'intensité de fluorescence du donneur
- Mesure de l'exaltation de fluorescence de l'accepteur
- Mesure du temps de vie de fluorescence de l'accepteur (temps passé par l'électron dans l'état excité S_1).

3. TR-FRET

Le TR-FRET (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) combine un transfert d'énergie de type FRET avec une détection de fluorescence en temps résolu. Cette détection permet de discriminer la mesure de fluorescence non seulement avec la longueur d'onde mais également en fonction de la durée d'excitation des fluorophores. En introduisant un délai entre 50 et 150 μ s entre la lumière d'excitation initiale et la mesure de fluorescence, les émissions de fluorescence du bruit de fond sont éliminées¹¹⁵¹¹⁶. La sensibilité du signal est augmentée en diminuant le rapport signal sur bruit. Une discrimination du signal de fluorescence émis est réalisée, non seulement par la longueur d'onde de détection mais également selon la durée de vie des états excités des fluorophores (Figure 41).

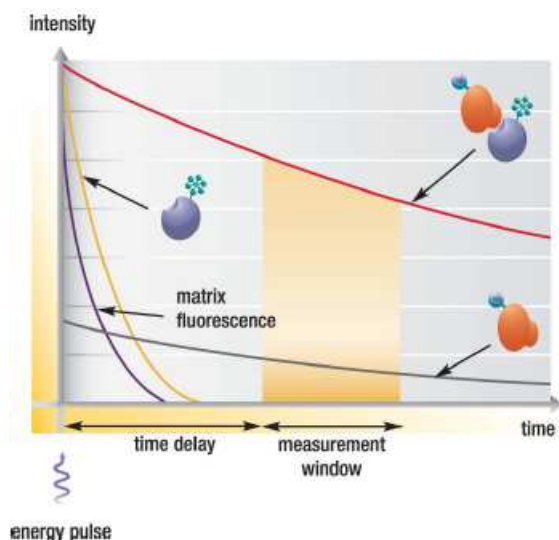


Figure 41 : Signal de fluorescence en temps résolu¹¹⁶

Le TR-FRET utilise généralement des lanthanides de terres rares comme fluorophore donneur avec des longues demi-vies d'émission de fluorescence. Les cryptates de terres rares sont constitués d'un lanthanide inséré dans la cavité d'un ligand macrocyclique. L'élément central du fluorophore est soit un élément d'euporium (cryptate Eur^{3+}), soit un élément de terbium (cryptate Tb^{2+}). L'entité cationique est insérée dans un macrocycle appelé cryptand. Les ions ne sont pas fluorescents, ils nécessitent une cage pour être excités. La cage autour de l'ion permet la collecte et le transfert d'énergie vers les ions terbium ou euporium qui émettent un signal de fluorescence. En comparaison au chélatant de terre rare qui se dissocie en présence d'ions Mn^{2+} , les cryptates de terre rare sont très stable sous divers environnements chimiques. Le terbium est 10 à 20 fois plus lumineux que l'euporium. Le cryptate de terre rare utilisé comme fluorophore donneur dans notre cas est le Lumi4-Tb¹¹⁷ (Figure 42). Le Lumi4-Tb est constitué de quatre unités chélatantes 2-hydroxyisophthalamide (IAM) avec un ion terbium encapsidé. Ce complexe de terre rare montre un très bon rendement quantique ($\phi \geq 50\%$ dans l'eau), un haut coefficient d'extinction molaire ($\geq 20000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et un long taux de vie de fluorescence ($\geq 2.45 \text{ ms}$) comparé aux autres complexes de terre rare décrits dans la littérature. Le Lumi4-Tb montre une stabilité nettement supérieure aux autres complexes de terbium en présence de tampon phosphate ou d'EDTA.

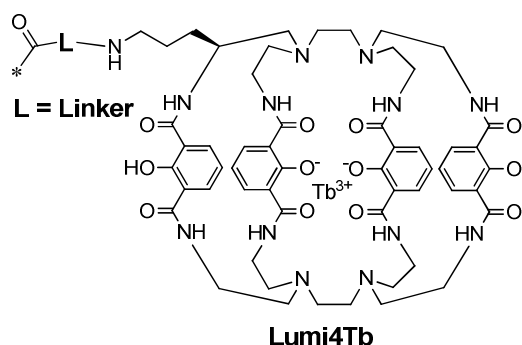


Figure 42 : Structure du cryptate de terre rare Lumi4-Tb avec un bras espaceur fonctionnalisé (L= Linker)¹¹⁷

II. Conception des premiers ligands fluorescents non-peptidiques des récepteurs V_{1a} de la vasopressine et de l'ocytocine

1. Introduction

La technique de TR-FRET est une méthode efficace pour développer des tests de liaisons. Le prérequis pour développer un test de liaison par fluorescence est de concevoir et de synthétiser des ligands fluorescents qui gardent le même profil pharmacologique que les ligands non marqués. A ce jour, il existe seulement des ligands fluorescents peptidiques pour les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine¹¹⁸¹¹⁹. Or les ligands peptidiques sont peu stables, facilement sujets au clivage par des enzymes, ce qui limite leur utilisation dans des systèmes physiologiques. Le but de ce projet de recherche est de synthétiser des ligands fluorescents non-peptidiques du récepteur V_{1a} de la vasopressine pour augmenter la stabilité métabolique *in vivo* et utiliser ces ligands pour développer des tests de liaison robustes et fiables. Ces ligands sont destinés à être utilisés en technique de FRET et/ou de TR-FRET sur cellules puis sur tissus. Nous avons décidé de dériver un antagoniste du récepteur V_{1a} de la vasopressine qui a été décrit dans la littérature par Kakefuda *et al.* en 2002¹²⁰ (Figure 43). Le châssis de base est un dérivé 5-(4-biphényl)-3-méthyl-4-phényl-1,2,4-triazole. Ce dérivé montre une forte affinité pour le récepteur V_{1a} ($V_{1a}R$) avec un K_i de 1.04 nM et une forte sélectivité pour le $V_{1a}R$ par rapport au V_2R (K_i ratio V_2/V_{1A} = 1700).

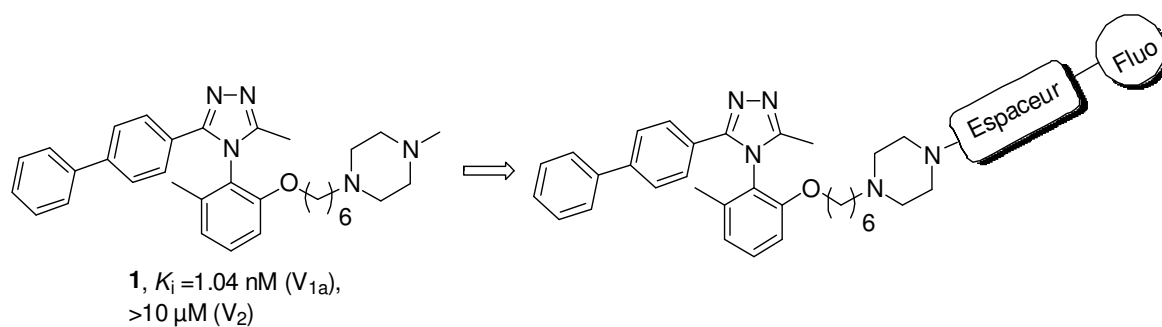


Figure 43 : Stratégie pour marquer le 1-(6-(2-(3-([1,1'-biphényl]-4-yl)-5-méthyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-3-méthylphénoxy)héxyl)-4-méthylpipérazine 1

Les études de relations structure-activité publiées dans la littérature nous ont incités à fixer les espaceurs sur la partie pipérazine de la molécule (Figure 44). Plusieurs espaceurs sont sélectionnés afin d'étudier l'influence de la nature et de la longueur de l'espaceur sur la solubilité ainsi que sur l'affinité et la sélectivité des ligands vis-à-vis des sous-types V_2R et OXTR. Un fluorophore est inséré sur l'azote de la pipérazine du châssis en utilisant des espaceurs de même nature, oxyde d'éthylène et de deux longueurs différentes. Deux espaceurs sont utilisés : une chaîne diéthylène glycol et une chaîne tétraéthylène glycol. Le schéma initial de synthèse du châssis 5-(4-biphényl)-3-méthyl-4-phényl-1,2,4-triazole a été modifié afin d'optimiser la synthèse. Le fluorophore choisi pour être incorporé est le DY647. Le DY647 est un dérivé cyanine avec une absorption à 653 nm et une émission à 672 nm (dans l'éthanol) et un rendement quantique de 12% dans l'eau. Son coefficient d'absorption molaire est de $250\ 000\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$. Ce fluorophore est un fluorophore accepteur compatible avec le fluorophore donneur (Lumi4-Tb) qui est fixé sur le récepteur de la vasopressine V_{1a} par la technique SnapTag.

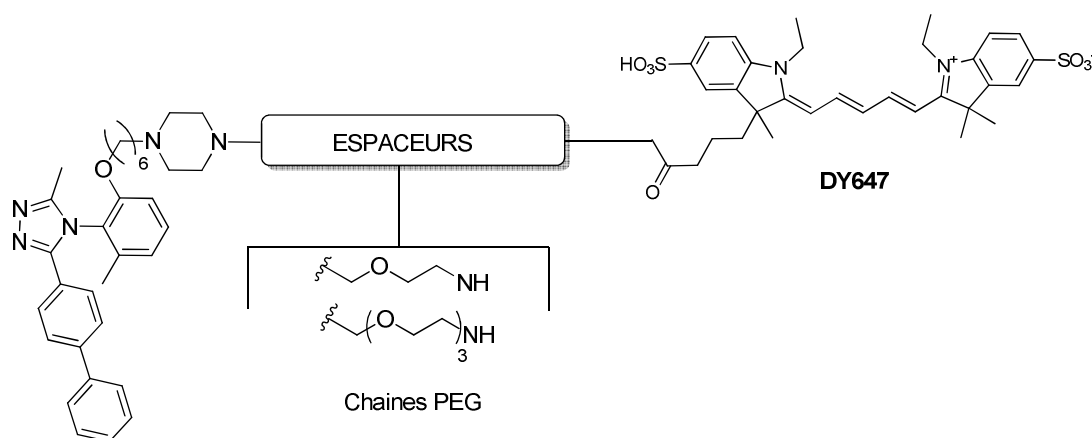
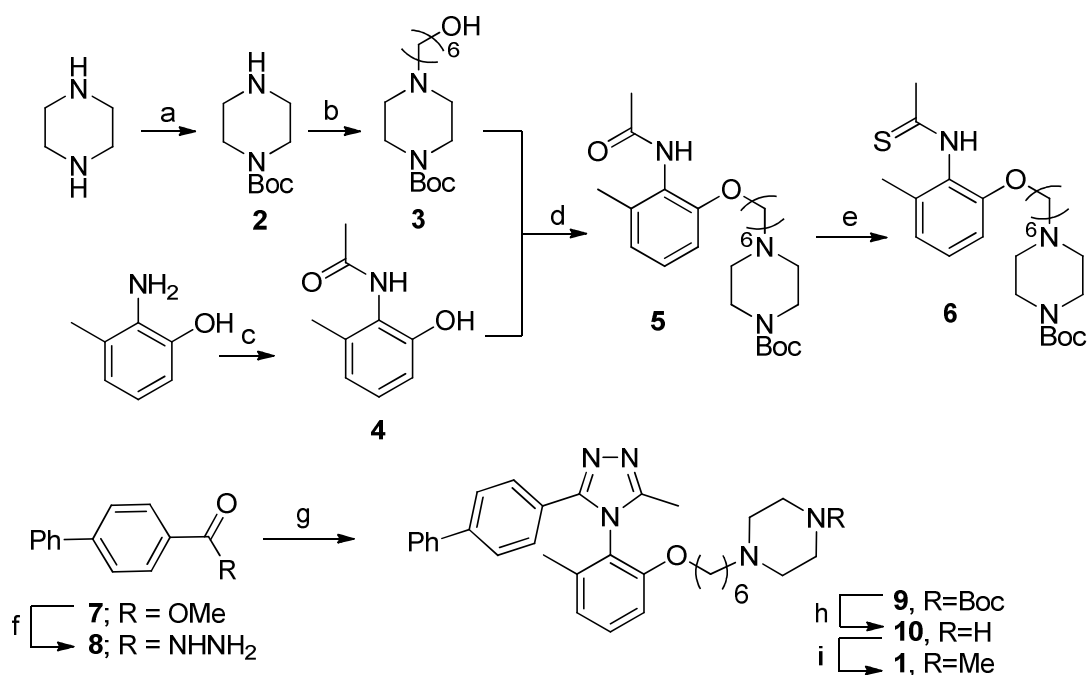


Figure 44 : Schéma général de conception des ligands fluorescents pour le récepteur de la vasopressine V_{1a}

2. Synthèse et évaluation de ligands fluorescents non-peptidiques

La synthèse du châssis triazole **10** s'effectue de manière convergente (Figure 45). Les différentes parties du ligand sont synthétisées séparément puis sont assemblées.



(a) Boc₂O, K₂CO₃, CH₂Cl₂, 12 h, 73% ; (b) K₂CO₃, ACN, reflux, 2 h, 66% ; (c) Ac₂O, AcOEt, 3 h, 65% ; (d) ADPP, PBU₃, THF, 1 nuit, 79% ; (e) Réactif de Lawesson, toluène, reflux, 1h15, 83% ; (f) hydrazine, EtOH, reflux, 2 jours, 72% ; (g) Composé **6**, Hg(OAc)₂, DMF, 2 jours, 37% ; (h) TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v), 2h30, 95% ; (i) HCOH, NaBH₃CN, MeOH, 2 h, 35%.

Figure 45 : Préparation du triazole **10**

La piperazine monoprotégée par un groupement Boc est préparée à l'aide d'un excès de piperazine dans du dichlorométhane en additionnant à froid le dicarbonate de di-*tert*-butyle au goutte à goutte afin de limiter la formation du dérivé diprotégé. Dans ces conditions, la formation de l'espèce diprotégée est limitée à 10% comme indiqué en RMN ¹H. Le composé **2** ainsi obtenu est utilisé sans purification pour la suite des réactions. La substitution nucléophile du 6-bromohexan-1-ol par la piperazine **2** dans l'acétonitrile en présence de carbonate de potassium permet d'accéder au composé **3** avec un rendement isolé pour les deux étapes de 48%. En parallèle, le composé **4** est préparé à partir de 2-amino-3-méthylphénol par réaction d'acylation avec l'anhydride acétique dans l'acétate d'éthyle avec un rendement isolé de 65%.

Une étape clé dans cette synthèse est l'assemblage des composés **3** et **4** par une réaction de Mitsunobu. Différentes conditions réactionnelles ont été évaluées avant d'obtenir le composé **18** avec un bon rendement. Nous avons évalué l'influence de différents paramètres

sur le rendement de la réaction à savoir la nature de la phosphine (PPh_3 , PBU_3) et des dérivés azodicarboxylates (ADDP, DEAD) ainsi que les conditions de température (Tableau 4). Finalement, les meilleures conditions ont été obtenues en utilisant l'ADDP dissoute dans le THF dans lequel est ajoutée la phosphine PBU_3 . L'alcool **3** est ajouté 20 min plus tard dans le milieu réactionnel puis 10 min plus tard l'alcool **4**¹²¹¹²². Dans ces conditions, un rendement isolé de 79% est obtenu pour la réaction de Mitsunobu.

| Entrée | Réactifs | Conditions | Rendement (%) |
|--------|----------------------------|----------------|---------------|
| 1 | PPh_3 , DEAD, THF | TA, 1 nuit | 0 |
| 2 | PPh_3 , DEAD, THF | Reflux, 1 nuit | 0 |
| 3 | PBU_3 , DEAD, THF | TA, 1 nuit | 79 |

Tableau 4 : Optimisation de la réaction de Mitsunobu pour obtenir le composé 5

L'amide du composé **5** est ensuite converti en thioamide en utilisant le réactif de Lawesson¹²³. Le mécanisme de la réaction de Lawesson implique une dissociation du réactif donnant l'espèce réactive (Figure 46) qui en présence du carbonyle conduit à la formation d'un cycle à 4, l'oxathiophosphétane.

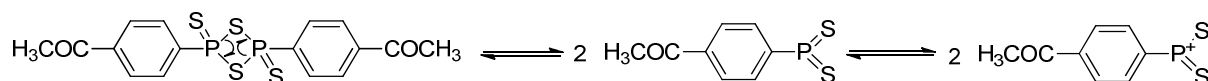


Figure 46 : Mécanisme de dissociation du réactif de Lawesson

Ce dernier se réarrange pour permettre la formation du thioamide (Figure 47).

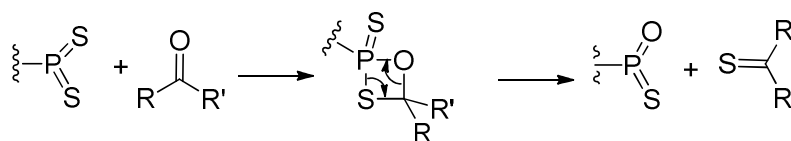
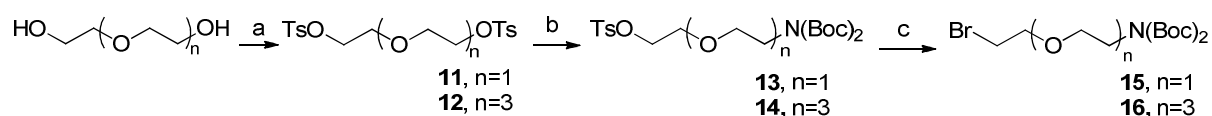


Figure 47 : Mécanisme de formation du thioamide avec le réactif de Lawesson

Le composé **6** est obtenu avec un rendement de 83%. Le composé **8** est préparé par addition nucléophile de l'hydrazine sur le chlorure d'acide du méthylbiphényl-4-carboxylate **7** dans l'éthanol à reflux pendant une nuit avec un rendement isolé de 72%. Le thioamide **6** réagit ensuite avec l'hydrazide **8** en présence d'acétate de mercure dans le DMF pour former le triazole 3,4,5-trisubstitué **9**. Le mercure de degré d'oxydation +II a une grande affinité pour

les atomes de soufre ce qui permet d'activer le thioamide. Le composé **9** est obtenu avec un rendement isolé de 37%.

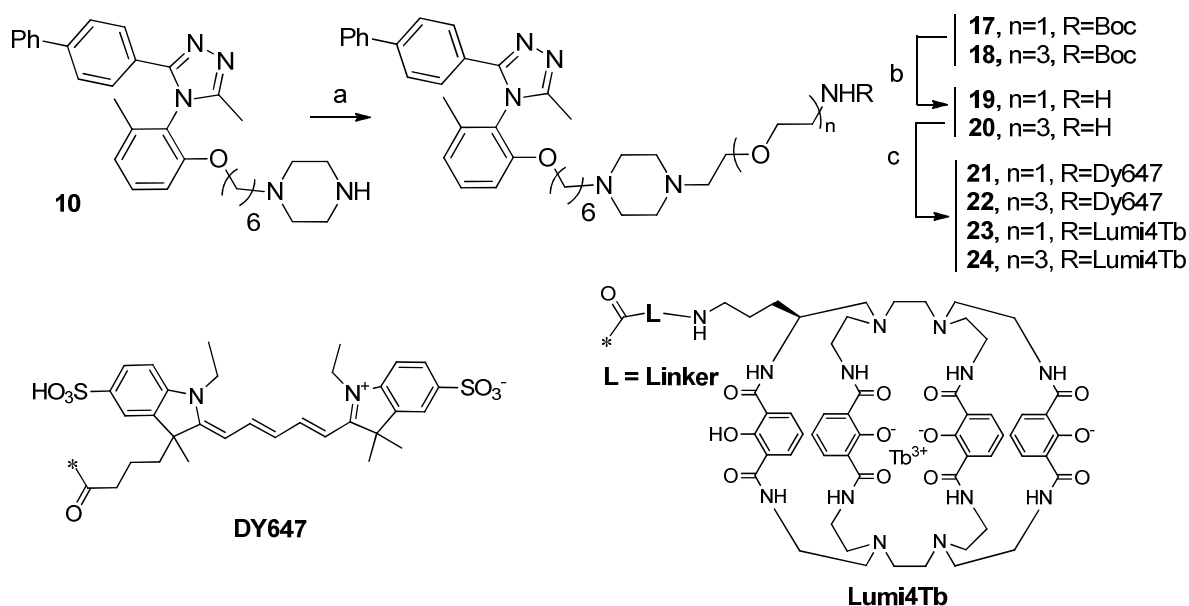
L'amine secondaire du composé **9** est déprotégée dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (1/1 v/v) pour obtenir le composé **10**. Le châssis 5-(4-biphényl)-3-méthyl-4-phényl-1,2,4-triazole est ainsi prêt à être couplé avec les espaceurs. Le ligand de référence **1** décrit dans la publication de Kakefuda est synthétisé à partir du composé **10** par méthylation de l'azote de la pipéridine.



(a) TsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 2 h, 62-67% ; (b) NH(Boc)₂, Cs₂CO₃, DMF, 2 h, 53-67% ; (c) LiBr, DMF, 60 °C, 2h30, 71-83%.

Figure 48 : Préparation des espaceurs 15-16

La préparation des espaceurs **15** et **16** se fait en trois étapes (Figure 48) à partir des produits commerciaux, le diéthylèneglycol et le tétraéthylène glycol ($n=1$ et $n=3$ respectivement). Les alcools sont activés par la formation de dérivés ditosylate **11** et **13** par réaction avec le chlorure de tosyloxy avec des rendements de 62% et 67% respectivement. La monosubstitution des groupements tosyloxy symétriques par l'addition lente d'imino-dicarboxylate de di-*tert*-butyle dans un excès d'espaceurs PEG activés à 0° C permet d'obtenir les chaînes **13** et **14** avec des rendements de 53% et 67%. Un traitement avec LiBr dans le DMF permet la conversion des chaînes tosylées en chaînes bromées **15** et **16** avec des rendements de 83% et 71% respectivement.



(a) **15** or **16**, Et_3N , CH_3CN , 48 h, 31-46% ; (b) $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 1/1, v/v, 3 h, 76-88% ; (c) RCONHS , DIEA , DMSO , 2 h, 21-31%.

Figure 49 : Synthèse des ligands fluorescents 21-24 pour une application en TR-FRET

Au départ, l'incorporation des espaceurs sur le triazole **10** a été effectuée par substitution nucléophile des groupements tosyloxy des espaceurs **13** et **14** avec des rendements de 40% et 17% respectivement. Les rendements ont pu être considérablement améliorés par l'incorporation des espaceurs **15** et **16** bromés sur le triazole **10** pour obtenir les composés **17** et **18** avec des rendements de 61% et 46% respectivement. Les composés **17** et **18** sont mis en présence de TFA pour obtenir les amines libres **19** et **20** avec des rendements quantitatifs, prêts à être acylés avec le dérivé DY647 ester succinimique ou le dérivé Lumi4-Tb ester succinimique pour obtenir les molécules fluorescentes **21-24** (Figure 49).

III. Développement de tests de liaisons par TR-FRET pour les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine

1. Introduction

Le SNAP-tag est un mutant de 20 kDa de la protéine de réparation de l'ADN O_6 -alkylguanine transférase (hAGT) qui se lie de manière covalente avec les dérivés O_6 -benzylguanine marqués (BG). La partie N-terminale du récepteur d'intérêt est fusionnée avec la partie SNAP-tag ; elle est exprimée à la surface des cellules. Durant la réaction avec le substrat, un lien stable thioéther est formé entre la cystéine du tag et le dérivé BG marqué.

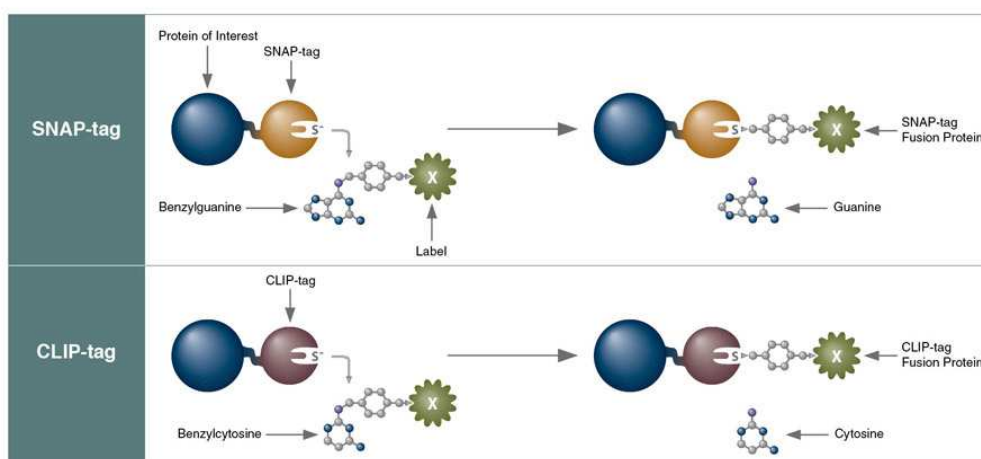


Figure 50 : Mécanisme de marquage du SNAP-tag et du CLIP-tag¹²⁴

Le marquage s'effectue rapidement quel que soit le récepteur fusionné au tag. L'addition de substrat SNAP-tag dérivatisé avec le Lumi4-Tb nous permet d'effectuer un marquage covalent avec un fluorophore donneur. Des études nous montrent que l'entité SNAP-tag n'altère pas l'expression et la fonction des récepteurs¹²⁵.

Le CLIP-tag diffère du SNAP-tag seulement par le substrat avec lequel l'enzyme se lie de manière covalente, les dérivées benzylcytosine (BC). Ces deux tags permettent de marquer sélectivement une population de récepteurs avec un marqueur fluorescent et une autre population de récepteurs avec un autre marqueur fluorescent (Figure 50).

2. Validation des tests de liaison par TR-FRET

Des courbes de saturation basées sur la technologie TR-FRET ont été effectuées sur les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine marqués avec le Lumi4-Tb ou le DY647 en utilisant l'approche SNAP-tag.

Les courbes de saturation pour le récepteur de la vasopressine V_{1a} et pour le récepteur de l'ocytocine ont été obtenues en exprimant le FRET spécifique en fonction de la concentration en ligand fluorescent (courbes pour $V_{1a}R$ représentées dans les Figure 51 A. et B.). Les constantes de dissociation (K_d , nM) déterminées pour les quatre ligands fluorescents sont de l'ordre du nanomolaire à la fois pour le récepteur de la vasopressine V_{1a} (4-10 nM) et pour le récepteur de l'ocytocine (3-11 nM). La sélectivité de ces ligands par rapport au récepteur de la vasopressine V_2 reste conservée ($K_d > 1 \mu M$). L'addition de groupements

fluorescents encombrants n'altère pas l'affinité de ces ligands pour leurs récepteurs quelle que soit la longueur de la chaîne (Tableau 5).

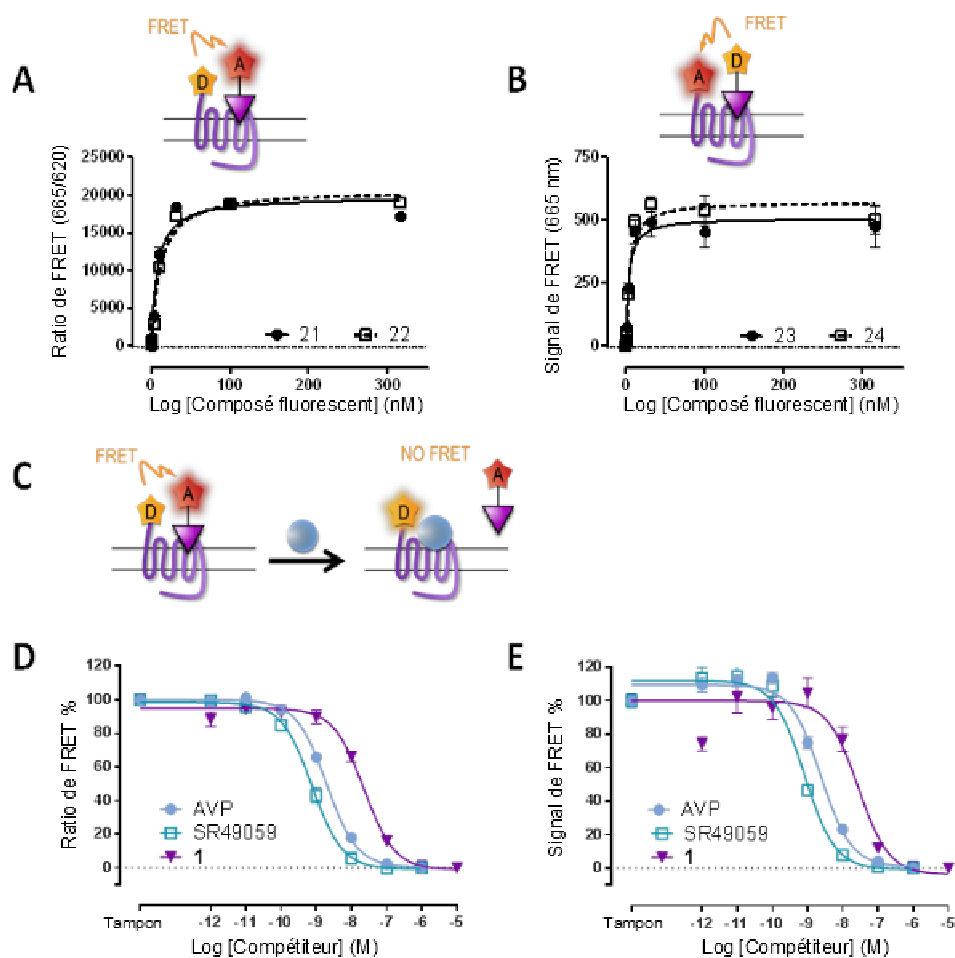
| Composé | n | Liaison TR-FRET (K_d , nM) ^a | | |
|-----------|---|--|------------------|------|
| | | V _{1a} R | V ₂ R | OXTR |
| 21 | 1 | 6±2 | >1000 | 7±2 |
| 22 | 3 | 10±2 | >1000 | 11±2 |
| 23 | 1 | 4±1 | >1000 | 3±1 |
| 24 | 3 | 4±1 | >1000 | 5±4 |

^aLes K_d des ligands fluorescents sont directement déterminés par des expériences de saturation par mesure de TR-FRET en augmentant la concentration de ligands fluorescents sur cellules CHO transitoires exprimant le récepteur V_{1a}/V₂/OT marqué avec la technologie SNAP-tag. Le signal non spécifique est mesuré en présence d'un excès de ligand non marqué (10µM).

Tableau 5 : Détermination des constantes de dissociation des composés 21 et 22 par des expériences de saturation utilisant la technique TR-FRET

La publication de référence ne mentionnait pas l'affinité du ligand endogène (composé **1**) pour le récepteur de l'ocytocine¹²⁰. Étonnamment, ces ligands fluorescents sont également affins pour le récepteur de l'ocytocine. Le ligand initial **1** a été synthétisé pour comparer les affinités données dans la littérature pour les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V₂ et pour connaître son affinité pour le récepteur de l'ocytocine.

Pour valider les deux tests de liaisons par TR-FRET, le ligand fluorescent **21** a été évalué pharmacologiquement sur le récepteur de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine dans des tests de compétition avec des ligands endogènes peptidiques (AVP, OT) et des ligands non-peptidiques (SR49059, composé **1**). Le signal de ratio de FRET ou de signal de FRET est exprimé en fonction de la concentration en compétiteur (le principe et les courbes de compétition pour V_{1a}R sont représentés dans les Figure 51 C., D. et E.).



(A) Expériences de saturation basées sur une mesure de TR-FRET avec les analogues fluorescents **21** et **22** et (B) **23** et **24**. (C,D,E) Expérience de compétition en utilisant le composé **21** comme traceur et l'AVP, le SR49059 et le composé **1** comme compétiteur. Les cellules exprimant $V_{1a}R$ sont marquées en utilisant la technologie SNAP-tag et sont incubées en présence de **21** (20 nM) et d'une concentration croissante de compétiteur. Le ratio d'intensité de FRET (665/620) ou le signal de FRET est exprimé en fonction des concentrations de compétiteur. Les résultats sont exprimés comme la somme de trois expériences indépendantes réalisées trois fois.

Figure 51 : Validation pharmacologique des ligands fluorescents 21-24 sur le récepteur V_{1a}

Les valeurs de constantes d'inhibition (K_i) obtenues pour l'AVP, l'OT et le SR49059 sont dans le même ordre de grandeur que les valeurs obtenues dans la littérature (Tableau 6). Ces résultats valident l'utilisation du composé **21** comme ligand fluorescent dans les tests de liaison par TR-FRET pour les récepteurs V_{1a} de la vasopressine et de l'ocytocine.

| Composés | Liaison (K_i , nM) | | | |
|----------|-----------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|
| | OXTR | | $V_{1a}R$ | |
| | TR-FRET ^a | Radioliation ^b | TR-FRET ^a | Radioliation ^b |
| OT | 3.2 ± 0.3 | 0.79 ²⁸ | nd | nd |
| AVP | 75±12 | 48 ¹²⁶ | 1.08 ± 0.26 | 3.2 ²⁸ |
| SR49059 | nd | 130 ¹⁰⁴ | 0.42 ± 0.11 | 1.08 ¹⁰⁴ |
| 1 | 140 ± 56 | nd | 12 ± 4 | 1.04 ¹²⁰ |

^a Les constantes d'inhibitions sont déterminées par TR-FRET sur cellules exprimant les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine marqué en utilisant la technologie SNAP-tag et incubé en présence du composé **21** (6 nM) et en concentration croissante de compétiteurs (OT, AVP, SR49059, composé **1**) L'intensité de fluorescence mesurée à 665 nm est exprimée en fonction de la concentration en compétiteur. Le K_i est déterminé avec l'équation de Cheng-Prussof. Les résultats sont exprimés comme la somme de trois expériences indépendantes réalisées trois fois.

^b Constantes d'inhibition reportées dans la littérature et déterminées par tests de liaison par radioliation.

Tableau 6 : Détermination des constantes d'inhibition de l'ocytocine, de l'arginine vasopressine, du SR49049 et du composé 1 sur les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine en utilisant le composé 21 comme traceur

Une valeur de K_i de 140 nM pour le récepteur de l'ocytocine a été déterminée pour le composé **1**. Il est intéressant de constater que l'incorporation du DY647 ou du Lumi4Tb sur le composé **1** participe à l'augmentation d'affinité du composé pour le récepteur de l'ocytocine ($3 < K_i < 11$ nM).

IV. Conclusion

Notre objectif était de concevoir de nouveaux tests de liaison utilisant la technologie TR-FRET pour accélérer la découverte de nouveaux ligands pour les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine. Cet objectif a été atteint avec la conception et la synthèse de ligands nanomolaires pour les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine. Ces ligands fluorescents ont permis de développer deux nouveaux tests de liaisons utilisant la technologie TR-FRET. Les tests de liaison ont été validés par des expériences de compétition avec les ligands endogènes OT et AVP pour le récepteur de l'ocytocine et avec le ligand endogène AVP et l'antagoniste non-peptidique SR49059 pour le récepteur V_{1a} de la vasopressine. Le test de liaison développé pour le récepteur de l'ocytocine est le premier test de liaison disponible pour ce récepteur, il n'en existait pas auparavant. Nous disposons donc d'outils fiables et robustes pour cribler des chimiothèques de molécules afin d'accélérer la découverte de nouveaux agonistes et antagonistes pour les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine.

Partie 1 Chapitre 2 : Développement de ligands fluorescents pour étudier l'hétérodimérisation des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V_2 .

Les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V_2 sont retrouvés dans les cellules des tubes collecteurs du rein. Le récepteur de la vasopressine V_2 est impliqué dans la réabsorption d'eau. Le rôle du récepteur V_{1a} dans ces cellules n'est pas établi. L'activation d'un récepteur couplé aux protéines G peut être dépendante de la formation d'homodimère ou d'hétérodimère de récepteurs. Il est donc intéressant de mettre en évidence une possible dimérisation de ces deux récepteurs, particulièrement en milieu physiologique. Il n'existait aucune méthode directe permettant cette caractérisation.

Dans ce deuxième chapitre, nous décrivons la conception et la synthèse de ligands fluorescents non-peptidiques du récepteur de la vasopressine V_{1a} et de ligands non-peptidiques du récepteur de la vasopressine V_2 permettant l'étude de leur hétérodimérisation.

Les ligands fluorescents non-peptidiques du récepteur de la vasopressine V_2 et les ligands fluorescents non-peptidiques de la vasopressine V_{1a} ont été marqués avec un fluorophore donneur (Lumi4Tb) et un fluorophore accepteur (DY647). Les mesures de TR-FRET nous permettent de mettre en évidence leur liaison proximale et donc la formation éventuelle d'homodimère et d'hétérodimère des récepteurs sur cellule.

Nous avons effectivement pu démontrer la formation d'homo- et hétérodimères sur cellules en culture.

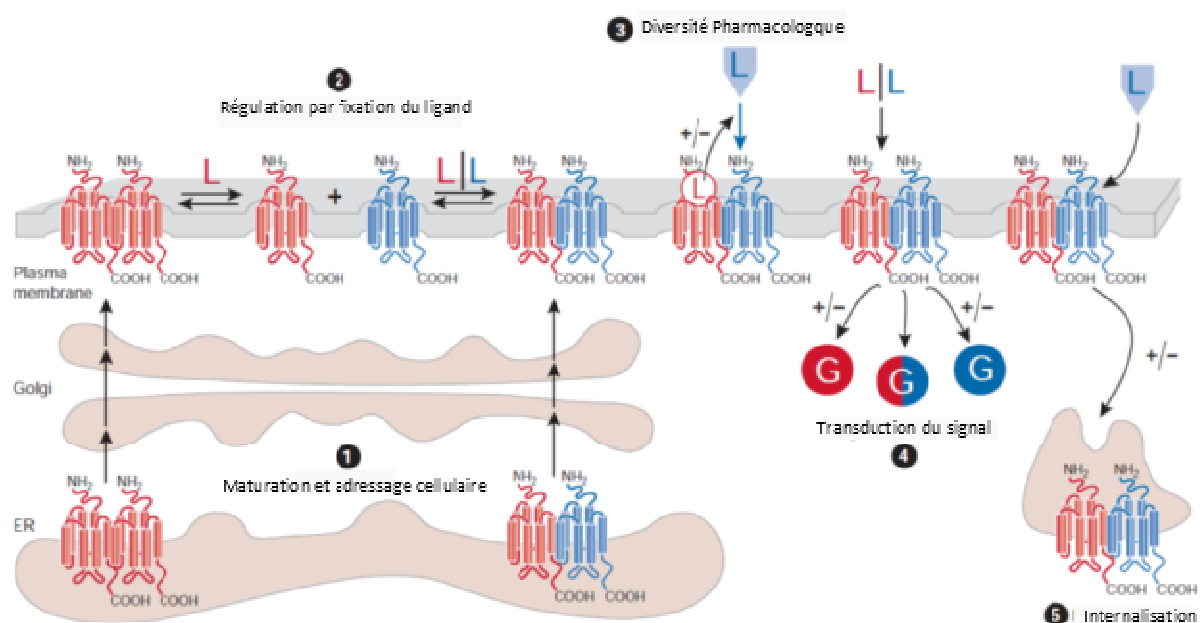
En perspective, ces ligands fluorescents non-peptidiques sont stables à la protéolyse et peuvent être utilisés en milieu physiologique. Il sera intéressant de mettre au point des conditions pour essayer de détecter des hétérodimères des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V_2 sur tissus de rein comme cela a été réalisé pour les récepteurs de l'ocytocine sur tissu vaginal de ratte, et d'y associer une fonction physiologique.

I. Introduction

Depuis les 20 dernières années, le concept d'oligomère a émergé. De nombreuses publications décrivent la formation de dimères ou d'oligomères de RCPG résultant de l'association de récepteurs identiques (homodimères) ou de récepteurs différents (hétérodimères). Il a été établi que le profil pharmacologique d'un récepteur dépend des interactions qu'il a avec d'autres récepteurs¹²⁷. Il est donc important d'identifier sur des tissus natifs la présence de dimères et de leur affecter une réponse physiologique particulière. Ces dimères peuvent ainsi constituer des cibles thérapeutiques spécifiques intéressantes.

1. Rôle de la dimérisation des RCPG

La dimérisation influence potentiellement chaque étape du cycle de vie des RCPG (Figure 52).



(1) Dans certains cas la dimérisation à un rôle primordial dans la maturation et permet le transport des RCPG du réticulum endoplasmique vers la membrane cellulaire. (2) Une fois dans la membrane cellulaire, les dimères peuvent être la cible d'une régulation dynamique par liaison de ligands. (3) L'hétérodimérisation des RCPG entraîne une coopérativité positive ou négative suite à la liaison d'un ligand. (4) De même, l'hétérodimérisation peut conduire à la potentialisation ou l'atténuation du signal ou changer la sélectivité du couplage à la protéine G. (5) L'hétérodimérisation peut promouvoir la co-internalisation des deux récepteurs après la stimulation de seulement un protomère. La présence d'un protomère qui est résistant à l'endocytose induite par la fixation d'un agoniste au sein d'un hétéromère peut inhiber l'internalisation du complexe.

Figure 52 : Rôles potentiels de la dimérisation de RCPG au cours de leur cycle de vie.¹²⁸

Identifier des hétérodimères *in vivo* et comprendre leur implication dans les processus physiopathologiques est essentiel pour découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Les techniques qui sont utilisées pour détecter les hétérodimères sur tissus natifs sont les suivantes :

- Mesure d'un signal de FRET entre deux ligands fluorescents spécifiques de leur récepteur¹²⁹ (Figure 53.a). Des ligands fluorescents qui peuvent être utilisés pour des mesures de FRET sur les ligands endogènes ont été développés.
- Co-immunoprécipitation qui consiste à immunoprécipiter puis à détecter un complexe via l'utilisation d'anticorps qui reconnaissent spécifiquement des épitopes fusionnés aux récepteurs étudiés¹³⁰ (Figure 53.b).

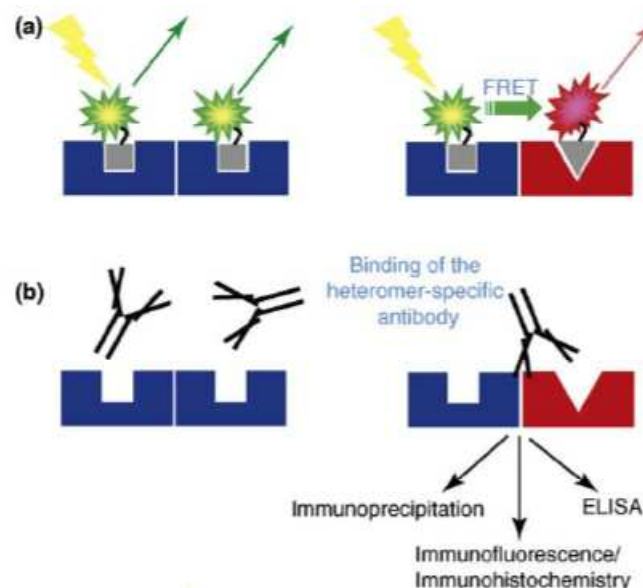


Figure 53 : Techniques pour détecter les hétérodimères¹³¹

i. Maturation et adressage cellulaire

L'adressage cellulaire des RCPG du réticulum endoplasmique (RE) vers la membrane cellulaire est une étape clé qui contrôle l'expression cellulaire en surface des RCPG. Seul les récepteurs correctement repliés passent le système de contrôle qualité du RE alors que les récepteurs partiellement repliés sont retenus et éventuellement dégradés¹³². La nécessité de la dimérisation pour le transport des récepteurs vers la membrane cellulaire a été démontrée avec le récepteur acide γ -aminobutyrique (GABA) qui est composé de deux sous unités : GABA₁ et GABA₂¹³³. Quand GABA₁ est exprimé tout seul, il est piégé dans le RE car il possède sur sa partie C-terminale un motif de rétention. En revanche, GABA₂ est exprimé

normalement à la surface mais n'est pas fonctionnel. Suite à la co-expression de GABA₁ et GABA₂, la dimérisation masque la partie C-terminale de GABA₁ et le dimère peut être adressé à la surface cellulaire.

Plusieurs études par fractionnement cellulaire, FRET ou BRET ont démontré que plusieurs RCPG dimérisent dans le RE. En 2002, des oligomères de récepteurs CCR5 sont détectés par BRET¹³⁴. La technique de FRET a permis de mettre en évidence l'oligomérisation de C5a exprimé dans des bactéries¹³⁵. Des études de BRET et de fractionnement cellulaire ont permis la détection d'hétérodimères et d'oligomères des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V₂ et de l'ocytocine lors de la biosynthèse¹³⁶.

ii. Régulation par le ligand

Est-ce que l'activation d'un ligand inhibe ou active la dimérisation et/ou favorise les échanges entre protomères ? Aucun consensus n'est établi pour le moment. Plusieurs études montrent que la fixation d'un ligand peut réguler le dimère soit en promouvant soit en inhibant sa formation. D'autres études concluent que l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation sont des processus constitutifs qui ne sont pas modulés par la fixation de ligands¹³⁷¹³⁸¹³⁹.

Les données structurales disponibles suggèrent que quelques RCPG peuvent former des dimères en l'absence d'une stimulation par un ligand. La cristallisation du récepteur glutamate métabotropique mGluR1¹⁴⁰ (Figure 54) et du récepteurs frizzled Wnt¹⁴¹ révèle que ces récepteurs existent dans le cristal sous forme de dimère en absence de leur ligand.¹²⁸

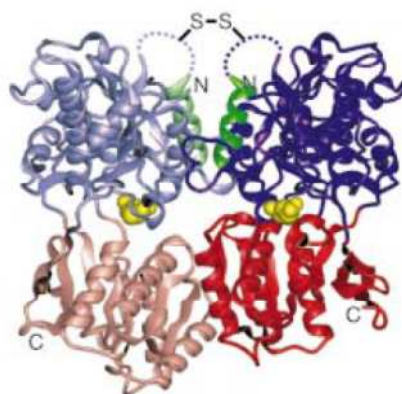


Figure 54 : Structure cristalline du dimère de mGluR1¹⁴⁰

iii. Diversité Pharmacologique

Suivant l'état de dimérisation dans lequel se trouve le récepteur, la réponse pharmacologique ne sera pas la même. En 1999, les études de Jordan et Devis¹²⁷ prouvent le rôle des hétérodimères de RCPG dans la diversité pharmacologique : l'hétérodimère des récepteurs opioïdes δ et κ a une très faible affinité pour les ligands sélectifs pour soit le récepteur opioïde δ ou soit le récepteur opioïde κ . Une forte affinité est restaurée en présence de la combinaison des deux ligands. Un autre exemple est la fixation de l'antagoniste raclopride sur le récepteur de la dopamine D2. Une modulation négative est observée pour la fixation de ce ligand sur le dimère D2¹⁴².

Une coopérativité positive ou négative de la fixation du ligand peut avoir lieu sur les dimères de RCPG. Il est donc intéressant dans un processus de développement de ligands sélectifs pour un RCPG de concevoir des composés qui cibleraient spécifiquement les hétérodimères connus, sans affecter les protomères^{143,144}

iv. Transduction du signal

Le modèle classique de l'activation des protéines G est basé sur l'hypothèse qu'un récepteur interagit avec une protéine G. Des études récentes montrent que les RCPG peuvent exister sous forme de monomères et être entièrement fonctionnels¹⁴⁵. Une stœchiométrie 1:1 est respectée (Figure 55.a). Cependant, ce concept doit être réexaminé en prenant en compte le concept de la dimérisation des RCPG. Un dimère active une ou deux protéines G ?

D'autres études montrent plutôt qu'une stœchiométrie 2:1 est favorisée avec deux récepteurs qui sont couplés avec seulement une protéine G. Des études fonctionnelles sur les récepteurs GABA_B^{146,147}, glutamate métabotrope mGluR₁¹⁴⁸ et dopamine D₂¹⁴⁹ mettent en évidence ce couplage.

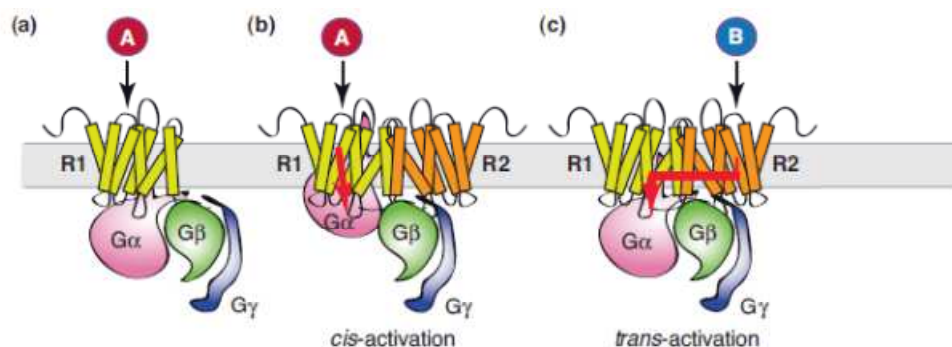


Figure 55 : Asymétrie au niveau des interactions RCPG-protéine G¹⁵⁰

Deux régions distinctes de la protéine G peuvent interagir avec le récepteur. Le premier site d'interaction est l'hélice C-terminale de la sous-unité $G\alpha$ qui pénètre dans la cavité créée par le domaine cytoplasmique du protomère activé. Le deuxième site d'interaction est la région C-terminale de la sous-unité $G\gamma$ qui se fixe sur une partie inconnue du second protomère.

L'activation de la protéine G peut se faire avec l'un ou l'autre protomère. La première possibilité est que le protomère occupé par l'agoniste interagit lui-même par le premier site de fixation de la protéine G et l'hélice C-terminale de la protéine $G\alpha$ (Figure 55.b). Ce type d'activation est retrouvé pour les récepteurs BLT_1 , MT_1 et MT_2 ¹⁵¹¹⁵². La seconde possibilité est que le protomère occupé par l'agoniste trans-active le second protomère qui à son tour interagit avec l'hélice C-terminale de la sous-unité $G\alpha$ (Figure 55.c). Les récepteurs $GABA_B$ ¹⁴⁷ et D_2 ¹⁴⁹ utilisent ce mode d'activation¹⁵⁰.

L'hétérodimérisation peut également changer la sélectivité de certains RCPG pour les sous familles de protéines G (G_s , G_i , G_q , G_{12}). Une perte du couplage avec la protéine G_i a été constatée avec la co-expression des récepteurs μ - et δ - opioïde¹⁴³.

v. Internalisation

Plusieurs études montrent que l'hétérodimérisation peut affecter l'endocytose médiée par la fixation d'un agoniste. La stimulation de seulement un des deux protomères d'un dimère est suffisante pour promouvoir la co-internalisation des deux récepteurs. Par exemple, on retrouve cette constatation pour les couples de récepteurs suivants: δ -opioïde/ β_2 adrenergique¹⁵³, A_{2A} adenosine/ D_2 dopamine¹⁵⁴. Le rôle physiologique de la régulation du cycle de désensibilisation/resensibilisation reste à déterminer.

vi. Nouveaux traitements basés sur l'oligomérisation des RCPG

De nouvelles thérapies sont ciblées sur les dimères de récepteurs couplés aux protéines G. Des ligands bivalents reliés par des espaceurs chimiques de longueurs et de natures différentes permettent d'augmenter l'affinité comparée aux ligands monovalents. Par exemple, le dimère de ligands du récepteur $5-HT_{1B}$ a une affinité 700 fois plus importante pour le récepteur que le ligand monovalent et une meilleure sélectivité pour les sous-types $5-HT_{1B}$ et $5-HT_{1D}$.

Des molécules qui peuvent augmenter ou bloquer l'oligomérisation peuvent réguler les fonctions biologiques qui en découlent. Des molécules qui ciblent sélectivement des homodimères ou des hétérodimères de RCPG auraient un intérêt thérapeutique énorme.

Jusqu'à présent aucun médicament qui exploiterait spécifiquement l'oligomérisation des RCPG n'a été développé. Il va donc être important de prendre en compte le récepteur dans son état physiologique lors de la conception d'un médicament pour considérer les interactions du récepteur donné avec les récepteurs environnants¹⁴³.

2. Dimérisation des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine

En 2004, Zing et Devost mettent en évidence des homodimères du récepteur de l'ocytocine et des hétérodimères OXTR/V_{1a}R et OXTR/V₂R par des expériences de BRET et de coimmunoprécipitation¹⁵⁵. En utilisant un test basé sur le BRET, des oligomères de récepteurs de l'ocytocine sont détectés mais également des oligomères entre le récepteur de l'ocytocine et les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V₂. Des expériences de coimmunoprécipitation par exposition directe d'anticorps sur ces cellules vivantes ont permis de mettre en évidence des oligomères d'OXTR. La formation de dimère de récepteurs d'ocytocine est indépendante de la fixation de ligands. Par contre après addition d'un agoniste, on observe une diminution de l'oligomérisation indiquant que la fixation de l'agoniste module la dimérisation. En 2003, des approches d'immunoprécipitation et de BRET ont permis d'établir que les récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine V_{1a} et V₂ existent comme des homo- et hétérodimères dans les cellules embryonnaires de foie 293T. Les détections de BRET dans le RE suggèrent que le processus d'oligomérisation a lieu durant la biosynthèse des récepteurs. Le traitement avec des agonistes ou des antagonistes ne modifie pas la quantité de dimères de récepteurs à la surface des cellules¹³⁷. Récemment, des homodimères de récepteur de l'ocytocine dans les glandes mammaires de rats ont été mis en évidence par mesure de TR-FRET entre des ligands fluorescents fixés sur le dimère de récepteurs de l'ocytocine¹⁵⁶.

II. Conception des ligands fluorescents des récepteurs de la vasopressine

V_{1a} et V₂.

Pour détecter des hétérodimères sur cellules ou sur tissus natifs en utilisant la technique de TR-FRET, il faut développer des ligands fluorescents affins et sélectifs des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V₂. A ce jour il existe déjà des ligands fluorescents peptidiques et sélectifs du récepteur de la vasopressine V_{1a}. Cependant, les peptides ne sont pas stables à la protéolyse ce qui perturbe l'interprétation de résultats en milieu physiologique. Le

développement de ligands non-peptidiques pourrait permettre d'essayer la détection de dimère sur tissus natifs. Dans cette optique, des ligands fluorescents non-peptidiques du récepteur de la vasopressine V_2 ont été précédemment développés au laboratoire¹⁵⁷ et des ligands fluorescents non-peptidiques du récepteur de la vasopressine V_{1a} ont été développés au cours de ma thèse (cf Partie 1 Chapitre 1).

1. Conception des ligands fluorescents du récepteur de la vasopressine V_{1a}

Les premiers ligands non peptidiques fluorescents du récepteur de la vasopressine V_{1a} ont été conçus et développés au laboratoire. La synthèse de ces ligands fluorescents est décrite dans la *Partie 1 Chapitre 1*. Le ligand fluorescent **21** marqué au DY647 a été utilisé pour développer un nouveau test de liaison par TR-FRET.

Pour la détection d'hétérodimères sur cellules, deux ligands fluorescents marqués au Lumi4Tb ont été développés au laboratoire. La voie de synthèse pour accéder aux composés fluorescents marqués au DY647 et au Lumi4Tb est décrite dans la *Partie 1 Chapitre 1* (Figure 56).

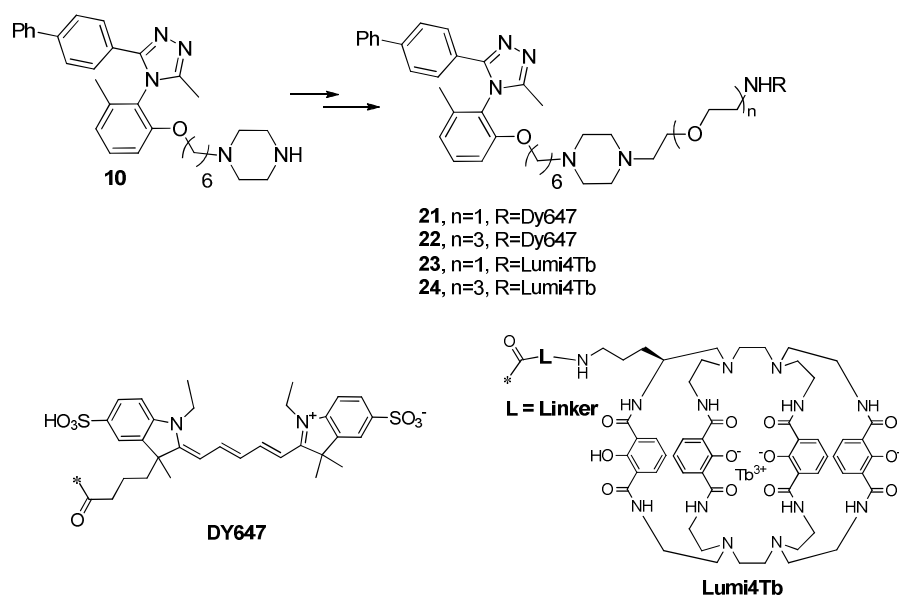


Figure 56 : Synthèse des ligands fluorescents Lumi4Tb et DY647 non-peptidiques du récepteur de la vasopressine V_{1a}

Les constantes de dissociations ont été déterminées pour les dérivés marqués au Lumi4Tb et au DY647 (Tableau 7). Malgré les importantes modifications structurales liées à l'introduction des fluorophores, nous avons observé que les quatre ligands fluorescents ont des affinités excellentes, de l'ordre du nanomolaire, à la fois pour le récepteur de l'ocytocine et de la vasopressine V_{1a} . Ils sont sélectifs par rapport au récepteur de la vasopressine V_2 . Ils

peuvent donc être utilisés pour détecter l'hétérodimérisation V_{1a}/V_2 sur cellules grâce à leur affinité et leur sélectivité.

| Composé | n | Liaison TR-FRET (K_d , nM) ^a | | |
|-----------|---|--|--------|------|
| | | $V_{1a}R$ | V_2R | OXTR |
| 21 | 1 | 6±2 | >1000 | 7±2 |
| 22 | 3 | 10±2 | >1000 | 11±2 |
| 23 | 1 | 4±1 | >1000 | 3±1 |
| 24 | 3 | 4±1 | >1000 | 5±4 |

^a Les K_d des ligands fluorescents sont directement déterminés par des expériences de saturation par mesure de TR-FRET en augmentant la concentration de ligands fluorescents sur cellules CHO transitoires exprimant le récepteur $V_{1a}/V_2/OT$ marqué avec la technologie SNAP-tag. Le signal non spécifique est mesuré en présence d'un excès de ligand non marqué (10 μ M).

Tableau 7 : Détermination des constantes de dissociation des composés 21, 22, 23 et 24 par des expériences de saturation utilisant la technique TR-FRET

Les composés fluorescents **21** et **23** sont sélectionnés pour étudier l'hétérodimérisation des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V_2 sur cellules.

2. Conception des ligands fluorescents du récepteur de la vasopressine V_2

Les premiers ligands non-peptidiques fluorescents et sélectifs des récepteurs de la vasopressine V_2 ont été développés au laboratoire (travaux réalisés par Stéphanie Loison). La synthèse de ces ligands fluorescents a été développée sur support et en solution en utilisant la chimie « Click »¹⁵⁷. Deux composés marqués au DY647 (composé **25**) et au Lumi4Tb (composé **26**) sont utilisés pour détecter des hétérodimères sur cellules (Figure 57).

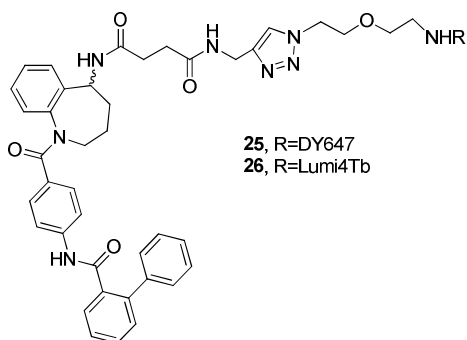


Figure 57 : Ligands fluorescents non-peptidiques 25 et 26 du récepteur de la vasopressine V_2 ¹⁵⁷

Ces deux composés **25** et **26** ont une affinité nanomolaire pour le récepteur de la vasopressine V_2 avec des K_i de 5.69 ± 1.05 nM et 5.86 ± 0.83 nM respectivement. Ces deux ligands sont sélectifs du récepteur de la vasopressine avec des facteurs de sélectivité compris entre 20 et 100 (Tableau 8).

| Composé | Fluorophore | Liaison TR-FRET (K_i , nM) ^a | | Fonction (K_{inact} , nM) ^b | |
|-----------|-------------|--|------------------|---|------------------|
| | | V _{1a} R | V ₂ R | OXTR | V ₂ R |
| 25 | DY647 | 621±65 | 5.69±1.05 | 184±31 | 0.1±0.001 |
| 26 | Lumi4Tb | 180±34 | 5.86±0.83 | 155±8 | 0.42±0.12 |

^a Les constantes d'inhibition des ligands fluorescents pour les récepteurs humains de la vasopressine V_{1a} et V₂ et de l'ocytocine sont déterminés sur des membranes de cellules CHO par des tests d'affinité par compétition (déplacement de [³H]AVP radioactif). Les résultats correspondent à la moyenne +SEM de trois déterminations indépendantes (n=3). Un $K_i > 10000$ indique que le déplacement de [³H]AVP avec chaque ligand fluorescent à 10 μ M conduit à aucune compétition ou moins de 50% d'inhibition.

^b Les K_{inact} des ligands fluorescents sont déterminés utilisant des cellules HEK293 stables exprimant le récepteurs V₂ et en mesurant l'accumulation de AMPc. Les résultats sont exprimés et mesurés en triplicat.

Tableau 8 : Détermination des constantes de dissociation des composés 25 et 26 par des expériences de saturation utilisant la technique TR-FRET

Le ligand fluorescent DY647 **25** a été utilisé pour développer un test de liaison par TR-FRET pour le récepteur de la vasopressine V₂. Les deux ligands fluorescents DY647 **25** et Lumi4Tb **26** sont utilisés pour détecter l'hétérodimérisation entre les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V₂ sur cellules.

III. Etude de l'hétérodimérisation des récepteurs V_{1a} et V₂

1. Introduction

Les récepteurs de la vasopressine V₂ régulent la rétention d'eau du corps humain. La fixation d'un agoniste sur le récepteur de la vasopressine V₂ localisé dans les cellules du tube collecteur du rein entraîne l'activation des protéines G_s et induit une augmentation de la production de AMPc. Le canal de l'aquaporine-2 est transporté alors à la surface de la membrane des cellules du tube transporteur du rein et permet la réabsorption d'eau.

Le récepteur de la vasopressine V_{1a} est également retrouvé au niveau des cellules du tube collecteur. Aucun rôle bien défini n'est attribué au récepteur de la vasopressine V_{1a} dans cette région. Il est donc intéressant d'étudier les interactions des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V₂ sur cellules puis sur tissu de rein pour mieux comprendre la pharmacologie de ces récepteurs et tenter de comprendre le rôle du récepteur V_{1a} dans les tissus du tube collecteur du rein.

2. Etude de l'hétérodimérisation V_{1a}/V₂ avec des ligands fluorescents peptidiques et non-peptidiques

Les ligands fluorescents **25** et **26** du récepteur de la vasopressine V₂ développés au laboratoire par Stéphanie Loison ont été utilisés pour détecter l'hétérodimérisation V_{1a}/V₂

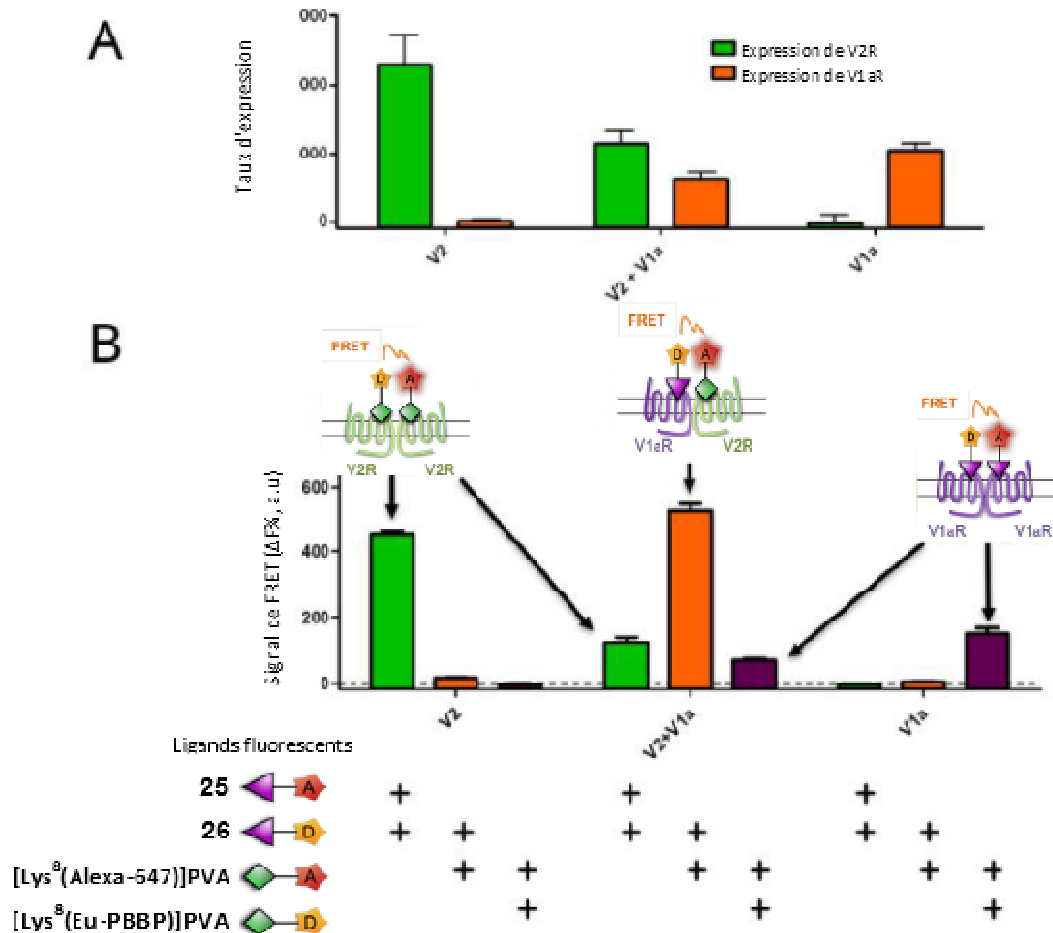
sur cellules. A cette époque-là, il n’existait aucun ligand fluorescent non-peptidique et sélectif du récepteur de la vasopressine V_{1a} . Ce sont des ligands peptidiques fluorescents qui ont été utilisés : $[Lys^8(Eu-PBBP)]PVA$ et $[Lys^8(Alexa-647)]PVA$ ¹¹⁹ (Tableau 9). Ces deux ligands sont décrits pour avoir une affinité de l’ordre du nanomolaire pour les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l’ocytocine et sont très sélectifs par rapport aux récepteurs de la vasopressine V_{1b} et V_2 (ordre du micromolaire). L’incorporation d’un fluorophore en position 8 sur la lysine ne modifie pas la sélectivité et l’affinité du ligand pour les récepteurs de la vasopressine et de l’ocytocine.

| Composé | K_i (nM) ^a | | | |
|-------------------------|-------------------------|-----------|--------|-----------|
| | $V_{1a}R$ | $V_{1b}R$ | V_2R | OXTR |
| $[Lys^8(Eu-PBBP)]PVA$ | 1.54±0.65 | >1000 | >1000 | 0.64±0.1 |
| $[Lys^8(Alexa-647)]PVA$ | 3.6±2 | >1000 | >1000 | 1.91±0.67 |

^a Les constantes d’inhibitions (K_i) des ligands fluorescents ont été déterminées sur les membranes de cellules CHO par expérience de compétition (déplacement avec l’ $[^3H]AVP$). Les résultats correspondent à la moyenne +SEM de trois déterminations indépendantes (n=3).

Tableau 9 : Constante d’inhibition des ligands fluorescents $[Lys^8(Alexa-647)]PVA$ et $[Lys^8(Eu-PBBP)]PVA$ ¹¹⁹.

Les récepteurs V_{1a} et V_2 ont été coexprimés dans des cellules COS-7 utilisant les ligands fluorescents **25** et **26** non-peptidiques et sélectifs du récepteur de la vasopressine V_2 et les ligands $[Lys^8(Eu-PBBP)]PVA$ et $[Lys^8(Alexa-647)]PVA$ peptidiques et sélectifs du récepteur de la vasopressine V_{1a} . Comme attendu, les homodimères du récepteur V_{1a} sont seulement détectés dans les cellules exprimant les récepteurs V_{1a} ou V_{1a} et V_2 avec $[Lys^8(Eu-PBBP)]PVA$ et $[Lys^8(Alexa-647)]PVA$ comme ligand donneur et accepteur. De la même manière, les homodimères du récepteur V_2 sont seulement détectés dans les cellules exprimant les récepteurs V_2 ou V_{1a} et V_2 avec les ligands fluorescents **25** et **26** comme accepteur et donneur. Les hétérodimères V_{1a}/V_2 sont seulement détectés dans les cellules exprimant les deux récepteurs et avec le donneur V_{1a} $[Lys^8(Eu-PBBP)]PVA$ et l’accepteur V_2 **25** d’un côté ou l’accepteur V_{1a} $[Lys^8(Alexa-647)]PVA$ et le donneur V_2 **26** (Figure 58). Ces résultats montrent la nécessité et l’utilité d’avoir des ligands fluorescents sélectifs pour détecter les hétérodimères sur cellules.



(A) Expression de V_2 , V_{1a} ou les deux dans les cellules COS-7. (B) Signal de dimérisation pour les récepteurs V_2 , V_{1a} ou les deux exprimés dans les cellules COS-7. Les cellules COS-7 qui exprime soit V_2 , soit V_{1a} soit les deux récepteurs sont incubées en présence d'une combinaison de ligands fluorescents comme indiqué sous la figure. Les homodimères V_{1a} et V_2 sont seulement détectés dans les cellules exprimant ces récepteurs en présence des paires de ligands donneur-accepteur indiquant la spécificité du signal. Les hétérodimères V_2/V_{1a} sont seulement détectés dans les cellules exprimant les deux récepteurs en utilisant une combinaison de ligands V_{1a} et V_2 donneur-accepteur.

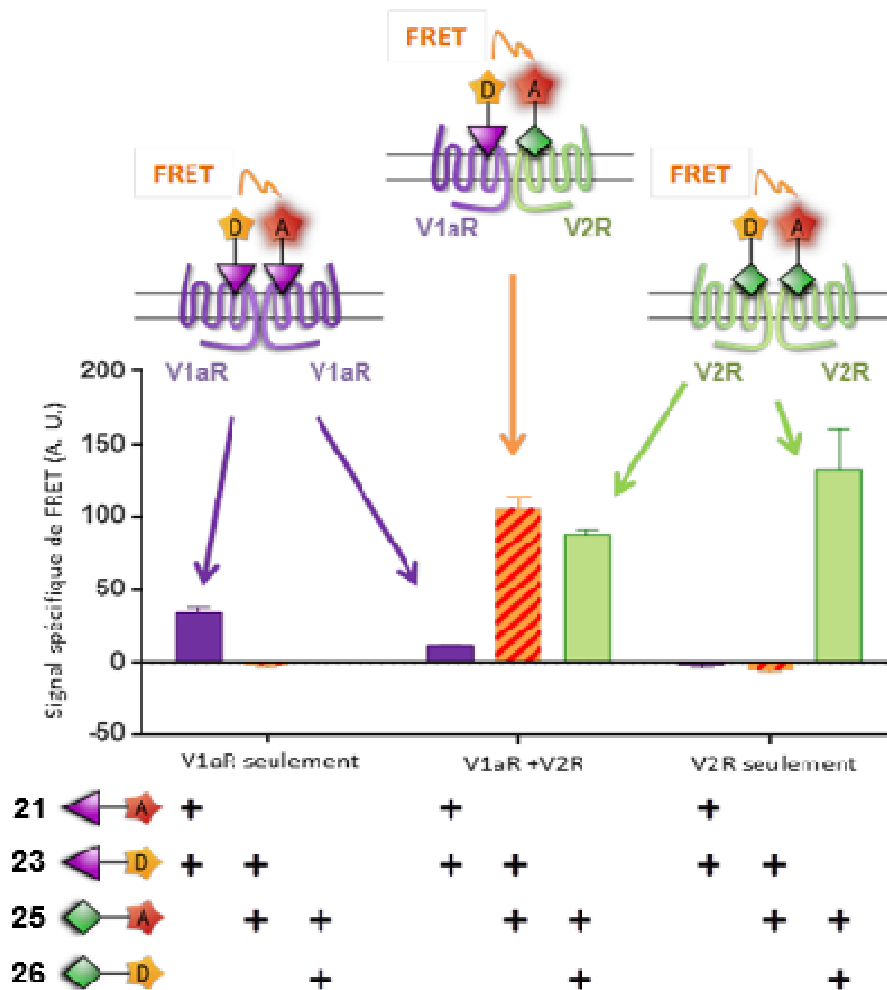
Figure 58 : Détection des hétérodimères à la surface des cellules COS-7¹⁵⁷

3. Etude de l'hétérodimérisation V_{1a}/V_2 avec des ligands fluorescents non-peptidiques

Les ligands fluorescents non-peptidiques présentent l'avantage d'être stables *in vivo* ou sur tissus contrairement aux ligands peptidiques. Dans cette optique, nous avons développé les premiers ligands non-peptidiques et sélectifs du récepteur de la vasopressine V_{1a} (composés **21** et **23**).

La même expérience de détection d'hétérodimères V_{1a}/V_2 sur cellules est réalisée mais cette fois-ci uniquement à partir uniquement de couples de ligands fluorescents non-peptidiques (Figure 59). Les récepteurs V_{1a} et V_2 ont été co-exprimés dans des cellules HEK 293 utilisant les ligands fluorescents **25** et **26** non-peptidiques et sélectifs du récepteur de la vasopressine

V₂ et les ligands fluorescents **21** et **23** non-peptidiques et sélectifs du récepteur de la vasopressine V_{1a}.



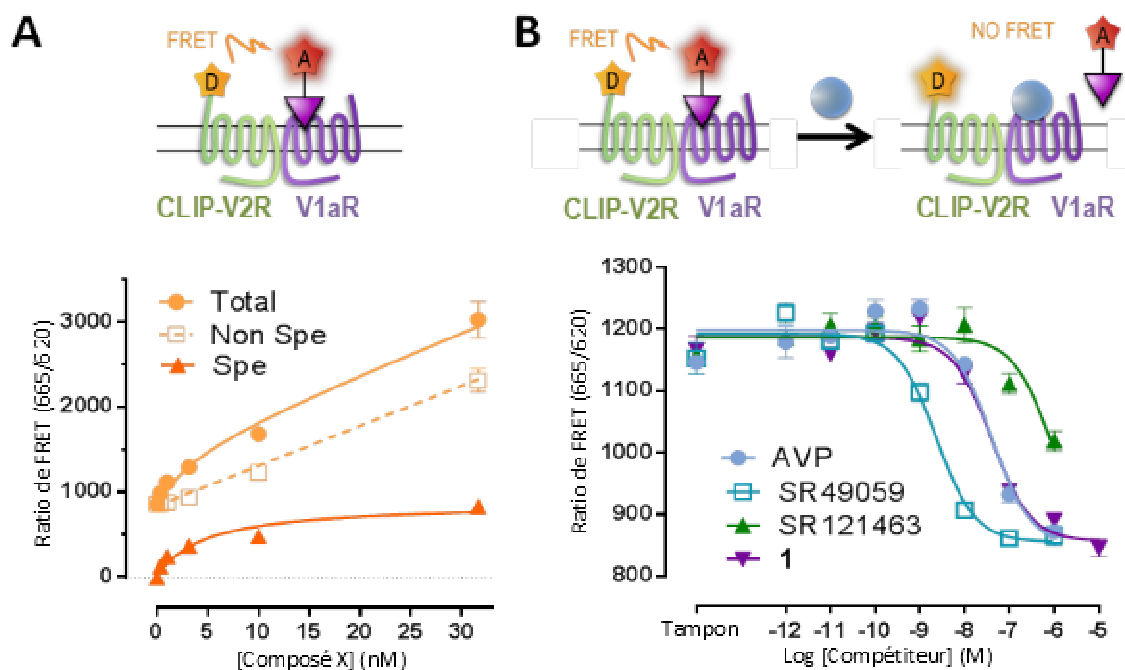
Signal de dimérisation pour les récepteurs V₂, V_{1a} ou les deux exprimés dans les cellules HEK 293. Les cellules HEK 293 qui expriment soit V₂, soit V_{1a} soit les deux récepteurs sont incubées en présence d'une combinaison de ligands fluorescents comme indiqués sous la figure. Les homodimères V_{1a} et V₂ sont seulement détectés dans les cellules exprimant ces récepteurs en présence des paires de ligands donneur-accepteur apparentés indiquant la spécificité du signal. Les hétérodimères V₂/V_{1a} sont seulement détectés dans les cellules exprimant les deux récepteurs en utilisant une combinaison de ligand V_{1a} et V₂.

Figure 59 : Détection des hétérodimères à la surface des cellules HEK 293.

4. Détection de l'affinité des ligands pour l'hétérodimère V_{1a}/V₂

En 1999, Jordan décrit que pour les récepteurs opioïdes, l'affinité d'un ligand pour son récepteur peut varier suivant la nature du second récepteur du dimère¹²⁷. Pour étudier ce phénomène dans notre système, une mesure de FRET est effectuée entre le ligand fluorescent du récepteur V_{1a} **21**, et le récepteur V₂ rendu fluorescent par technique CLIP-tag. La proximité des deux fluorophores permet de détecter un signal de FRET confirmant l'existence d'un hétérodimère entre le récepteur V₂ modifié (CLIP-tag marqué) et un

récepteur V_{1a} modifié (SNAP-tag non marqué). Des expériences de saturation sont ainsi réalisées pour déterminer l'affinité du composé **21** pour l'hétérodimère V_{1a}/V_2 (Figure 60). La constante de dissociation trouvée pour le composé fluorescent **21** est de 4.6 ± 1.5 nM, similaire à l'affinité de **21** pour le récepteur V_{1a} seul.



Les récepteurs de la vasopressine V_2 -CLIP et V_{1a} -SNAP sont coexprimés dans les cellules et les récepteurs de la vasopressine V_2 -CLIP sont marqués avec un CLIP-tag. (A) Expériences de saturation. Les cellules sont incubées en présence d'une concentration croissante de ligand fluorescent **21**. Le signal non spécifique est déterminé en excès du composé **1** ($10 \mu\text{M}$). (B) Les cellules marquées sont incubées en présence du composé fluorescent **21** ($7 \mu\text{M}$) et avec une concentration croissante d'AVP, SR49059, SR121463 et du composé **1**. Le signal de FRET est exprimé en fonction de la concentration en compétiteur. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM de trois déterminations indépendantes ($n=3$).

Figure 60 : Validation pharmacologique du composé **21 pour déterminer les affinités de ligands pour l'hétérodimère V_{1a} -SNAP/ V_2 -CLIP.**

Ce signal permet également de mesurer directement par compétition l'affinité de ligands du récepteur V_{1a} lorsqu'il est hétérodimérisé avec le récepteur V_2 et de rechercher des différences de comportement, voire de mettre au point une stratégie de criblage spécifique sur l'hétérodimère V_{1a}/V_2 . Des expériences de compétitions sont réalisées avec des ligands de référence comme l'AVP, le SR49059, le SR121463 et le composé **1** (Tableau 61). Le SR121463 est un antagoniste non-peptidique du récepteur de la vasopressine V_2 décrit en 2001 avec une affinité de 0.54 ± 0.08 nM sur cellules humaines¹⁵⁸. Les constantes d'inhibitions retrouvées sur notre hétérodimère sont similaires à celles déterminées sur le récepteur V_{1a} seul (récepteur SNAP-tag) (*Partie 1 Chapitre 1*).

| Composé | K _i (nM) sur l'hétérodimère V _{1a} /V ₂ ^a | | | |
|---------|---|---------|----------|----|
| | AVP | SR49059 | SR121463 | 1 |
| 21 | 20 | 1.16 | 425 | 20 |

^a Les cellules exprimant les hétérodimères des récepteurs de la vasopressine V_{1a}-SNAP et V₂-CLIP ont été marquées avec la technologie CLIP-tag et sont incubées en présence du composé fluorescent **21** (7 μM) et avec une concentration croissante d'AVP, SR49059, SR121463 et du composé **1**. Les K_i sont déterminés avec l'équation de Cheng-Prusoff. Les résultats correspondent à la moyenne +SEM de trois déterminations indépendantes (n=3).

Tableau 61 : Détermination des constantes d'inhibition pour l'AVP, le SR49059, le SR121463 et le composé 1 pour l'hétérodimère V_{1a}-SNAP/V₂-CLIP en utilisant le composé 21 comme traceur.

L'affinité du ligand fluorescent **21** et des ligands de références (AVP, SR49059, SR121463, composé **1**) du récepteur de la vasopressine V_{1a} sont les mêmes que le récepteur soit sous forme de monomère ou d'hétérodimère avec le récepteur V₂.

IV. Conclusion

Notre objectif était de détecter l'hétérodimérisation des récepteurs vasopressine V_{1a} et V₂ sur support avec des ligands utilisables *in vitro* et sur tissus natifs, en conditions physiologiques. Cet objectif a été atteint. Des ligands fluorescents non-peptidiques affins et relativement spécifiques des récepteurs vasopressine V_{1a} et V₂ ont été développés. Un signal FRET entre ligands ou entre ligand et récepteur a pu être observé et nous a permis de mettre en évidence l'hétérodimérisation et l'homodimérisation de ces récepteurs sur cellules les surexprimant. L'étape suivante sera d'utiliser cette technique pour détecter les hétérodimères sur tissus natifs de rein, ce qui semble désormais réalisable.

Partie 2 : Conception et synthèse d'agonistes non-peptidiques des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine.

Partie 2 Chapitre 1 : Criblage à haut débit pour accélérer la découverte d'agonistes non-peptidiques des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine V_{1a}

Il n'existe à ces jours que deux agonistes non-peptidiques partiels et médiocres pour le récepteur de l'ocytocine et aucun agoniste non-peptidique pour le récepteur de la vasopressine V_{1a}. Afin d'accélérer la découverte de nouvelles touches ayant ces caractéristiques, nous avons utilisé une stratégie de criblage robotisé. En premier lieu, des tests de liaison par fluorescence utilisant la technique de TR-FRET ont été développés au laboratoire (cf Partie 1 Chapitre 1). A l'aide de tests fonctionnels ou des tests de liaisons, la chimiothèque Patrimoine du laboratoire et la chimiothèque commerciale de la société Prestwick ont été criblées sur les récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine V_{1a} sur la plate-forme de chimie et biologie intégrative de Strasbourg (PCBIS).

L'objectif est d'aboutir à de nouveaux ligands des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine, préférentiellement des agonistes. Ces ligands devront être optimisés par des études de relation structure-activité pour aboutir à de nouveaux agonistes non-peptidiques utiles.

Dans ce premier chapitre, nous présentons les résultats du criblage à haut débit effectué sur ces deux récepteurs. Un criblage fonctionnel par mesure du signal calcique a été effectué sur le récepteur de l'ocytocine et un criblage par affinité et par fonction a été effectué sur le récepteur de la vasopressine V_{1a}.

Aucune molécule avec des propriétés agoniste n'a pu être identifiée directement. Par contre, le criblage nous a permis d'identifier une touche antagoniste originale avec un K_i de 800 nM. Cependant cette molécule n'est pas sélective (elle se fixe également sur le récepteur de l'ocytocine) et devra être éventuellement optimisée par des études de relations structure-activité pour atteindre l'objectif fixé.

I. Chimiothèques à cribler

Deux chimiothèques ont été testées. La chimiothèque Prestwick (Prestwick chemical library®), qui contient environ 1200 molécules, est constituée entièrement de médicaments ou de molécules ayant atteint les phases d'essais cliniques. Ces composés ont des faibles poids moléculaires, une forte diversité structurale ainsi que des propriétés pharmacologiques connues et une bonne biodisponibilité chez l'homme. La Chimiothèque Patrimoine comporte 6000 molécules, produits chimiques de synthèse et extraits de substances naturelles du laboratoire. Cette chimiothèque comporte des molécules diverses avec un haut potentiel d'activité biologique. Elle est en grande partie intégrée dans la Chimiothèque Nationale.

II. Criblage à haut débit sur le récepteur de l'ocytocine

Un criblage fonctionnel sur le récepteur de l'ocytocine a été effectué lors de la thèse de Stéphanie Loison (2007-2010) sur la plate-forme de chimie et biologie intégrative (PCBIS) à Strasbourg. Le criblage a été réalisé par les chercheurs et ingénieurs de la plate-forme avec l'appareil FlexStation® 3 (Molecular Devices). Les deux chimiothèques ont été criblées à haut débit soit 60 plaques pour la chimiothèque patrimoine et 14 plaques pour la chimiothèque Prestwick. Le criblage est effectué par test fonctionnel par mesure du signal calcique sur cellules HEK293 surexprimant le récepteur OXTR.

Un premier criblage à 10 μ M sur les cellules HEK293 surexprimant OXTR, fusionné en position N-terminale à la GFP et cloné avec le plasmide pIREneo1. A l'issue de ce premier criblage, 32 touches ont été identifiées : 7 de la chimiothèque Prestwick et 25 de la Chimiothèque Patrimoine.

Un criblage secondaire de ces 32 touches a ensuite été réalisé sur des cellules HEK293 clonées cette fois-ci avec le plasmide pIRESHyg3 et avec des concentrations de 1 et 10 μ M ainsi que sur des cellules HEK n'exprimant pas OXTR pour vérifier la spécificité de l'effet observé. Des courbes dose-réponse ont été établies pour étudier l'effet agoniste et antagoniste. Suite au criblage secondaire, 6 touches ont été sélectionnées présentant une réponse calcique à 10 μ M.

En caractérisant ces 6 touches de manière plus approfondie en gamme de concentration allant de 1 à 200 μM , aucune touche n'a été validée (effets non spécifique à OXTR, signal calcique trop faible).

Ce criblage n'a pas révélé de touches agonistes intéressantes parmi les chimiothèques testées (chimiothèques Patrimoine et Prestwick).

III. Criblage à haut débit sur le récepteur de la vasopressine V_{1a}

Le criblage sur le récepteur de la vasopressine V_{1a} est effectué sur la plate-forme de chimie et biologie intégrative de Strasbourg (PCBIS) et est effectué en deux étapes. Un premier criblage est effectué par mesure de l'inhibition de la liaison en utilisant un test de liaison par TR-FRET pour identifier les molécules qui se fixent sur $V_{1a}R$. Un second criblage fonctionnel est réalisé à partir de touches obtenues en liaison par mesure de l'augmentation du signal calcique intracellulaire.

1. Criblage par liaison

Le test de liaison par TR-FRET pour le récepteur de la vasopressine V_{1a} décrit dans *le chapitre 1 de la partie 1* est utilisé pour cribler la chimiothèque Patrimoine (4800 molécules) et la chimiothèque de Prestwick (1200 molécules) ainsi que 460 molécules pures provenant d'extraits naturels. Un criblage primaire à 10 μM sur les cellules HEK293 surexprimant $V_{1a}R$ nous a permis d'identifier 203 touches primaires qui montrent plus de 30% d'inhibition de la liaison en TR-FRET.

Un criblage secondaire à 10 μM et 1 μM permet de confirmer les touches. A l'issue de ce couplage, 121 molécules qui donnent plus de 35% d'inhibition de liaison sont sélectionnées pour le criblage par fonction (Figure 62).

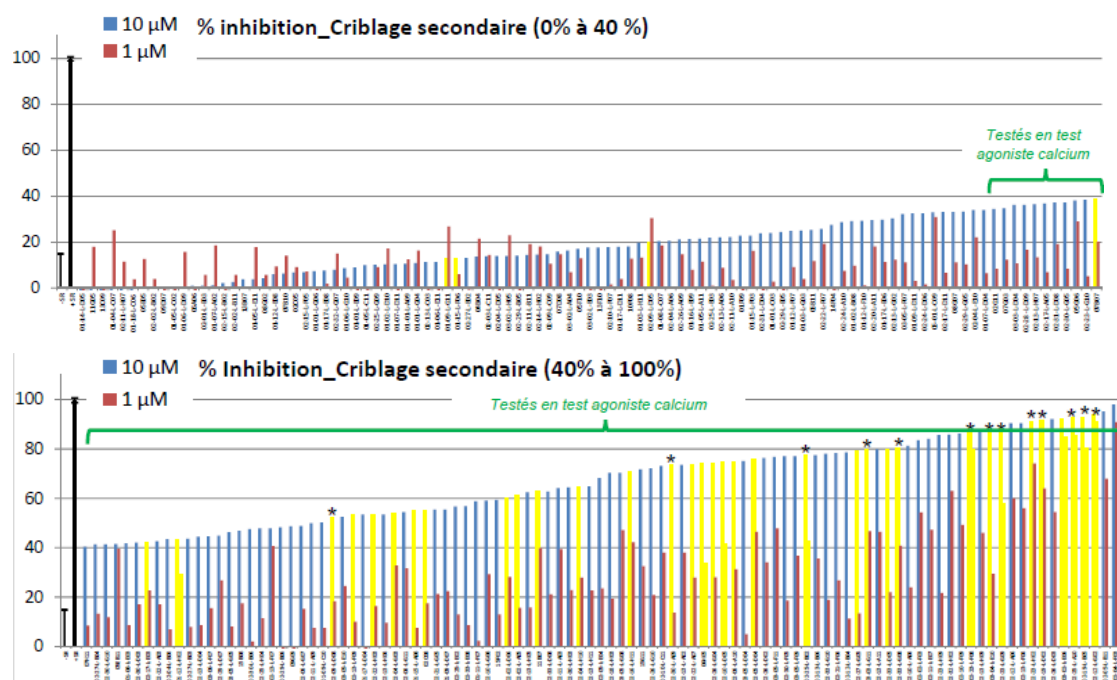


Figure 62 : Criblage secondaire par mesure de l'inhibition de la liaison de la vasopressine en TR-FRET (pourcentage d'inhibition représenté).

2. Criblage par fonction

Le criblage par fonction s'effectue par mesure du signal calcique intracellulaire. Le kit utilisé est commercialisé par FluoProbes®. Ce kit utilise Indo-1 qui est un outil fluorescent excitable par UV qui permet de quantifier le calcium intracellulaire. En présence de calcium, après excitation à 338 nm, le pic d'émission se déplace de 475 nm à 401 nm. La concentration en calcium peut être déterminée en mesurant le ratio des intensités de fluorescence aux deux longueurs d'onde. L'Indo-1 est présent sous la forme d'un ester (indo-1 AM ester) qui est perméable et rentre dans l'espace intracellulaire où il est hydrolysé en indo-1 par des estérases endogènes.

Le criblage primaire est effectué sur cellules HEK293 surexprimant le récepteur V_{1a} -SnapTag ainsi que sur cellules HEK293 non transfectées pour vérifier la spécificité du signal observé. A l'issue de ce criblage, 37 molécules (36 molécules de la Chimiothèque Patrimoine et de 1 molécule de la chimiothèque de Prestwick) inhibent plus de 50% du signal de la vasopressine (Figure 63).

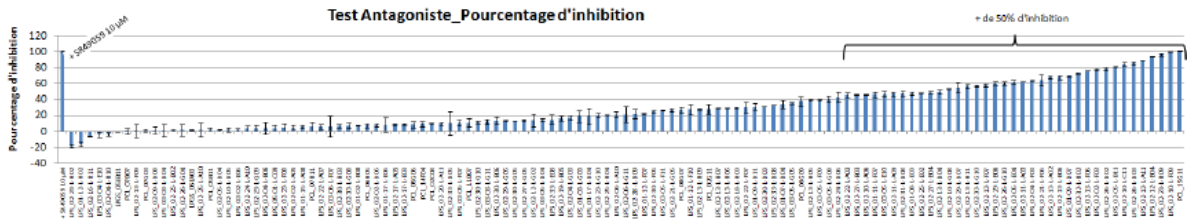


Figure 63 : Criblage primaire par mesure du signal calcique

Aucun agoniste n'est retrouvé. Des courbes doses réponses sont réalisées pour les 6 meilleures molécules. 5 des 6 molécules ont des K_i compris entre 1.8 et 6.1 nM et des IC_{50} comprises entre 2.5 et 8 μ M (Figure 64).

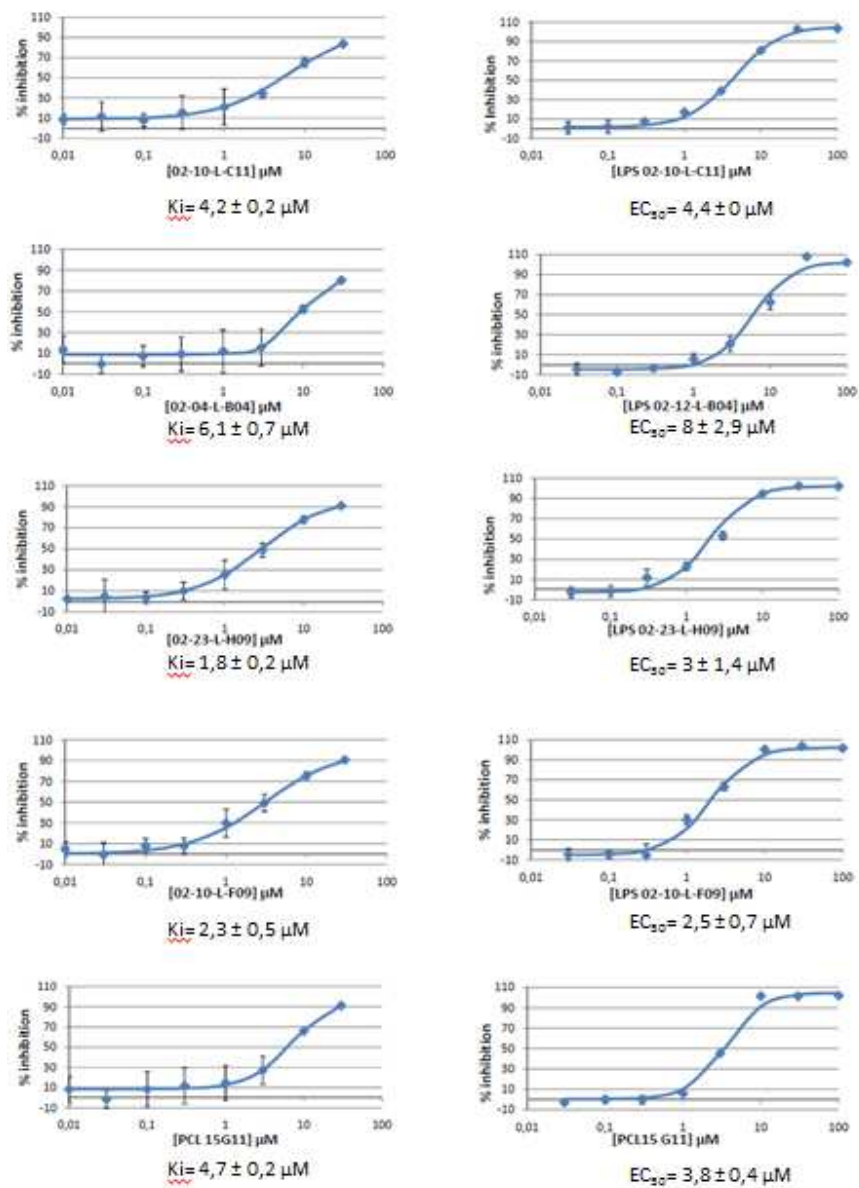


Figure 64 : Courbes doses réponses des meilleures touches

Une molécule sort du lot avec une affinité et une fonction inférieure au micromolaire (Figure 65). LPS_02-05-L-B11 a un K_i de 300 nM et une IC_{50} de 900 ± 0.3 nM. Le pourcentage d'inhibition redescend aux fortes concentrations ce qui est dû à la fluorescence de la molécule qui interfère avec la mesure de fluorescence du traceur

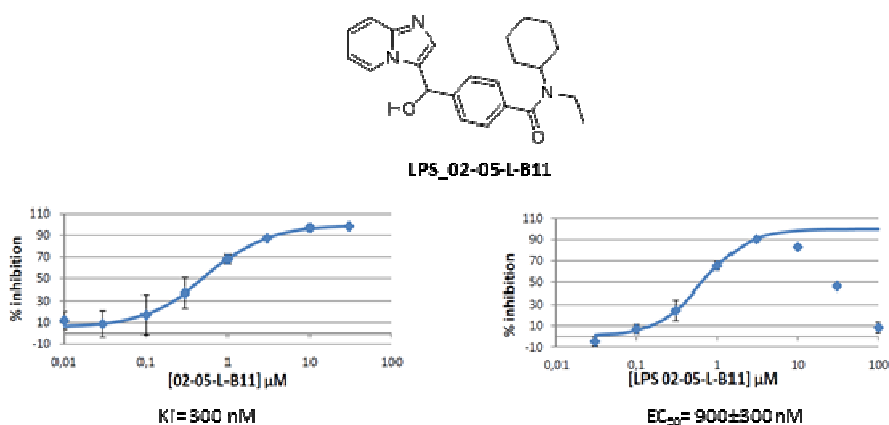


Figure 65 : Structure du meilleur antagoniste issu du criblage sur V1aR des chimiothèques patrimoine et Prestwick

Une vérification de la sélectivité de cette molécule par mesure d'affinité sur les récepteurs de la vasopressine V_2 et de l'ocytocine est réalisée. La molécule n'est malheureusement pas sélective (Tableau 10), elle se fixe sur OXTR avec un facteur de discrimination de seulement 1.6 et sur le V_2R avec un facteur de 7.8 pour OXTR. La constante d'inhibition pour $V_{1a}R$ est différente de celle déterminé lors du criblage. Ces valeurs ne correspondent qu'à des $n=1$. Les $n=2$ et 3 sont en cours de réalisation.

| Composé | $V_{1a}R$ | | | V_2R | | | OXTR | | |
|------------------------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|
| | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c |
| LPS_02-05-L-B11 | 1644 | ns ^d | 190±156 | 12857 | nd ^e | nd ^e | 2571 | ns ^d | 700±0 |

^a Les valeurs de K_i sont exprimées en nM et sont déterminées par TR-FRET sur cellules exprimant les récepteurs de la vasopressine V_{1a} , V_2 et de l'ocytocine marqués en utilisant la technologie SNAP-tag et incubés en présence d'un ligand fluorescent marqué au DY647 (20 nM) et en concentration croissante de compétiteurs. Ces valeurs correspondent à une détermination. ^b Les valeurs d' EC_{50} sont exprimées en nM, accompagnées de l'effet maximal mesuré en pourcentage par rapport à la réponse maximale de l'OT et de l'AVP et correspondent à la moyenne \pm SEM de deux déterminations indépendantes. ^c Les valeurs d' IC_{50} sont exprimées en nM et correspondent à la moyenne \pm SEM de deux déterminations indépendantes. ^d ns (non significatif) pour 5-10% de réponse à 1 μ M par rapport à la stimulation maximale de l'agoniste endogène. ^e ns (non significatif) pour 5-10% d'inhibition de la réponse induite par l'agoniste endogène à [ligand]=1 μ M ^f nd (non déterminé).

Tableau 10 : Affinité et fonction de LPS_02-05-L-B11

La mesure du signal calcique montre que le composé **LPS_02-05-L-B11** est antagoniste sur le récepteur de la vasopressine V_{1a} et sur le récepteur de l'ocytocine avec des valeurs de 190 ± 156 nM et de 700 ± 0 nM respectivement. Cette touche pourrait dans le futur être optimisée pour augmenter la sélectivité et l'affinité pour le récepteur de la vasopressine V_{1a} ou pour le récepteur de l'ocytocine.

IV. Criblage à haut débit d'extraits de substances naturelles

L'équipe de Pharmacognosie et substances naturelles bioactives de notre unité (C Vonthron, B Weniger, A Lobstein) a participé à la sélection et l'extraction de substances naturelles pour un criblage sur OXTR et $V_{1a}R$. Les substances naturelles d'espèces végétales traditionnellement employées dans les indications liées aux effets de l'ocytocine ont été recensées. Les critères objectifs sont des effets sur la lactation ou sur les contractions utérines lors de l'accouchement. D'autres critères ont également été pris en compte comme des modulations de l'attachement, de la fidélité, du lien social ou de l'amour. Après approvisionnement, ces espèces ont été extraites. Les extraits ont été criblés sur les récepteurs OXTR et $V_{1a}R$. Deux campagnes de criblages ont été effectuées.

1. 1^{re} campagne

La première campagne de criblage comprenait des espèces végétales de la pharmacopée occidentale et moyen-orientale. Une étude bibliographique a permis de recenser 20 espèces utilisées en usage traditionnel comme galactogène, emménagogue et ocytocique. Les études de chimiotaxonomie ont permis d'identifier les terpènes, apiacées et zingiberacées. 48 extraits ont été préparés à partir de ces 20 espèces par extraction polaire et apolaire (travaux réalisés par Jean-Baptiste Gallé).

Ces 48 extraits ont été criblés par mesure du signal calcique sur les cellules HEK293 surexprimant OXTR fusionné à EGFP en N-terminale et sur les cellules HEK293 non transfectées. Aucun extrait n'est actif.

Ces 48 extraits sont alors criblés sur $V_{1a}R$ à 1 et 10 $\mu\text{g/mL}$ par mesure de l'inhibition de la liaison en utilisant un test de liaison par TR-FRET. Une touche est identifiée et confirmée à 1 et 10 $\mu\text{g/mL}$. Le criblage secondaire par mesure du signal calcique montre que cet extrait n'a pas d'effet agoniste ni antagoniste.

2. 2^{ème} campagne

La 2^{ème} campagne consistait à étudier les espèces végétales de la pharmacopée africaine. Des enquêtes de terrain à Madagascar (réalisées par Jean-Baptiste Gallé) ont permis de sélectionner 4 espèces qui sont connues pour avoir à la fois des activités galactogènes et ocytociques, notamment *Commiphora simplicifolia* (*Burseraceae*) et *Fernandoa madagascariensis* (*Bignoniaceae*). Ces espèces étant protégées, il est impossible de les récolter. Une deuxième sélection est faite suivant la disponibilité des extraits des différentes parties de ces 4 espèces dans l'extractothèque nationale. 9 plantes sont sélectionnées et différentes extractions (polaire, apolaire, décoction traditionnelle) sont effectuées pour aboutir à 27 extraits au total (travaux réalisées par Flore Nardella).

32 extraits de substances naturelles (+ la silymarin et le 3-carène) ayant des propriétés galactogènes ont été sélectionnés. Ces extraits ont été criblés par mesure du signal calcique à 10 µg/mL et à 100 µg/mL sur des cellules HEK293 surexprimant OXTR fusionné à EGFP en N-terminale et cloné avec le plasmide pIREneo1 et sur des cellules HEK293 surexprimant V_{1a}R-SNAP-tag (non marqué). Aucun extrait n'est actif que ce soit sur OXTR ou sur V_{1a}R.

V. Conclusion

Notre objectif était de trouver de nouveaux agonistes avec un châssis original pour les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine. Aucun agoniste n'est sorti de nos criblages que ce soit du criblage de chimiothèques (patrimoine ou Prestwick) ou de substances naturelles. Ce résultat est relativement décevant mais n'est pas surprenant pour deux raisons : les agonistes sont généralement beaucoup plus difficiles à trouver que les antagonistes car il est plus difficile de trouver une molécule qui se fixe au récepteur et qui l'active plutôt qu'une molécule qui s'y fixe et qui le bloque. Par ailleurs, des résultats préliminaires suggèrent que le récepteur de l'ocytocine existe sous forme de dimère et qu'il nécessite la fixation de deux molécules d'OT pour amorcer le couplage fonctionnel, la première molécule se comportant comme un simple effecteur allostérique modulant la fixation de la seconde.

Pour atteindre l'objectif initialement fixé, le criblage pourrait être étendu à d'autres librairies (ensemble de la Chimiothèque Nationale ou substances naturelles). Une alternative consisterait d'aller à la recherche d'effecteurs allostériques positifs de l'ocytocine elle-même afin de tenir compte de son mode particulier d'activation du récepteur.

Partie 2 Chapitre 2 : Conception, synthèse et évaluation d'agonistes non-peptidiques du récepteur de l'ocytocine dérivés de benzodiazépines.

Dans la littérature, deux agonistes partiels non-peptidiques dérivés de benzodiazépines sont décrits : le **Ferring-1** et le **WAY-267464**. Ces deux agonistes montrent une faible sélectivité pour le récepteur de l'ocytocine par rapport aux récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V_2 et un caractère agoniste partiel très variable selon les systèmes d'étude. De plus, de par leur taille ces deux molécules ne passent pas la barrière hémato-encéphalique. Pour aboutir à un potentiel candidat médicament, il est nécessaire d'avoir une molécule plus petite, plus stable, affine et sélective pour le récepteur de l'ocytocine. C'est l'objectif ambitieux que nous nous étions fixé et que nous abordons dans ce deuxième chapitre.

Au laboratoire, une étude de la troncature du composé **Ferring-1** avait permis d'identifier les déterminants essentiels pour garder un caractère agoniste (thèses de Marie-Céline Frantz, 2007 et Stéphanie Loison, 2011). A partir de la meilleure molécule obtenue alors, nous avons prolongé l'étude des relations structure-activité en cherchant à rigidifier la molécule, réduire sa taille, varier les substituants pour modifier la sélectivité et augmenter le passage de la BHE. Une douzaine de molécules ont été synthétisées et évaluées en test d'affinité (par test de liaison par TR-FRET mis au point au laboratoire, cf Partie 1 Chapitre 1) et de fonction sur les récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine V_{1a} et V_2 .

Sur les 21 dérivés testés, nous avons pu améliorer l'affinité de deux molécules pour le récepteur de l'ocytocine au détriment de la sélectivité pour les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V_2 . Cinq composés gardent un caractère agoniste avec des EC_{50} allant de 28 à 300 nM et des pourcentages de réponses de 34 à 100%.

Deux molécules sortent du lot. Le composé **88** a une activité de 28 nM pour le récepteur de l'ocytocine et un pourcentage de réponse de 100%. Cette molécule a une forte sélectivité pour le récepteur de l'ocytocine par rapport au récepteur V_{1a} (facteur 34.4) et moyenne pour le récepteur V_2 (facteur 2.4). Le composé **94** a une EC_{50} de 43 nM avec un pourcentage de réponse de 100% et une sélectivité de 4.8 pour le récepteur V_{1a} et de 1.9 pour le récepteur V_2 .

Le profil de sélectivité du composé **SL-II-135** vis-à-vis des différentes voies de signalisation des RCPG et notamment de l'activation des sous-unités de protéines $G\alpha$ a été effectué en collaboration avec le Dr Bice Chini (CNR, Milan). Le **SL-II-135** est un agoniste biaisé et active G_q , G_{i2} , G_{i3} et G_{oA} mais n'active pas G_{i1} et G_{oB} . Ce profil de sélectivité permettrait d'utiliser

cette molécule pour mieux comprendre les fonctions associées aux différentes voies de signalisation des sous unités de protéine G α .

Il est maintenant nécessaire de prendre les meilleurs candidats et de les tester in vivo chez la souris et chez le singe pour voir s'il y a une modulation du comportement social.

I. Introduction

1. Agonistes non-peptidiques décrits dans la littérature

i. Affinités et fonctions

A ce jour, deux agonistes non-peptidiques ont été décrits dans la littérature, tous deux dérivés du même châssis benzodiazépine. Le premier agoniste, le **Ferring-1**, a été décrit en 2004 par la société Ferring¹⁵⁹ (Figure 66). Cet agoniste est issu de deux campagnes de criblage. La première campagne de criblage consistait à tester en fonction tous les agonistes non-peptidiques du récepteur de la vasopressine V₂. A l'issue de ce criblage, un composé a été identifié avec une réponse faible sur le récepteur de l'ocytocine (à 3 µM). Un second criblage d'une chimiothèque de 50000 composés a permis d'identifier trois nouvelles touches. Des études de relation structure-activité autour de ces trois touches ont permis d'accéder au composé **Ferring-1**.

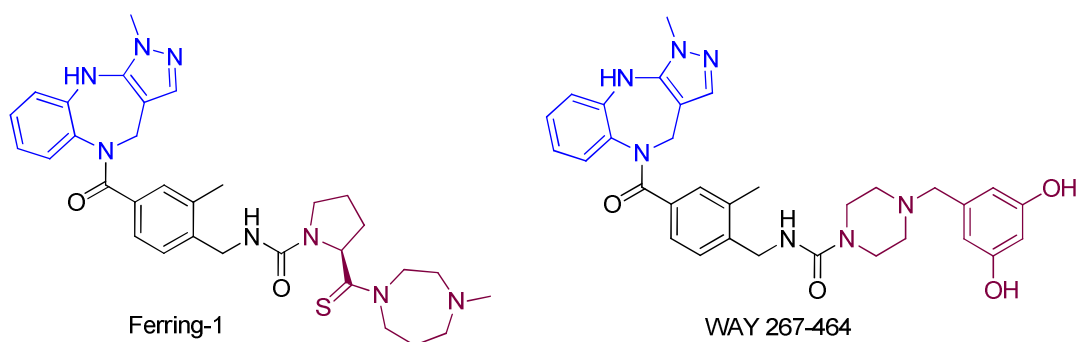


Figure 66 : Deux agonistes non-peptidiques décrits dans la littérature à ce jour

Cet agoniste est décrit comme ayant une EC₅₀ de 33±15 nM pour le récepteur de l'ocytocine et de 850±280 nM pour le récepteur de la vasopressine V_{1a} (mesure par gène rapporteur NFAT-luciférase) avec une affinité 25 fois plus élevée pour le récepteur de l'ocytocine que pour celui de la vasopressine V₂ (Tableau 12).

| | OXTR, K _i (nM) | V _{1a} , K _i (nM) | V ₂ , K _i (nM) |
|---|---------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Radioliation sur cellules CHO ⁹⁹ | 147±11 | 330±38 | >1000 |

Tableau 11 : Récapitulatif des valeurs de constantes d'inhibition pour le Ferring-1

Cette molécule a été synthétisée au laboratoire et des mesures d'affinité et de fonctions ont été réalisées à l'IGF à Montpellier et sur la plate-forme PCBIS à Strasbourg⁹⁹. Les mesures

d'affinité par mesure de la radioliation sur cellules CHO montrent que le **Ferring-1** n'est pas sélectif du récepteur de l'ocytocine. En effet, il se fixe avec une affinité de 147 nM sur OXTR et une affinité de 330 nM sur V_{1a}R (Tableau 11). Deux mesures de fonctions ont été réalisées. La première par mesure du signal IP où le **Ferring-1** est retrouvé agoniste partiel avec une EC₅₀ faible de 667 nM et un pourcentage de réponse maximale de 58% pour le récepteur de l'ocytocine. Cependant, sur le récepteur de la vasopressine V_{1a}, le **Ferring-1** est antagoniste avec une EC₅₀ de 271 nM et un pourcentage de réponse de 84%. La mesure du signal calcique sur la plate-forme PCBIS confirme que le **Ferring-1** est agoniste total ou partiel avec une EC₅₀ allant de 48.96 nM à 124.39 nM suivant les lignées cellulaires utilisées (Tableau 12).

| Test Fonctionnel | OXTR EC ₅₀ (nM) | V _{1a} R EC ₅₀ (nM) |
|--|------------------------------|---|
| Mesure par gène rapporteur NFAT-luciférase ¹⁵⁹ | Ago 33±15 | Ago 850±280 |
| Mesure du signal IP à Montpellier | Ago part. 667±68 (58±2% max) | Antago 271±61 |
| Mesure du signal calcique sur cellules HEK surexprimant le récepteur OTRX et fusionnées en N-terminale à un plasmide | pIRESHyg3-SP-EGFP | |
| | Ago 110.84 (106.56% max) | nd |
| | pIRESHyg3 | |
| | Ago 124.39 (87.76% max) | nd |
| | pIRESneo31 | |
| | Ago 48.96 (106.56% max) | nd |

Tableau 12 : Récapitulatif de tous les résultats de fonction pour le Ferring-1

En 2010¹⁰⁰ est décrit le 2^{ème} agoniste non-peptidique dérivé du même châssis benzodiazépine, le **WAY-267464** (Figure 66). Ce ligand est décrit pour avoir une affinité de 58.4±5.9 nM pour le récepteur de l'ocytocine, une EC₅₀ de 29.0±14.3 nM avec un pourcentage de réponse de 93.4±1.8% par mesure du signal calcique sur cellules CHO et un facteur de sélectivité de plus de 100 à la fois pour la fonction et l'affinité pour les sous-types de récepteurs de la vasopressine (Tableau 13, Tableau 14).

| | OXTR, K _i (nM) | V _{1a} , K _i (nM) | V ₂ , K _i (nM) |
|---|---|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Radioliation sur cellules CHO ¹⁰⁰ | 58.4±11.3 (humain) 51.6±5.9 (souris) | 100× sélectif | 100× sélectif |
| Radioliation sur cellules HEK293 ¹⁰¹ | 978±71 | 113±32 | nd |

Tableau 13 : Récapitulatif des valeurs de constantes d'inhibition pour le WAY-267464

Deux ans plus tard, le groupe de McGregor¹⁰¹ montre que le **WAY-267464** n'est pas sélectif du récepteur de la vasopressine V_{1a} (K_i= 113 nM) par rapport au récepteur de l'ocytocine (K_i = 978 nM). Ce ligand semble être antagoniste pour le récepteur de la vasopressine V_{1a} et faiblement agoniste pour le récepteur de l'ocytocine avec une EC₅₀= 881 nM par mesure du gène rapporteur NFAT-luciférase (Tableau 13, Tableau 14).

| Test Fonctionnel | OXTR EC ₅₀ (nM) | V _{1a} R EC ₅₀ /IC ₅₀ (nM) |
|--|----------------------------------|---|
| Mesure du signal calcique sur cellules CHO avec OXTR humain recombinant ¹⁰⁰ | Ago 61.3±4.5 (87.1±2.9% max) | 100× sélectif |
| Mesure du signal calcique sur cellules CHO avec OXTR de souris recombinant ¹⁰⁰ | Ago 29.0±14.3 (93.4±1.8% max) | 100× sélectif |
| Mesure par gène rapporteur NFAT-luciférase ¹⁰¹ | Ago 881±383 nM | Antago >100000 |
| | pIRESHyg3-SP-EGFP | |
| | Ago part. 10.33 (30.61% max) | nd |
| | Antago 266.23 (95.14% max) | |
| | pIRESHyg3 | |
| Mesure du signal calcique sur cellules HEK surexprimant le récepteur OTRX et fusionnées en N-terminale à un plasmide | Ago 51.08 (27.72% max) | nd |
| | Antago 139.79 (79.00% max) | |
| | pIRESneo3 | |
| | Ago 10.02 (31.00% max) | nd |
| | Antago 266.06 (81.89% max) | |

Tableau 14 : Récapitulatif des valeurs de fonction pour le WAY-267464

Le **WAY-267464** a été synthétisé au laboratoire et testé en fonction par mesure du signal calcique. On observe que le **WAY-267464** est agoniste partiel pour le récepteur de l'ocytocine avec des EC₅₀ comprises entre 10.02 nM et 51.08 nM avec un pourcentage de réponse maximale compris entre 28% et 32%. Il est également retrouvé antagoniste avec des IC₅₀ comprises entre 139.79 nM et 266.23 nM avec un pourcentage de réponse compris entre 79% et 95%. Cette molécule semble donc être un agoniste partiel faiblement efficace. Ring et son équipe ont démontré l'influence du **WAY-267464** sur les différents paramètres anxiolytiques chez la souris¹⁰⁰. Il montre un profil anxiolytique similaire au ligand endogène.

ii. Mesures pharmacocinétiques et pharmacodynamiques

Des mesures de logD et de passage de la barrière hémato-encéphalique ont été effectuées sur la plate-forme TechMed à Illkirch afin d'évaluer laquelle des deux molécules a les meilleures propriétés pharmacocinétiques (Tableau 15).

| Nom | Solubilité (mM) | logD à pH 7.4 | PAMPA |
|------------|------------------------------|---------------|----------------|
| Ferring-1 | >0.96 (solution non saturée) | 1.60 ±0.04 | Pas de passage |
| WAY-267464 | 0.101 ±0.003 | 2.28 | Pas de passage |

Tableau 15 : Mesure de la solubilité, du logD et du passage de la BHE pour le Ferring-1 et le WAY-267464

Une mesure de la solubilité dans un tampon HEPES à pH = 7,4, du logD à pH = 7,4 et un test PAMPA ont été effectués :

- Mesure de la solubilité.

Une faible solubilité limite l'absorption intestinale des composés et diminue leur biodisponibilité dans le cas de l'administration orale. Il est donc nécessaire de caractériser la solubilité d'une molécule dès les premières étapes lors d'un processus de développement d'un nouveau médicament. Une solution de tampon HEPES à pH = 7.4 est saturée en produit et agitée 24 heures à TA puis centrifugée. La quantification du produit en solution se fait par HPLC.

Le WAY-267464 est moins soluble que le Ferring-1. Les solubilités de ces deux composés restent néanmoins bonnes avec des valeurs supérieures à 100 µM.

- Mesure du logD

Pour mesurer la lipophilie, on mesure le plus couramment le coefficient de partage entre l'octanol et l'eau (LogP). La lipophilie d'une molécule va influencer son absorption et donc sa distribution entre les tissus. Une molécule très hydrophobe va avoir tendance à interférer avec le métabolisme du cytochrome P450 et à s'accumuler dans les compartiments hydrophobes. Le logD est un coefficient de distribution qui tient compte de l'ionisation des molécules à pH = 7,4. Pour une absorption intestinale optimale, le logD doit se trouver entre 0.5 et 2. Un LogD supérieur à 2 est préférable pour une absorption centrale. Le logD du Ferring-1 est de 1.60 et du WAY-267464 de 2.28. Ces deux molécules ont un logD correct.

- Evaluation de la perméabilité par PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay)

La perméabilité est la vitesse de passage d'un composé à travers une barrière biologique. Ce processus est impliqué au niveau de l'absorption intestinale mais également au niveau de la distribution du sang vers les organes (rein, foie, cerveau). Le principal mécanisme intervenant dans la perméabilité est une diffusion passive qui ne fait pas intervenir de transporteurs. Cette perméabilité peut être évaluée par des systèmes modèles dont le test PAMPA. Le système est composé d'une plaque standard et d'une plaque à fond poreux positionnée sur la première ce qui permet de créer un compartiment donneur et un accepteur. La barrière artificielle est constituée de phospholipides (phosphatidylcholines) solubilisés dans un solvant organique (dodécane) et est incorporée dans les puits à fond poreux. Le composé est disposé dans le compartiment donneur (Figure 67). L'incubation se fait pendant 16h et la détection se fait par HPLC ou LC-MS.

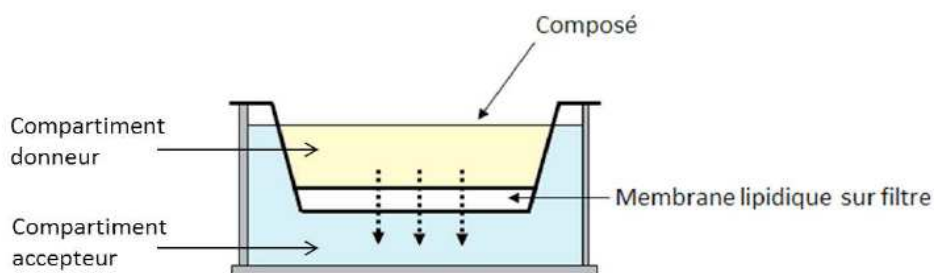


Figure 67 : Montage pour le test de la perméabilité par PAMPA (Référence site TechMed)

Ni le Ferring-1, ni le WAY-267464 ne passe la barrière artificielle lipidique. La lipophilie et la solubilité dans l'eau étant raisonnables, ces deux molécules semblent avoir une masse moléculaire trop élevée pour pouvoir rentrer dans le cerveau. Il serait intéressant de faire une mesure de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique *in vivo* par quantification du produit dans le cerveau de la souris (par HPLC ou LC-MS). En effet, les transports actifs pourraient jouer un rôle important dans le passage de la BHE.

En conclusion, les données issues de la littérature, ou celles qui résultent de nos propres expériences, concernant l'activité de ces deux molécules que ce soit en fonction ou en affinité sont très divergentes. Plusieurs explications sont possibles :

- les tests fonctionnels utilisés ne sont pas les mêmes (mesure du signal calcique, mesure du signal IP, mesure par gène rapporteur NFAT-luciférase) ;
- les lignées cellulaires ne sont pas les mêmes (cellules CHO, cellules HEK, cellules HEK et récepteurs marqués avec la GFP).

Il serait donc nécessaire de retester le **Ferring-1** et le **WAY-267464** sur un même test fonctionnel et par affinité. Pour cela, ces deux molécules ont été incluses comme références dans les tests de liaison par TR-FRET et de fonction par mesure du signal calcique que nous avons utilisés dans notre étude de RSA.

Aucun ligand agoniste entier, non-peptidique, sélectif, affin et possédant de bonnes propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques n'existe donc pas à ce jour : ni le **Ferring-1** ni le **WAY-267464** ne remplissent les critères.

2. Travaux effectués précédemment au laboratoire

Une étude de troncature du **Ferring-1** avait été réalisée au laboratoire par Marie-Céline Frantz⁹⁹ et Stéphanie Loison. L'étude de la troncature de ce ligand a permis d'identifier les déterminants essentiels pour garder un caractère agoniste pour le récepteur de l'ocytocine (Figure 68). La fenêtre d'activité agoniste est extrêmement étroite.

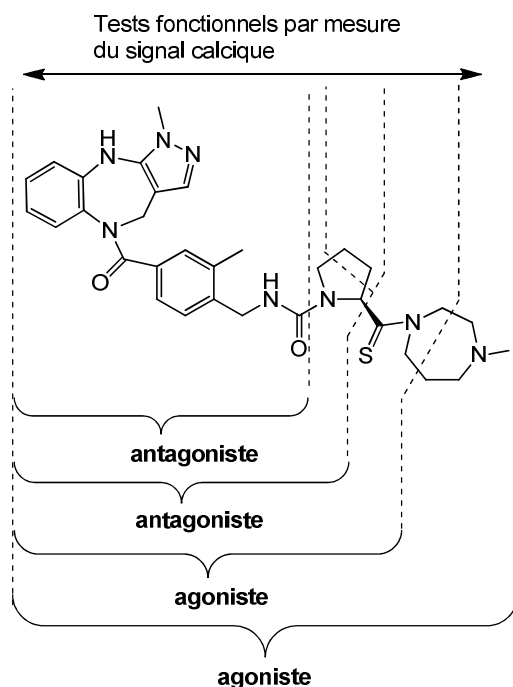


Figure 68 : Étude des troncutures du Ferring-1 effectuées par Marie Céline Frantz et Stéphanie Loison

On peut voir que la suppression du thioamide supprime toute activité agoniste des molécules qui deviennent antagonistes. Le thioamide est nécessaire pour garder le caractère agoniste. Par ailleurs des études effectuées par Marie-Céline Frantz et publiées dans *Journal of Medicinal Chemistry*⁹⁹ montrent que le tricycle benzodiazépine est également nécessaire pour garder un caractère agoniste. Toute homologation par des systèmes isostères et isoélectroniques conduit à une perte d'affinité ou tout caractère agoniste. La seule molécule agoniste obtenue au laboratoire est le **SL-II-135** (Figure 69) issue des troncatures du **Ferring-1** au niveau du thioamide. L'affinité de cette molécule a été mesurée par radioliation et en fonction par mesure du signal IP à l'IGF et par mesure du signal calcique sur la plate-forme PCBIS. Les résultats sont compilés dans les Tableau 16 et Tableau 17.

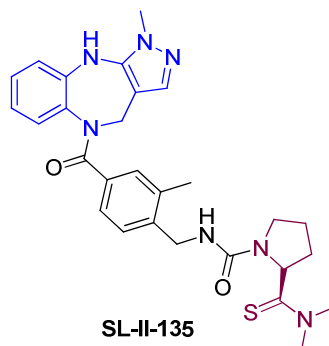


Figure 69 : Structure du SL-II-135

On peut voir que le **SL-II-135** a une bonne affinité pour le récepteur OXTR (61 nM) et une faible sélectivité de 6 pour le récepteur V_{1a} et de 10 pour le récepteur V₂. La masse moléculaire diminue vis-à-vis des deux molécules de référence (**Ferring-1** et **WAY-267464**). On gagne en affinité (facteur 2) et en sélectivité par rapport au **Ferring-1**. L'affinité sur cellules CHO reste comparable à celle du **WAY-267464** et on perd en sélectivité (Tableau 16).

| Test d'affinité | OXTR, K _i (nM) | V _{1a} , K _i (nM) | V ₂ , K _i (nM) |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Radioliation sur cellules CHO | 61±17 | 668 | 374 |

Tableau 16 : Affinité de SL-II-135 pour les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine

Deux mesures de fonction sont effectuées sur différentes voies de signalisation (Tableau 17). La mesure du signal calcique donne le **SL-II-135** agoniste avec une très bonne EC₅₀ comprise entre 16.47 nM et 69.26 nM et surtout avec un pourcentage de réponse fonctionnelle

calcique compris entre 95% et 102% (contre 87% pour le **WAY-267464**). Cependant la mesure du signal IP donne une valeur de EC₅₀ de 222 nM avec un pourcentage de réponse de seulement 40%.

| Test Fonctionnel | OXTR EC ₅₀ (nM) | V _{1aR} EC ₅₀ (nM) |
|--|--|--|
| Mesure du IP à Montpellier | Ago 222±122 (40%) | nd |
| Mesure du signal calcique sur cellules HEK surexprimant le récepteur OTRX et fusionnées en N-terminale à un plasmide | pIRESHyg3-SP-EGFP Ago 16.47 (93.94) | nd |
| | pIRESHyg3 Ago 69.26 (101.73) | nd |
| | pIRESneo31 Ago 28.48 (94.98) | nd |

Tableau 17: Fonction de SL-II-135 par mesure du signal calcique

Nous disposons donc d'une molécule plus petite que les molécules de référence, présentant une bonne affinité pour le récepteur OXTR, un fort caractère agoniste en cellules CHO mais encore une sélectivité modeste.

3. Objectifs du projet

Pour un usage thérapeutique chez les autistes, il existe une réelle nécessité de concevoir une molécule plus petite que l'ocytocine, stable *in vivo* et qui passe la barrière hémato-encéphalique.

L'objectif du projet est donc de concevoir un ligand (1) affin, (2) sélectif du récepteur de l'ocytocine, (3) agoniste entier et (4) qui passe la barrière hémato-encéphalique.

En se basant sur les relations structure-activité décrites précédemment et sur la connaissance des interactions essentielles dans le site de liaison au récepteur (modélisation moléculaire) pour maintenir un caractère agoniste, une série de molécules dérivées du châssis benzodiazépine et du **SL-II-135** ont été conçues, synthétisées et évaluées au laboratoire.

Plusieurs stratégies ont été mises en place :

- Diminuer la taille des ligands pour avoir une molécule qui passe la barrière hémato-encéphalique. En se basant sur la connaissance de la poche du récepteur de l'ocytocine et sur les interactions connues des ligands avec le récepteur, la seule partie qui peut être réduite en taille est la chaîne attachée sur le cycle benzylique. La proline est remplacée par la glycine.

- Rigidifier la molécule pour caractériser et favoriser énergétiquement la conformation agoniste du ligand. Trois rigidifications ont été envisagées.
- Supprimer le thioamide afin d'étudier son influence sur la sélectivité et l'affinité des ligands sur les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine.
- Moduler la sélectivité en ajoutant un donneur de liaison H sur la proline et en faisant varier les substituants sur le cycle benzyle (Cl, Me, OMe, H).
- Concevoir des molécules avec des propriétés pharmacocinétiques qui lui permettent de passer la BHE (log D, PSA, log BB).

Toutes ces modifications vont nous permettre de comprendre les déterminants essentiels pour avoir un agoniste affiné et sélectif et d'aller vers des ligands avec des propriétés pharmacocinétiques qui permettent un passage de la BHE. Les 15 molécules envisagées sont reprises dans la Figure 70.

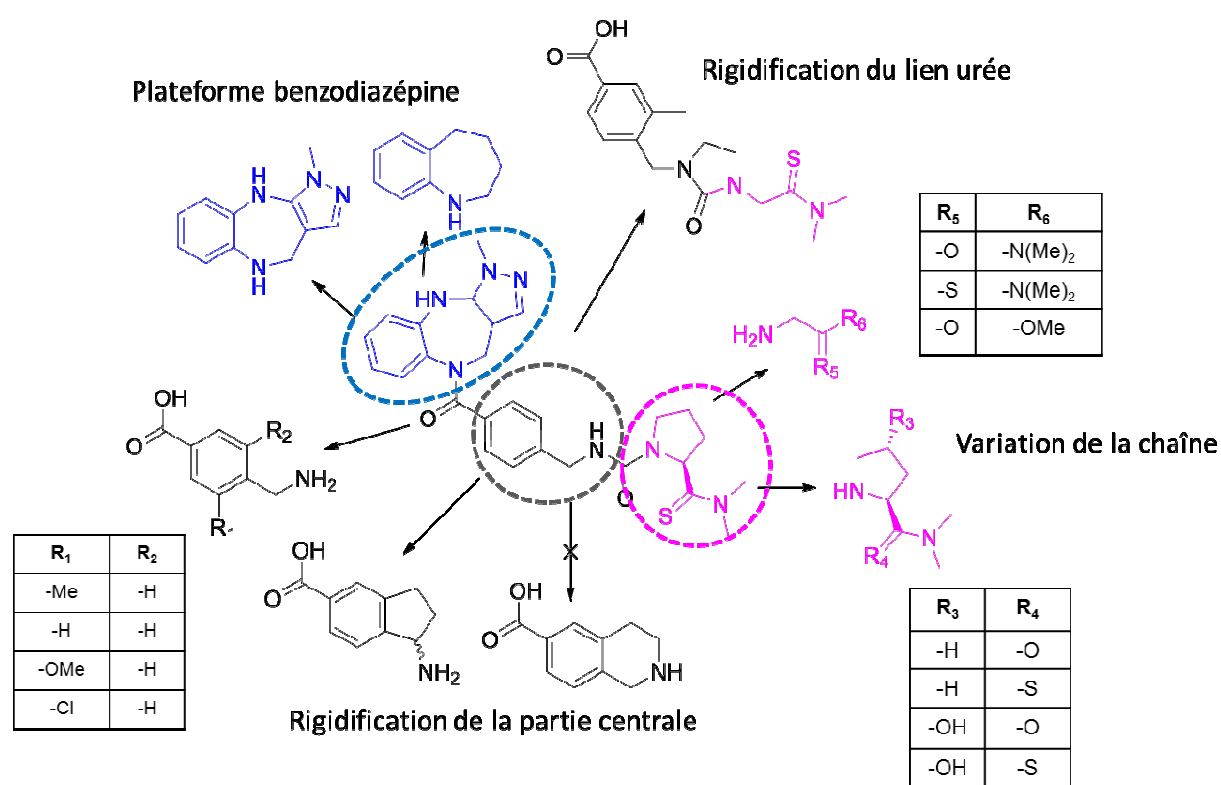


Figure 70 : Liste des molécules envisagées pour l'étude de relation structure-activité

En 2008, la société Ferring publie des agonistes du récepteur V₂ de la vasopressine dérivés d'un cycle benzazépine (Figure 71). Ces dérivés diffèrent légèrement du **Ferring-1** par la longueur de la chaîne et la nature du châssis benzazépine. Il était intéressant de comparer l'affinité et la fonction de nos ligands avec ceux de cette publication pour les récepteurs

vasopressine et oxytocine¹⁶⁰. Nous avons entrepris dans un premier temps la synthèse des molécules de références (**SL-II-135** et composé **3** de la Figure 71) et des différentes parties à assembler pour former les 15 molécules décrites dans la Figure 70.

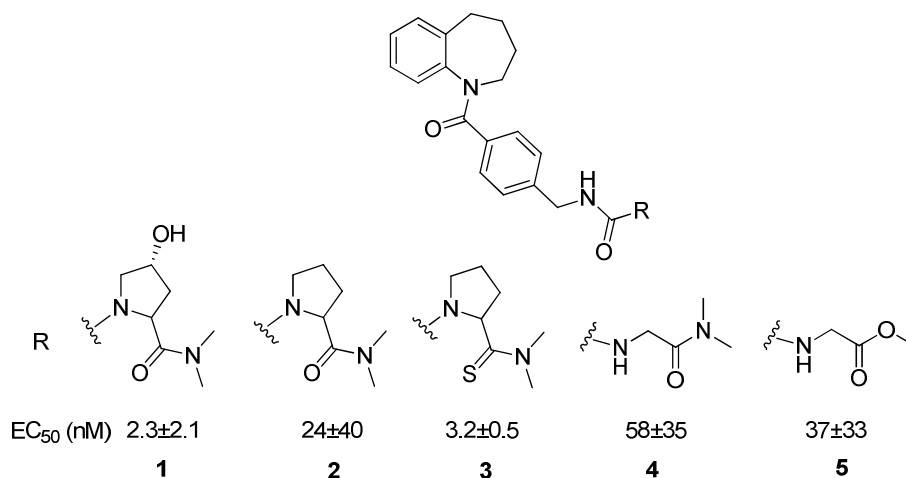
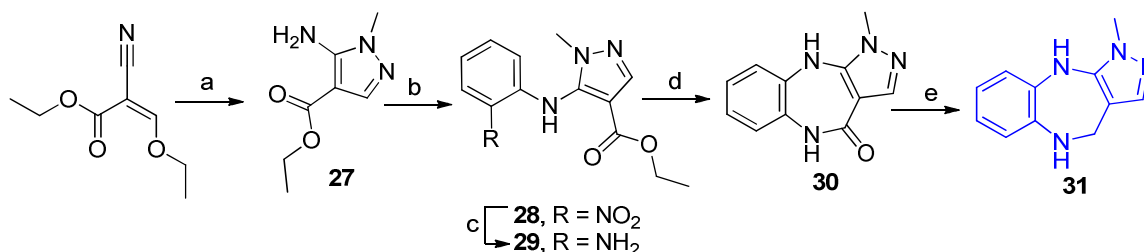


Figure 71 : Agonistes non-peptidiques du récepteur de la vasopressine V₂¹⁶⁰

II. Synthèse des dérivés du Ferring-1

1. Synthèse du châssis benzodiazépine

La synthèse de la benzodiazépine **30** s'effectue en 4 étapes (Figure 72). La condensation de la méthyle hydrazine sur le (Z) 2-cyano-3-éthoxyacrylate d'éthyle permet d'obtenir le composé **27** avec un rendement de 91%. La substitution nucléophile du fluoro-2-nitrobenzène par l'amine primaire du composé **27** permet d'obtenir le composé **28** avec un rendement de 77%. La réduction du groupement nitro en groupement amine primaire s'effectue avec un rendement quantitatif. Le composé **30** est obtenu par cyclisation thermique dans un mélange acide acétique/isopropanol (1/9, v/v). La réduction de l'amide permet d'obtenir la benzodiazépine **31** avec un rendement de 65%⁸².



(a) MeNHNH₂, EtOH, reflux, 1 nuit, 91% ; (b) fluoro-2-nitrobenzène, NaH, THF, 48 h, 77% ; (c) Fe, HCl 0.2N, EtOH, 1 nuit, quant ; (d) AcOH/iPrOH (1/9, v/v), tube scellé, 160 °C, 48 h, 68% ; (e) LiAlH₄, THF, reflux, 24 h, 65%.

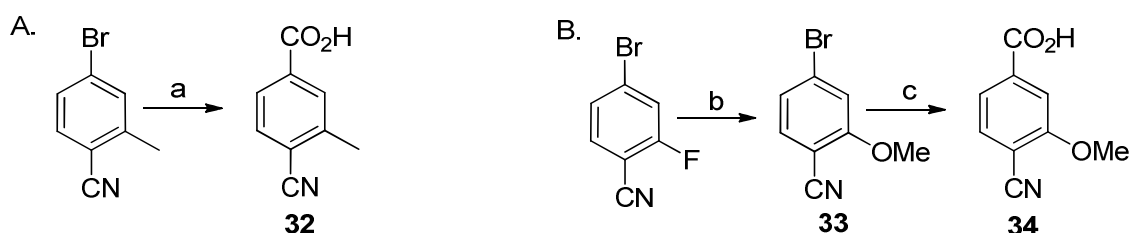
Figure 72 : Synthèse de la 1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine **31**

2. Synthèse des parties aromatiques centrales

Quatre parties aromatiques différentes ont été synthétisées portant différents substituants sur le cycle ou comportant un cycle aromatique rigidifié.

La synthèse de l'acide 4-cyano-3-méthylbenzoïque **32** est effectuée en une étape clé qui est une carboxylation (Figure 73.A). On part du 4-bromobenzonitrile pour former un organolithien qui est mis à réagir avec un flux de CO₂ gazeux généré à partir de carboglace pour obtenir le composé **32**. Cette étape de carboxylation qui va être employée de nombreuses fois par la suite a été optimisée¹⁶¹. Dans la publication de référence, cette réaction s'effectue en deux étapes : la formation de l'organolithien à -78 °C dans le THF puis le transfert du milieu réactionnel dans de la carboglace par l'emploi d'une canule. Cette étape cruciale est très sensible : si le milieu n'est pas assez dilué, la canule se bouche et l'eau présente dans la carboglace conduit à une hydrolyse. Pour pallier cette difficulté, un autre montage a été utilisé. Un flux de CO₂ qui passe dans un desséchant (chlorure de calcium anhydre) est mis à buller dans le milieu réactionnel. Les rendements sont similaires quelle que soit la méthode utilisée.

La synthèse de l'acide 4-cyano-3-méthoxybenzoïque **34** s'effectue en 2 étapes. La première étape est la substitution nucléophile aromatique du fluorure par le méthylate de potassium pour obtenir le composé **33** avec un rendement quantitatif. La seconde étape est la carboxylation du 4-bromo-2-fluorobenzonitrile pour obtenir l'acide correspondant **34** (Figure 73.B).

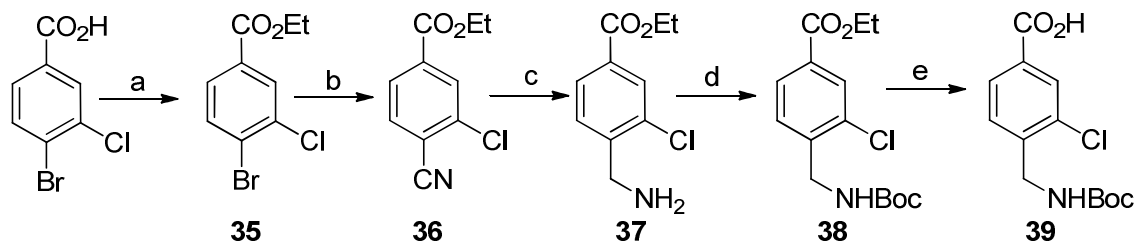


(a) i. nBuLi 2M dans le THF, THF, -78 °C, 2 h, ii. CO₂ (s), THF, 3 h, 68% ; (b) K₂CO₃, MeOH, 55 °C, 1 nuit, quant ; (c) i. nBuLi, THF, -78 °C, 2 h, ii. CO₂ (s), THF, 1 nuit, 30%.

Figure 73 : Synthèse des acides 4-cyano-3-méthylbenzoïque **32** et 4-cyano-3-méthoxybenzoïque **34**

La synthèse de l'acide benzoïque **39** portant un substituant chlorure sur la partie aromatique s'effectue en 5 étapes à partir de l'acide 4-bromo-3-chlorobenzoïque. Après protection de l'acide par estérification, la substitution nucléophile aromatique du bromure par le cyanure

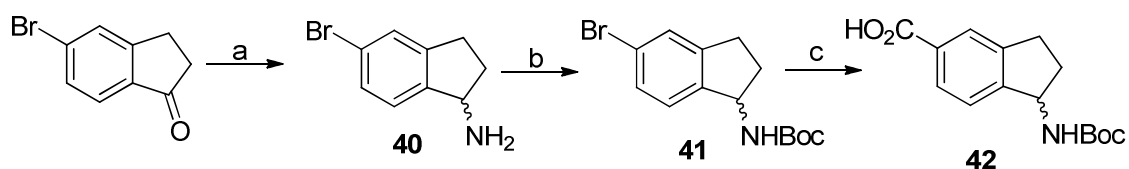
permet d'obtenir le composé **36** avec un rendement de 68%. Le groupement nitrile est réduit en amine primaire **37**. L'amine primaire est protégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyle et l'ester est hydrolysé pour obtenir l'acide correspondant **39** (Figure 74).



(a) SOCl_2 , EtOH, reflux, 1 nuit, 92% ; (b) CuCN, DMF, 60 °C, 8 h, 68% ; (c) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaBH_4 , MeOH, 1h30, 15% ; (d) Boc_2O , CH_2Cl_2 , 93% ; (e) NaOH, THF, 50 °C, 1 nuit, 21%.

Figure 74 : Synthèse de l'acide 4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)-3-chlorobenzoïque **39**

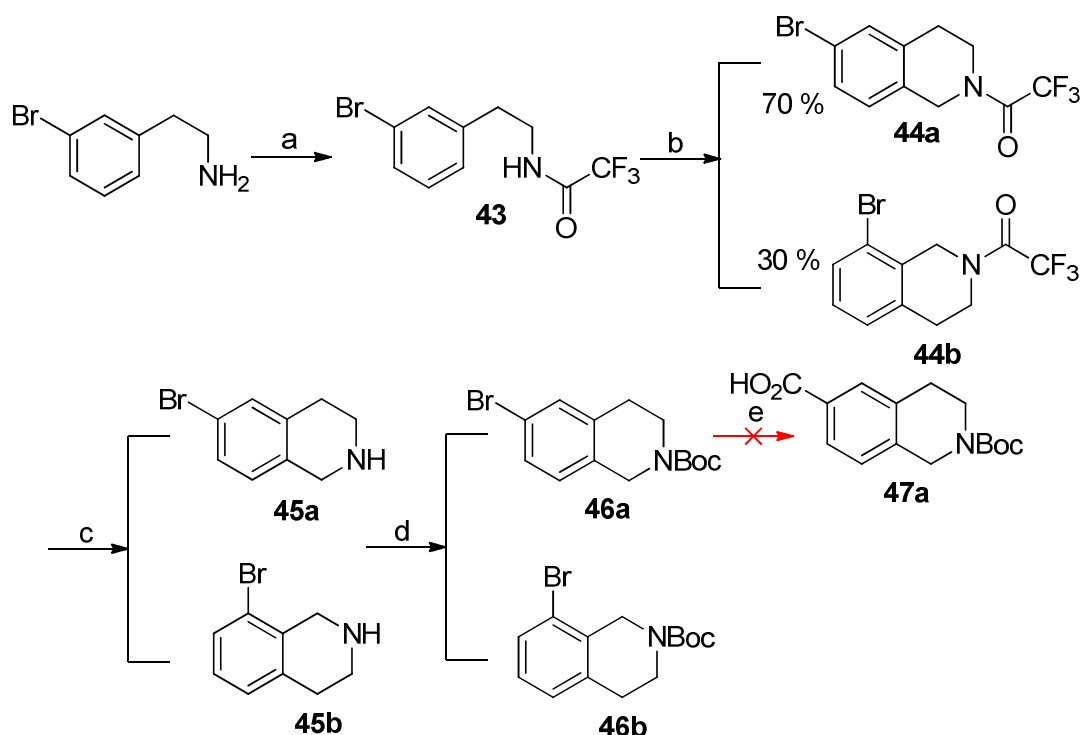
Les deux dérivés d'acide benzoïque rigidifiés sélectionnés sont un dérivé indène et un dérivé isoquinoléine. La synthèse du dérivé indène **42** s'effectue en 3 étapes. L'amination réductrice de la cétone en présence d'acétate d'ammonium, de cyanoborohydrure de sodium dans le méthanol permet d'obtenir l'amine primaire correspondante **40** avec un rendement quantitatif. L'amine primaire est protégée par un groupement Boc avec un rendement de 75%. La carboxylation du composé **41** permet d'obtenir l'acide **42** avec un rendement de 57% (Figure 75)



(a) NaBH_3CN , NH_4OAc , MeOH, MW, 100 °C, 15 min, quant ; (b) Boc_2O , THF, 1 nuit, 75% ; (c) i. $n\text{BuLi}$, THF, -78 °C, 2 h, ii. CO_2 (s), THF, 3 h, 57%.

Figure 75 : Schéma de synthèse de l'acide 1-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2,3-dihydro-1H-indène-5-carboxylique **42**

Pour préparer l'acide 2-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoléine-6-carboxylique **47a** (Figure 76), nous avons d'abord transformé la 2-(3-bromophényl)éthanamine en trifluoroacétamide **43** par traitement avec l'anhydride trifluoroacétique (rdt = 96%).



(a) TFAA, lutidine, CH_2Cl_2 , 1 nuit, 96% ; (b) paraformaldéhyde, H_2SO_4 , AcOH, 1 nuit, 83% ; (c) K_2CO_3 , MeOH/ H_2O (3/1, v/v), 1 nuit, 95% ; (d) Boc_2O , pyridine, DMAP, CH_2Cl_2 , 4 h, 82% ; (e) i. $n\text{BuLi}$, THF, -78°C , 5 h, ii. CO_2 (s), THF, 3 h, 0%.

Figure 76 : Première voie de synthèse du dérivé tétrahydroisoquinoléine 47a.

La réaction de Pictet-Spengler en présence de paraformaldéhyde dans l'acide acétique et l'acide sulfurique permet d'obtenir le régio-isomère voulu avec un pourcentage de 70%, l'autre régio-isomère n'étant formé qu'avec un rendement de 30%. La réaction de Pictet-Spengler passe ici par la formation d'un ion N-acyliminium plus électrophile qu'un simple iminium (Figure 77).

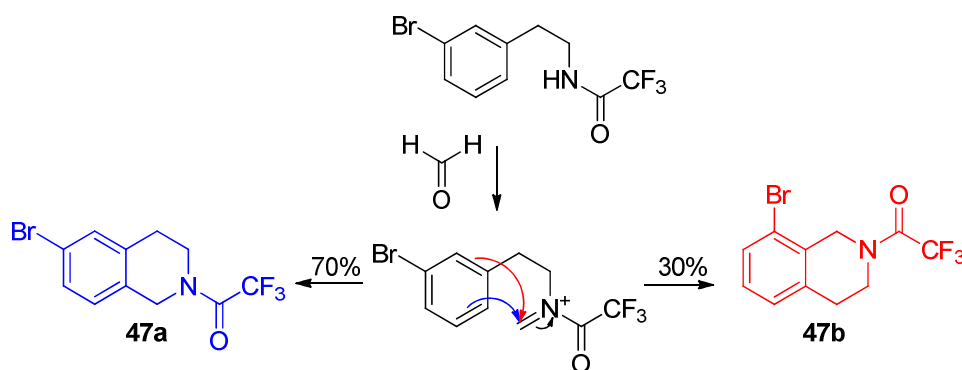
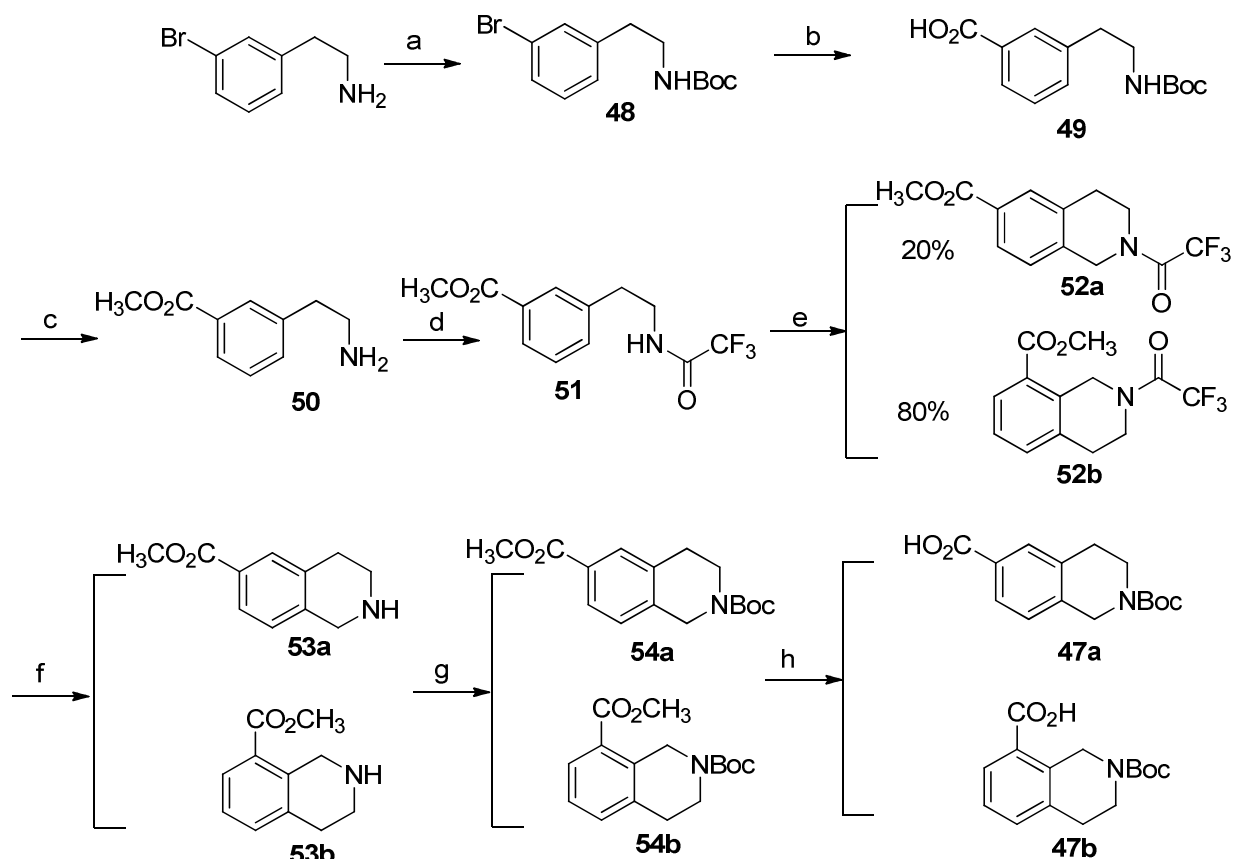


Figure 77 : Mécanisme réactionnel de la réaction de Pictet-Spengler

La séparation des deux régio-isomères n'est pas possible à cette étape et a été réalisée par la suite. Le trifluoroacétamide est hydrolysé et l'amine secondaire est protégée par un

groupement Boc. A cette étape, la séparation des deux régio-isomères est effectuée par HPLC semi-préparative. Une carboxylation est effectuée dans les conditions décrites précédemment sans pouvoir obtenir le composé **47a** (le produit de départ se décompose). Cette voie de synthèse est abandonnée.



(a) Boc_2O , Et_3N , THF, 3h30, quant ; (b) i. $n\text{BuLi}$, THF, -78°C , 5 h, ii. CO_2 (s), THF, 3 h, 41% ; (c) SOCl_2 , MeOH, 8 h, quant ; (d) TFAA, lutidine, CH_2Cl_2 , 1 nuit, 83% ; (e) paraformaldéhyde, H_2SO_4 , AcOH, 1 nuit, quant ; (f) K_2CO_3 , MeOH/ H_2O , (3/1, v/v), 5 h, 81% ; (g) pyridine, DMAP, Boc_2O , CH_2Cl_2 , 3 h, 95% ; (h) NaOH, THF/MeOH (1/1, v/v), reflux, 3 h, 81%.

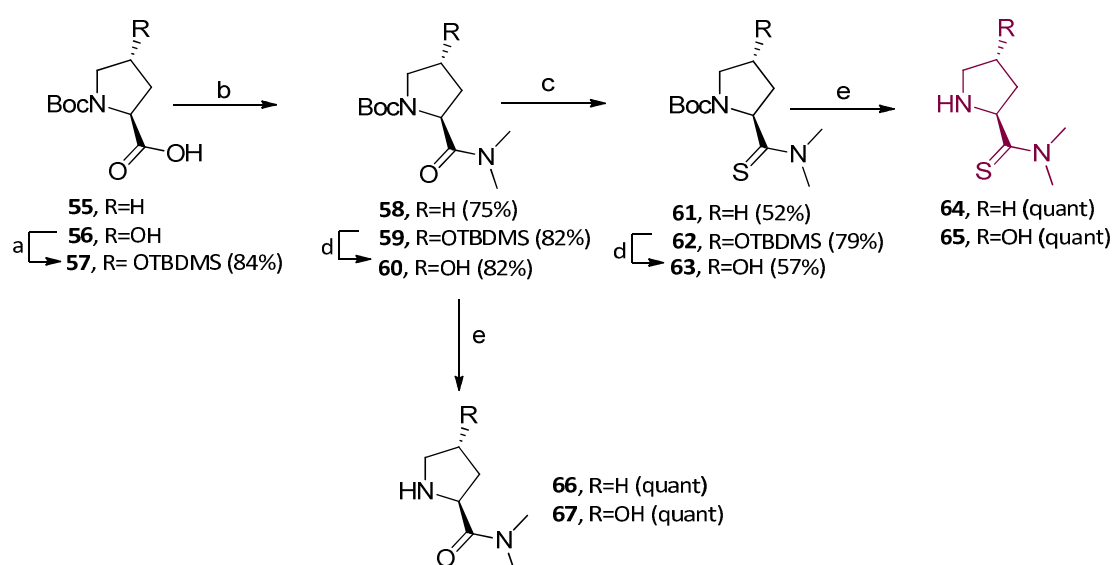
Figure 78 : Deuxième voie de synthèse du dérivé tétrahydroisoquinoléine **47a**.

Pour contourner le problème, nous avons choisi d'effectuer la carboxylation au départ avant la cyclisation (Figure 78). La 2-(3-bromophényl)éthanamine est protégée par un groupement Boc avec un rendement quantitatif. La carboxylation permet d'obtenir l'acide **49** avec un rendement de 41%. L'acide **49** est estérifié. L'ester **50** est acylé et cyclisé en utilisant les conditions décrites précédemment. Le changement de la substitution du cycle aromatique (brome remplacé par un ester) a complètement changé la régiosélectivité de la cyclisation. Le régio-isomère attendu **52a** est obtenu dans une proportion de 20% seulement (70% avec le brome comme substituant). Les deux régio-isomères ne sont pas séparables par HPLC

semi-préparative à cette étape. Le trifluoroacétamide est hydrolysé, l'amine est protégée par un groupement Boc et l'ester est hydrolysé pour obtenir les tétrahydroisoquinoléines **47a** et **47b** avec un rendement sur trois étapes de 61%.

3. Synthèse des chaînes

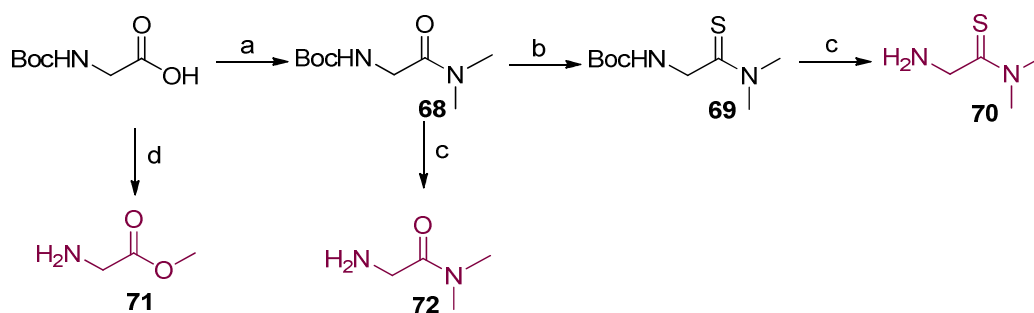
Les chaînes sont construites autour d'un dérivé proline ou d'un dérivé glycine. Boc-L-Proline-OH et 4-hydroxy-Boc-L-Proline-OH, préalablement protégée par un groupement TBDMS, sont transformées en amides par réaction avec la diméthylamine. L'amide correspondant est transformé en thioamide par le réactif de Lawesson avec des rendements compris entre 52% et 79%¹²³. Les groupements amine et/ou hydroxyle sont déprotégés pour obtenir les chaînes **64-67** (Figure 79).



(a) imidazole, TBDMSCl, DMF, 1 nuit ; (b) EDCI, HOBT, Et₃N, NMe₂, CH₂Cl₂, 1 nuit ; (c) Réactif de Lawesson, toluène, 1 nuit, 70 °C ; (d) TBAF, THF, 1 nuit ; (e) TFA /CH₂Cl₂ (1/1, v/v), 30 min.

Figure 79 : Préparation des chaînes dérivées proline 64-67

La synthèse des chaînes glycine amide **72** et glycine thioamide **70** s'effectue de la même manière que pour les chaînes proline. Le glycinate de méthyle **71** se synthétise en une étape par estérification de l'acide aminé correspondant (Figure 80).



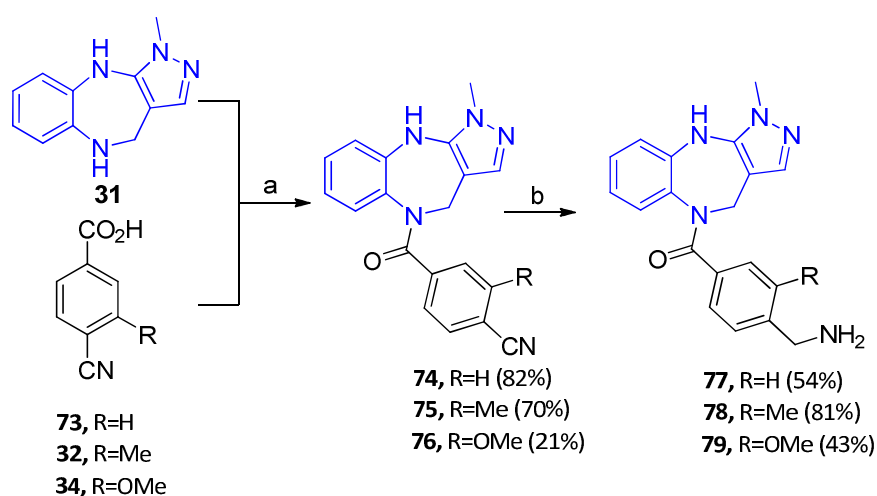
(a) EDCI, HOBT, Et₃N, NMe₂, CH₂Cl₂, 1 nuit, 46% ; (b) Réactif de Lawesson, toluène, 1 nuit, 70 °C, 63% ; (c) TFA/CH₂Cl₂ (1/1, 30 min), quant ; (e) SOCl₂, MeOH, quant.

Figure 80 : Préparation des chaînes dérivées proline 70-72

4. Assemblage des ligands

i. Synthèse des dérivés proline et glycine

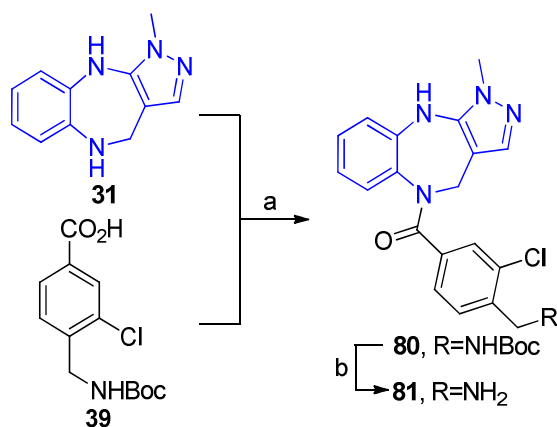
Les cyano-acide aromatiques **32**, **34** et **73** sont activés par le chlorure d'oxalyle et sont couplés à la benzodiazépine **31** avec un rendement de 75%. Le groupement cyano est réduit en amine à l'aide de borohydrure de sodium en présence de chlorure de cobalt hexahydraté pour obtenir les intermédiaires **77-79** prêts à être couplés aux différentes chaînes (Figure 81).



(a) i.(COCl)₂, DMF cat., CH₂Cl₂, 2 h, ii. Et₃N, CH₂Cl₂, 1 nuit ; (b) NaBH₄, CoCl₂.6H₂O, MeOH, 1 h.

Figure 81 : Synthèse des intermédiaires 77-79

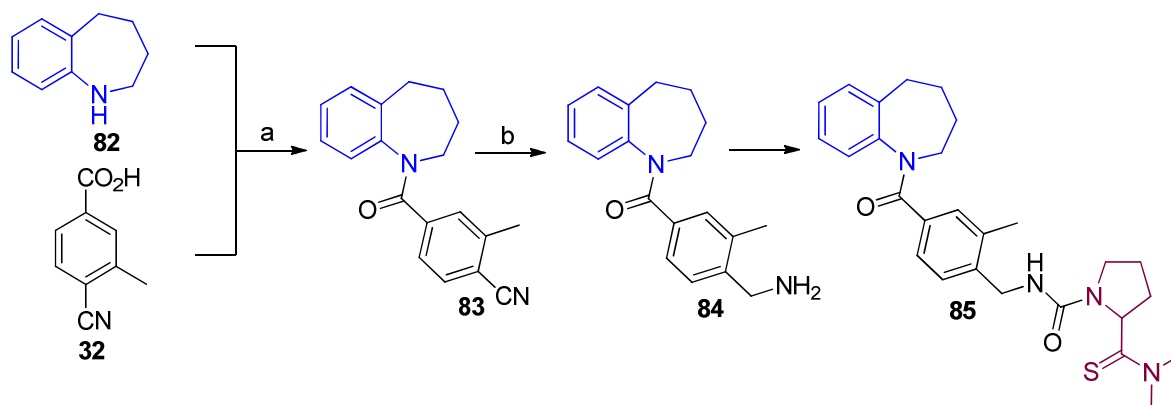
Puis nous avons couplé l'acide **39** à la benzodiazépine **31** par activation de l'acide *in situ* en présence de triphosgène et de 2,4,6-collidine pour obtenir l'intermédiaire **80** (Figure 82). Cette méthode permet de coupler des molécules qui ont des groupements protecteurs sensibles en milieu acide et sans racémisation¹⁶². L'amine est déprotégée dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v) pour obtenir l'intermédiaire **81** avec un rendement global de 21%.



(a) triphosgène, 2,4,6-collidine, THF, 1 h ; (b) TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v), 30 min, 21%

Figure 82 : Synthèse de l'intermédiaire chloré 81

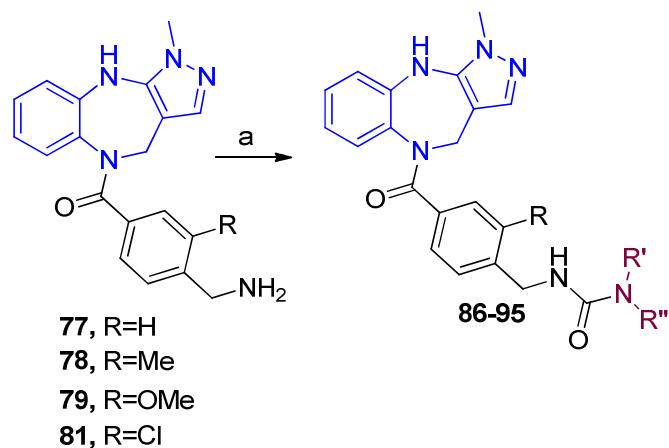
Le composé de référence **85** portant la benzazépine et décrit comme agoniste pour le récepteur de la vasopressine a été resynthétisé (Figure 83). Ce dérivé va servir de référence afin de comparer les résultats de tests d'affinités et de fonction avec ceux de la littérature. La benzazépine **82** (synthèse décrite dans la thèse de Marie-Céline Frantz) est couplée au dérivé acide **32** et le groupement cyano est réduit en amine primaire **84** en utilisant les conditions décrites précédemment. La formation d'un lien urée entre l'intermédiaire **84** et le dérivé proline **64** permet d'obtenir le composé **85** avec un rendement de 62%.



(a) i.(COCl)₂, DMF cat., CH₂Cl₂, 2 h, ii. pyridine, DMAP, CH₂Cl₂, 1 nuit, 76%; (b) NaBH₄, CoCl₂.6H₂O, MeOH, 1 h, 89%, (c) CDI, DIEA, composé **64**, DMF, 1 nuit, 62%.

Figure 83 : Synthèse du ligand de référence 85

Les différentes chaînes proline et glycine sont couplées aux intermédiaires **77-79** et **81** par formation d'un lien urée en présence de carbonyldiimidazole (CDI). Les ligands benzodiazépines **86-95** sont obtenus avec des rendements compris entre 27% et 67% et des puretés supérieures à 98% (Figure 84).



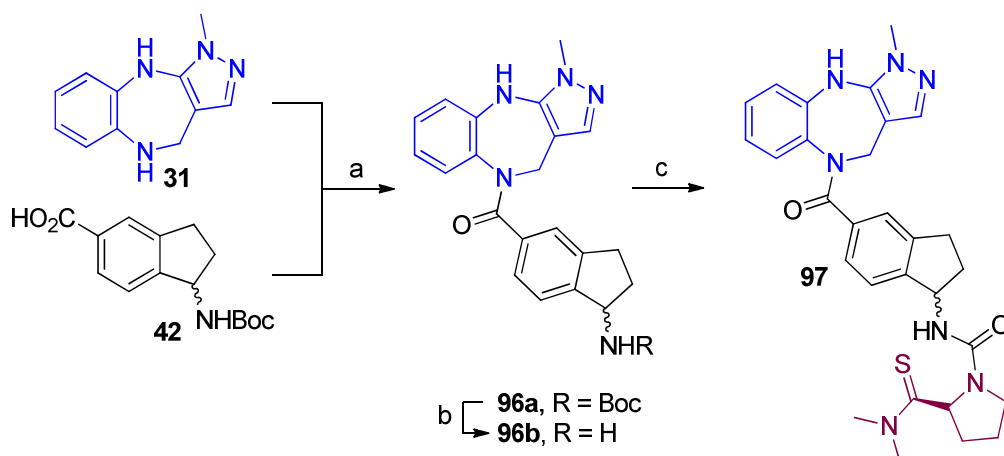
(a) composés **64-67** et **70-72**, CDI, DIEA, DMF, 1 nuit, 41-67%.

| Produit | Amine | R | Rendement (%) | Produit | Amine | R | Rendement (%) |
|-----------|-------|----|---------------|-----------|-------|-----|---------------|
| 86 | | Me | 41 | 91 | | Me | 67 |
| 87 | | Me | 66 | 92 | | Me | 66 |
| 88 | | Me | 56 | 93 | | H | 11 |
| 89 | | Me | 58 | 94 | | OMe | 22 |
| 90 | | Me | 65 | 95 | | Cl | 27 |

Tableau 18 : Synthèse des ligands benzodiazépines 86-95

ii. Synthèse des dérivés rigidifiés

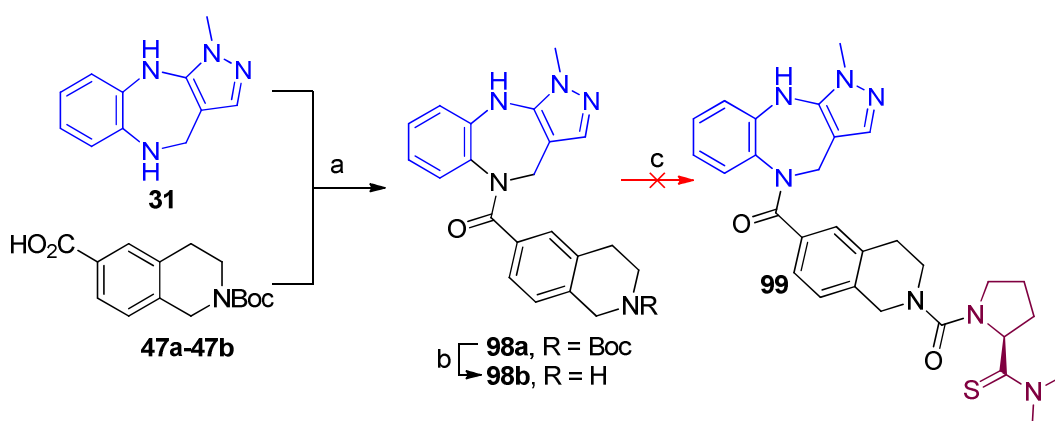
L'assemblage du dérivé rigidifié indène **97** s'effectue de la même manière que pour la synthèse du dérivé **85** avec un rendement global de 47% (Figure 84).



(a) triphosgène, 2,4,6-collidine, THF, 1 h, 65% ; (b) TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v), 30 min, quant ; (c) composé **64**, CDI, DIEA, DMF, 1 nuit, 73%.

Figure 84 : Synthèse du dérivé rigidifié indène **97**

L'assemblage du dérivé isoquinoléine est réalisé de la même manière que précédemment. Un couplage de la benzodiazépine **31** avec le mélange des deux régio-isomères **47a** et **47b** (seul **47a** est représenté par souci de clarté) est effectué, suivi de la déprotection de l'amine et du couplage avec le dérivé proline **64** par la formation d'un lien urée (Figure 85). De nombreuses conditions ont été évaluées sans succès pour former une urée entre ces deux amines secondaires. L'activation du dérivé proline **64** ou de l'intermédiaire isoquinoléine **47a** est effectuée soit avec le triphosgène soit avec du carbonyldiimidazole (Tableau 19). Malheureusement, quelles que soient les conditions expérimentales, le déplacement ne peut se faire. L'hypothèse est que l'attaque du nucléophile est impossible du fait de l'encombrement stérique ou du π -stacking entre la benzodiazépine et le cycle benzylique.



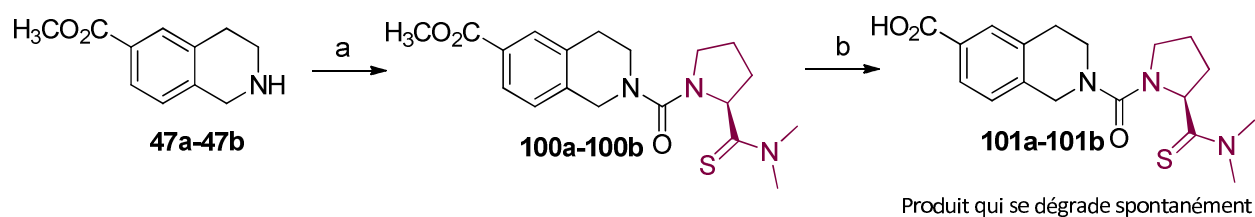
(a) triphosgène, 2,4,6-collidine, THF, 1 h, quant ; (b) TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v), 30 min, quant ; (c) cf tableau

Figure 85 : Première voie de synthèse du dérivé rigidifié isoquinoléine **99**

| Conditions c | Température | Composé activé | Rendement (%) |
|--|------------------------------------|----------------------|---------------|
| Triphosgène, DIEA, THF | MW, 120 °C, 20 min puis 2 j, 70 °C | Quinoléine 47 | 0 |
| CDI, DIEA, DMF | 2 j, 100 °C | Quinoléine 47 | 0 |
| Triphosgène, DIEA, DMAP, THF | MW, 120 °C, 20 min puis 2 j, 90 °C | Quinoléine 47 | 0 |
| CDI, MeI, ACN, Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂ ¹⁶³ | 24 h, TA | Proline 64 | 0 |

Tableau 19 : Optimisation des conditions de couplage de la chaîne proline **64** avec l'intermédiaire rigidifié

Une deuxième voie d'assemblage du dérivé isoquinoléine en couplant d'abord la chaîne proline puis la benzodiazépine est envisagée (Figure 86).



(a) triphosgène, DIEA, THF, 20 min, 120 °C, MW, 50% ; (b) LiOH, THF/H₂O (3/1, v/v), 3 h, 70%

Figure 86 : Deuxième voie de synthèse du dérivé isoquinoléine **101**

L'étape de formation du lien urée a été optimisée. Les meilleures conditions de couplage sont l'activation de l'amine secondaire **47a** avec le triphosgène et la DIEA dans le THF. Le déplacement est effectué avec l'amine secondaire du dérivé proline **64** sous irradiation aux microondes à 100 °C pendant 20 min. L'urée est obtenue avec un rendement de 50% (Tableau 20). L'hydrolyse de l'ester est effectuée avec l'hydroxyde de lithium dans un mélange THF/H₂O (2/1, v/v) avec un rendement de 70%. A cette étape, les deux régio-isomères peuvent être séparés et identifiés par étude RMN.

| Conditions a | Température | Composé activé | Rendement (%) |
|---|--------------------|----------------------|---------------|
| CDI, DIEA, DMF | 1 nuit, TA | Quinoléine 47 | 0 |
| CDI, K ₂ CO ₃ , DMF | MW, 100 °C, 10 min | Quinoléine 47 | 0 |
| Triphosgène, DIEA, THF | MW 20 min 100 °C | Quinoléine 47 | 50 |
| Triphosgène, DIEA, THF | 24h TA | Proline 64 | 30 |

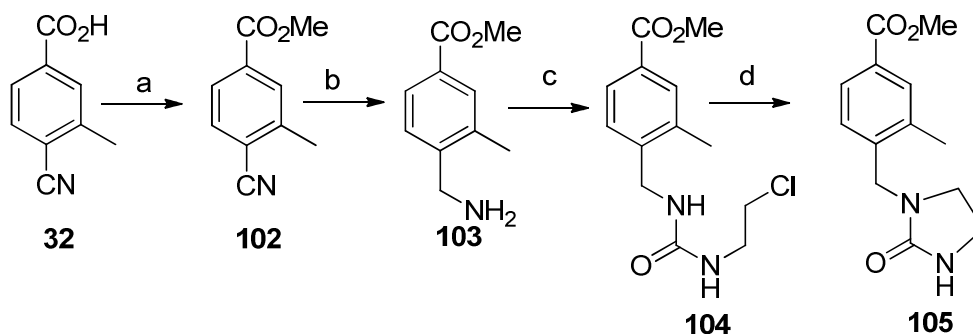
Tableau 20 : Optimisation des conditions de couplage du dérivé proline **64** avec l'isoquinoléine **47**

Le problème rencontré est une dégradation du composé **101** au bout de quelques jours à température ambiante. L'analyse LC-MS montre la coupure du lien urée. L'instabilité du produit ne nous permet pas de continuer la synthèse du dérivé rigidifié isoquinoléine.

iii. Synthèse du dérivé urée cyclisé

La synthèse du dérivé benzodiazépine urée **111** s'effectue de manière différente des autres dérivés (Figure 87). L'acide **32** est estérifié puis le groupement cyano est réduit en

groupement amine primaire pour obtenir le composé **103** avec un rendement de 76%. L'addition nucléophile de l'amine primaire **103** sur le 1-chloro-2-isocyanatoéthane permet d'obtenir le composé **104** avec un rendement de 91%.



(a) i. SOCl_2 , CH_2Cl_2 , 2 h, reflux, ii. MeOH, 2 h, 67% ; (b) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaBH_4 , MeOH, 1 h, 76% ; (c) 1-chloro-2-isocyanatoethane, Et_3N , CH_2Cl_2 , 30 min, 91% ; (d) NaH, THF, 5 h, 66%.

Figure 87 : Synthèse du dérivé urée cyclisée **105**

Deux composés peuvent se former par substitution du chlorure : soit l'oxazolidin-2-imine **106** par attaque de l'oxygène, soit l'imidazolidin-2-one **105** par attaque de l'azote (Figure 88).

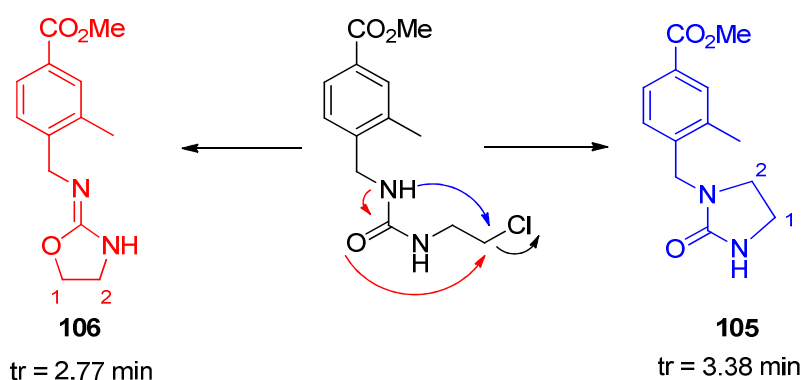


Figure 88: Mécanisme de formation de l'urée **105** versus de l'oxazolidine **106**

Les conditions de cyclisation ont été optimisées pour sélectivement ne former que de l'imidazolidin-2-one **105**. Différentes bases et conditions de température ont été essayées. La cyclisation en présence de DBU dans l'acétonitrile en chauffant à 65 °C pendant une nuit conduit uniquement à la formation du dérivé oxazolidin-2-imine **106**. L'utilisation de bases plus fortes comme NaH ou KOH en présence de TBAB permet la formation uniquement de l'imidazolidin-2-one **105**.

| Conditions | Tr (min) | Rendement (%) |
|---|----------|---------------|
| 2 eq DBU, acétonitrile, 65 °C, 16 h | 2.77 | 34 |
| 2 eq NaH, THF, 1 nuit, TA | 3.38 | 50 |
| 1.25 eq KOH, 0.2 eq TBAB, THF, 1 nuit, TA | 3.38 | 44 |

Tableau 21: Optimisation de la formation de l'urée cyclisée **105**

Les meilleurs rendements sont obtenus en utilisant NaH dans le THF (Tableau 21). Les deux produits ont pu être identifiés par analyse RMN (Figure 89). Les protons portés par C1 et C2 (Figure 89) n'ont pas le même déplacement chimique dans les deux composés : 3.35 ppm et 3.48 ppm dans un cas et 3.69 ppm et 4.22 ppm dans l'autre. Les valeurs voisines relevées pour la première molécule laissent à présager qu'il s'agit de l'imidazolidin-2-one **105**. Les spectres HMBC et HSQC nous ont permis de valider cette hypothèse. Le spectre HMBC montre que le C1H₂ de la molécule **105** est corrélé avec le CH₂ benzylique. Ce couplage hétéro nucléaire ne peut être observé théoriquement que pour l'imidazolidin-2-one **105**.

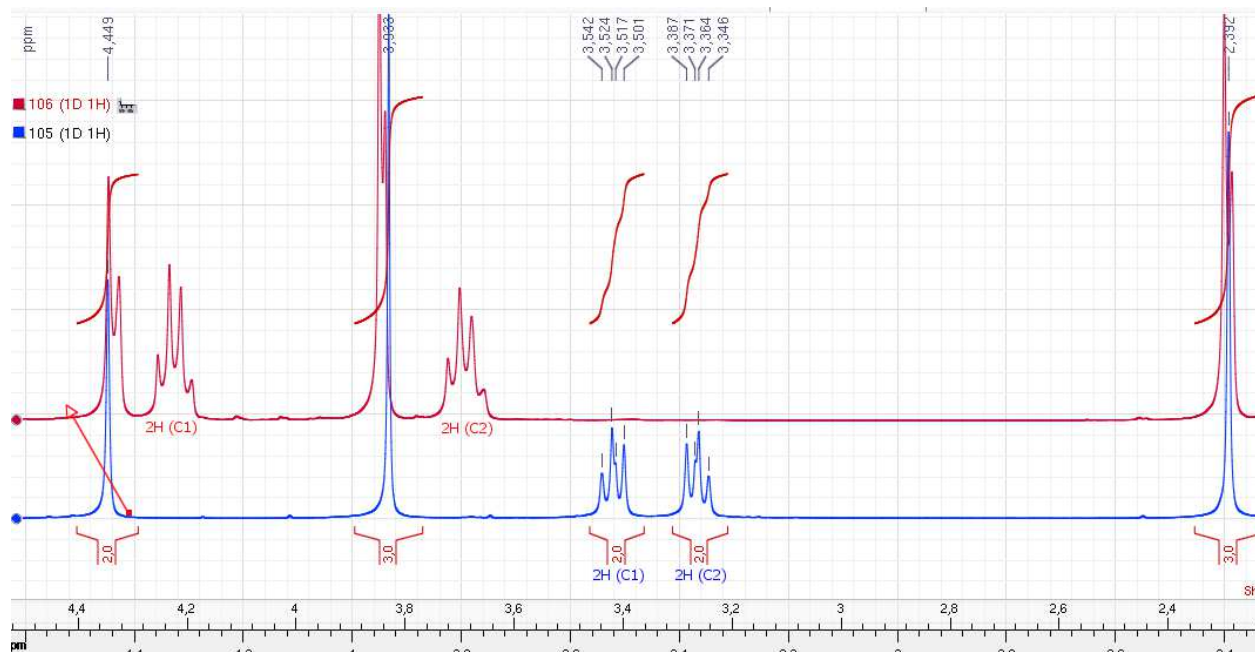
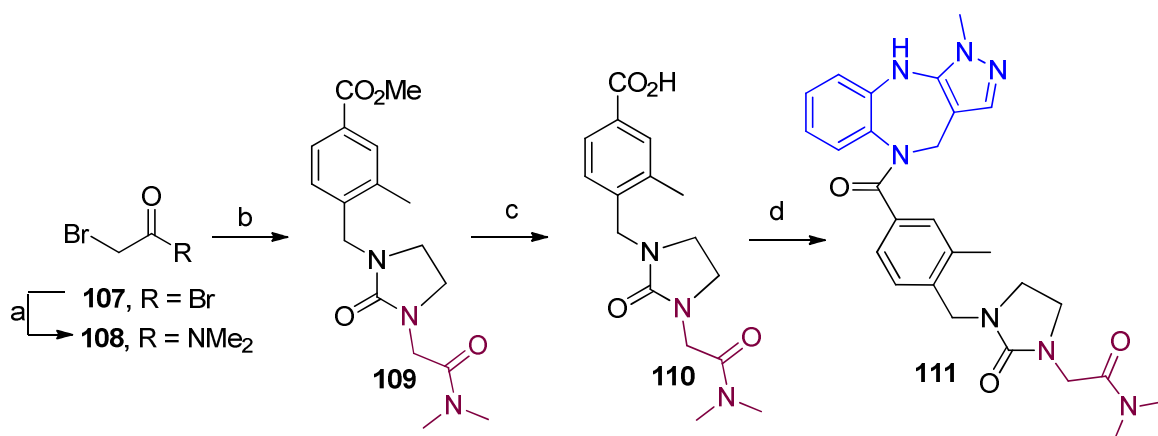


Figure 89 : Spectre RMN du proton des molécules **105** et **106** (CDCl₃, Bruker, 400 MHz)

Une fois le composé **105** caractérisé, le bromo-N,N-diméthylacetamide **108** est obtenu à partir du bromure de 2-bromoacétate **107** avec un rendement de 71% et est directement engagé dans une réaction de substitution nucléophile pour obtenir l'urée cyclisée bifonctionnée **109** avec un rendement de 10%. L'ester est hydrolysé et l'acide **110** est couplé à la benzodiazépine **31** afin d'accéder au composé **111** avec un rendement de 23% (Figure 90).



(a) NMe₂ (40 % dans H₂O), CH₂Cl₂, 3 h, 71% ; (b) NaH, composé **105**, THF, 5 h, 70 °C, 10% ; (c) LiOH, THF/H₂O (2/1, v/v), 1 nuit, 10% ; (d) composé **31**, triphosgène, 2,4,6-collidine, THF, 1 nuit, 23%.

Figure 90 : Synthèse du dérivé urée cyclisé **111**

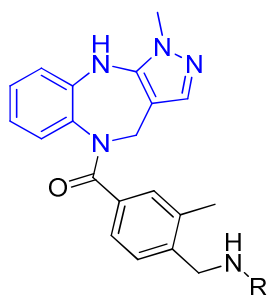
III. Affinité, sélectivité et fonction pour les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine

Les constantes d'affinités des 13 molécules synthétisées ainsi que des quatre dérivés de référence préparés par Marie-Céline Frantz et Stéphanie Loison sont mesurées par des tests de liaison par TR-FRET sur les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V₂ et sur le récepteur de l'ocytocine. Les mesures des IC₅₀ et des EC₅₀ sont effectuées par mesure du signal calcique sur les lignées OXTR sauvage et V_{1a}R-SNAP-Tag.

1. Ligands de référence

i. Affinité

Le **Ferring-1** n'est pas du tout sélectif. Il montre des affinités du même ordre de grandeur pour le récepteur de la vasopressine V_{1a} et pour le récepteur de l'ocytocine (K_i de 196 et 141 nM respectivement). Le **WAY-267464** n'est également pas sélectif mais montre des affinités meilleures de l'ordre de la dizaine de nanomolaire pour OXTR et V_{1a}R (K_i de 12.5 et 30.5 nM respectivement). Les troncatures du Ferring-1 mettent en évidence que la coupure du lien thioamide enlève toute sélectivité pour le récepteur de l'ocytocine par rapport au récepteur de la vasopressine V_{1a}. On passe d'un K_i de 1253 nM (**SL-II-135**) à des K_i compris entre 86 et 112 nM (composés **112-114**) pour le récepteur de la vasopressine V_{1a} (Tableau 22).

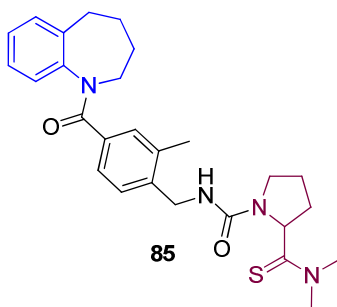


| Nom | | Affinité _a | V _{1a} R | | Affinité _a | V ₂ R | | OXTR | | |
|------------|--|-----------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|------------------|---------------------|-----------------|
| | | | Ago ^b | Antago ^c | | Ago ^b | Antago ^c | Ago ^b | Antago ^c | |
| Ferrin g-1 | | 196±67 | ns ^d | 8±4 | >1000 | nd ^f | nd ^f | 141 | 28±11 (84%) | ns ^e |
| WAY2 67464 | | 12.5±1.5 | ns ^d | 7±7 | >1000 | nd ^f | nd ^f | 30.5±6.5 | 3±0 (40%) | ns ^e |
| SL-II-135 | | 1253±169 | ns ^d | 100±0 | 1666±850 | nd ^f | nd ^f | 226±75 | 55±7 (52%) | ns ^e |
| 112 | | 98 | ns ^d | 5±5 | >1000 | nd ^f | nd ^f | 201 | ns ^d | 325±106 |
| 113 | | 86 | ns ^d | 6±4 | >1000 | nd ^f | nd ^f | 172 | ns ^d | 700±0 |
| 114 | | 112 | ns | 8±4 | >1000 | nd | nd | 77 | ns | 240±14 |

^a Les valeurs de K_i sont exprimées en nM et sont déterminées par TR-FRET sur cellules exprimant les récepteurs de la vasopressine V_{1a}, V₂ et de l'ocytocine marqués en utilisant la technologie SNAP-tag et incubés en présence d'un ligand fluorescent marqué au DY647 (20 nM) et en concentration croissante de compétiteurs. Les valeurs correspondent à la moyenne ±SEM d'une ou deux déterminations indépendantes. ^b Les valeurs d'EC₅₀ sont exprimées en nM, accompagnées de l'effet maximal mesuré en pourcentage par rapport à la réponse maximale de l'OT et de l'AVP et correspondent à la moyenne ±SEM de deux détermination indépendantes. ^c Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en nM et correspondent à la moyenne ±SEM de deux détermination indépendantes. ^d ns (non significatif) pour 5-10% de réponse à 1 μM par rapport à la stimulation maximale de l'agoniste endogène. ^e ns (non significatif) pour 5-10% d'inhibition de la réponse induite par l'agoniste endogène à [ligand]=1 μM ^f nd (non déterminé).

Tableau 22 : Affinité et fonction des composés de références

Le composé **85** (Tableau 23) montre une affinité préférentielle pour le récepteur de la vasopressine V₂ comme décrit dans la littérature mais avec une valeur de K_i plus faible (275 nM contre 3.2±0.5 nM).



| Nom | V _{1a} R | | | V ₂ R | | | OXTR | | |
|-----------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|
| | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c |
| 85 | 1615 | ns ^d | 240±85 | 275 | nd ^f | nd ^f | 1841 | 190±57 (58%) | ns ^e |

^a Les valeurs de K_i sont exprimées en nM et sont déterminées par TR-FRET sur cellules exprimant les récepteurs de la vasopressine V_{1a}, V₂ et de l'ocytocine marqués en utilisant la technologie SNAP-tag et incubés en présence d'un ligand fluorescent marqué au DY647 (20 nM) et en concentration croissante de compétiteurs. Les valeurs correspondent à la moyenne ±SEM d'une ou deux déterminations indépendantes. ^b Les valeurs d'EC₅₀ sont exprimées en nM, accompagnées de l'effet maximal mesuré en pourcentage par rapport à la réponse maximale de l'OT et de l'AVP et correspondent à la moyenne ±SEM de deux déterminations indépendantes. ^c Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en nM et correspondent à la moyenne ±SEM de deux déterminations indépendantes. ^d ns (non significatif) pour 5-10% de réponse à 1 μM par rapport à la stimulation maximale de l'agoniste endogène. ^e ns (non significatif) pour 5-10% d'inhibition de la réponse induite par l'agoniste endogène à [ligand]=1 μM ^f nd (non déterminé).

Tableau 23 : Affinité et fonction du composé de référence 85

ii. Fonction

Les deux molécules décrites dans la littérature (**Ferring-1** et **WAY-267464**) sont agonistes pour le récepteur de l'ocytocine avec respectivement des EC₅₀ de 28±11 nM et 3±0 nM et des pourcentages de réponse de 84% et 24%. Notre molécule de référence du laboratoire, le **SL-II-135** à une EC₅₀ de 55±7 nM avec un pourcentage de réponse de 52%. Les trois tronçatures (composés **112-114**) sont antagonistes : la coupure du lien thioamide enlève toute activité agoniste pour OXTR. Le composé de référence **85** a également une activité agoniste modérée sur OXTR. Toutes ces molécules sont des antagonistes puissants pour le récepteur de la vasopressine V_{1a} avec des valeurs d'IC₅₀ comprises entre 5 et 8 nM (sauf pour le **SL-II-135** et le composé **85**). Ces valeurs sont en accord avec les valeurs de la littérature et sont un point de comparaison avec les valeurs obtenues pour les molécules issues des études de relations structure-activité.

2. Ligands avec modulation de la chaîne

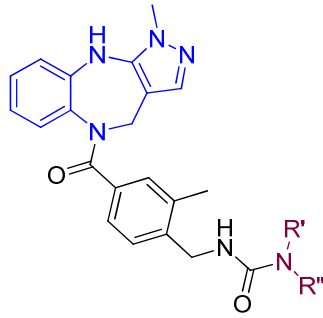
i. Affinité

Les valeurs d'affinité et de fonction sont données dans le Tableau 24. Le remplacement du thioamide par un amide enlève toute affinité du ligand pour les trois sous-types de récepteur (molécule **87**). La faible différence d'électronégativité entre le soufre et le carbone entraîne un transfert de charge de l'azote vers le soufre dans les thioamides. Une meilleure rotation autour de la liaison C-N est donc retrouvée dans les thioamides par rapport aux amides. Cette plus grande flexibilité peut expliquer l'augmentation de l'affinité des ligands thioamides comparés aux ligands amides.

L'ajout d'un hydroxyle sur la proline (composé **88**) améliore d'un facteur 10 l'affinité du ligand pour le récepteur OXTR avec un K_i de 26 nM. Malheureusement le composé **88** se fixe également sur le récepteur de la vasopressine V_2 avec un K_i de 64 nM et sur V_{1a} avec un K_i de 895 nM. Le groupement hydroxyle est un donneur de liaisons hydrogène et on peut supposer qu'il permet d'augmenter l'affinité du ligand à la fois pour $V_{1a}R$ et OXTR en créant une nouvelle interaction avec des molécules d'eau ou avec le récepteur¹⁶⁴. Le même ligand mais avec un amide à la place d'un thioamide (composé **89**) perd toute affinité également.

Le remplacement de la proline par une glycine (composé **91**) permet à nouveau d'augmenter d'un facteur 10 l'affinité pour le récepteur de l'ocytocine avec un K_i de 61 nM. La molécule **91** n'est à nouveau pas sélective, elle se fixe sur $V_{1a}R$ avec un K_i de 82 nM. La version amide de la glycine (composé **90**) ou la version ester (composé **92**) perdent en affinité pour tous les sous-types de récepteurs. On perd de la rigidité en remplaçant la proline par la glycine, ce qui peut expliquer une perte de sélectivité. L'augmentation de l'affinité vient peut-être du positionnement légèrement différent du thioamide qui peut sans doute former de nouvelles interactions avec le récepteur.

En conclusion, on perd toute affinité en remplaçant le soufre par de l'oxygène. Le thioamide est donc nécessaire pour garder une affinité pour ces récepteurs. L'ajout d'un groupement hydroxyle sur la proline ou le remplacement de la proline par la glycine permet d'augmenter en affinité mais on perd en sélectivité.



| Nom | | V _{1a} R | | | V ₂ R | | | OXTR | | |
|-----------|--|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|
| | | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c |
| Ferring-1 | | 196±67 | ns ^d | 8±4 | >1000 | nd ^f | nd ^f | 141 | 28±11 (84%) | ns ^e |
| WAY267464 | | 12.5±1.5 | ns ^d | 7±7 | >1000 | nd ^f | nd ^f | 30.5±6.5 | 3±0 (40%) | ns ^e |
| SL-II-135 | | 1253±169 | ns ^d | 100±0 | 1666±850 | nd ^f | nd ^f | 226±75 | 55±7 (52%) | ns ^e |
| 87 | | >1000 | ns ^d | 95±7 | >1000 | nd ^f | nd ^f | >1000 | 300±0 (34%) | ns ^e |
| 88 | | 895 | ns ^d | 150±0 | 64 | nd ^f | nd ^f | 26 | 28±4 (100%) | ns ^e |
| 89 | | >1000 | ns ^d | 225±148 | >1000 | nd ^f | nd ^f | 900 | 95±7 (63%) | ns ^e |
| 90 | | >1000 | ns ^d | 50±0 | >1000 | nd ^f | nd ^f | 417 | ns ^d | 775±35 |
| 91 | | 82 | ns ^d | 9±1 | >1000 | nd ^f | nd ^f | 61 | ns ^d | 600±0 |
| 92 | | >1000 | ns ^d | 110±42 | >1000 | nd ^f | nd ^f | 385 | ns ^d | >1000 |

^a Les valeurs de K_i sont exprimées en nM et sont déterminées par TR-FRET sur cellules exprimant les récepteurs de la vasopressine V_{1a}, V₂ et de l'ocytocine marqués en utilisant la technologie SNAP-tag et incubés en présence d'un ligand fluorescent marqué au DY647 (20 nM) et en concentration croissante de compétiteurs. Les valeurs correspondent à la moyenne ±SEM d'une ou deux déterminations indépendantes. ^b Les valeurs d'EC₅₀ sont exprimées en nM, accompagnées de l'effet maximal mesuré en pourcentage par rapport à la réponse maximale de l'OT et de l'AVP et correspondent à la moyenne ±SEM de deux déterminations indépendantes. ^c Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en nM et correspondent à la moyenne ±SEM de deux déterminations indépendantes. ^d ns (non significatif) pour 5-10% de réponse à 1 μM par rapport à la stimulation maximale de l'agoniste endogène. ^e ns (non significatif) pour 5-10% d'inhibition de la réponse induite par l'agoniste endogène à [ligand]=1 μM ^f nd (non déterminé).

Tableau 24 : Affinité et fonction des ligands 87-92

ii. Fonction

Il est très satisfaisant de constater que trois composés sur sept sont agonistes du récepteur de l'ocytocine. La proline est nécessaire pour garder le caractère agoniste, tous les composés dérivés de glycine passant antagonistes. Les dérivés thioamide/proline **SL-II-135** et **88** sont plus efficaces que les dérivés amide/proline **87** et **89**, sans doute à cause de leur meilleure affinité pour le récepteur. Enfin, le groupement hydroxyle incorporé sur la proline permet de gagner significativement en pourcentage de réponse. En effet, le composé **88** a une EC_{50} de 28 ± 4 nM avec une **réponse de 100%**.

Le composé **88** a donc un profil pharmacologique amélioré, agoniste puissant du récepteur de l'ocytocine et antagoniste modéré du récepteur de la vasopressine V_{1a} .

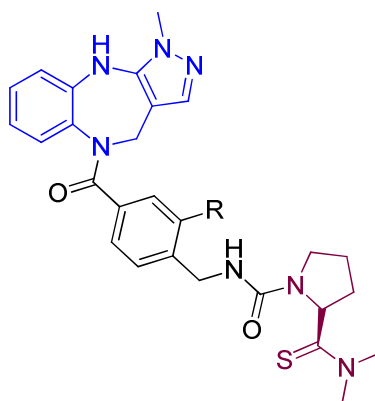
3. Ligands avec modulation des substituants sur le cycle benzylique

i. Affinité

Les valeurs d'affinité et de fonction sont données dans le Tableau 25. Lorsque l'on enlève le groupement méthyle (composé **93**) sur le cycle benzylique ou lorsqu'on le remplace par un groupement OMe (composé **95**), on perd toute affinité pour les trois sous-types de récepteurs. Le remplacement du méthyle par un chlore (composé **94**) augmente l'affinité du ligand d'un facteur 2 pour le récepteur de la vasopressine V_2 , les autres valeurs restant inchangées.

Le groupement OMe est sans doute trop gros et le ligand ne se fixe plus sur aucun des sous-types de récepteurs. Sans substituant, le ligand ne se fixe plus peut-être à cause d'une trop grande flexibilité ou d'une perte d'interaction. Les atomes de carbone et de chlore ont des tailles et lipophiles similaires. Par contre, le chlore a un effet électrodonneur sur le cycle benzénique. Cet effet inductif donneur peut éventuellement expliquer la perte de sélectivité.

En conclusion, le meilleur substituant sur le benzyle pour garder une bonne affinité et sélectivité pour le récepteur de l'ocytocine est le méthyle en position 3.



| Nom | R | V _{1a} R | | | V ₂ R | | | OXTR | | |
|-----------|------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|
| | | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c |
| SL-II-135 | -Me | 1253±169 | ns ^d | 100±0 | 1666±850 | nd ^f | nd ^f | 226±75 | 55±7 (52%) | ns ^e |
| 93 | -H | >1000 | ns ^d | 85±35 | >1000 | nd ^f | nd ^f | >1000 | ns ^d | >1000 |
| 94 | -Cl | >1000 | ns ^d | 260±198 | 734 | nd ^f | nd ^f | 385.7 | 43±4 (104%) | ns ^e |
| 95 | -OMe | >1000 | ns ^d | 40±14 | >10000 | nd ^f | nd ^f | >1000 | ns ^d | >1000 |

^a Les valeurs de K_i sont exprimées en nM et sont déterminées par TR-FRET sur cellules exprimant les récepteurs de la vasopressine V_{1a}, V₂ et de l'ocytocine marqués en utilisant la technologie SNAP-tag et incubés en présence d'un ligand fluorescent marqué au DY647 (20 nM) et en concentration croissante de compétiteurs. Les valeurs correspondent à la moyenne ±SEM d'une ou deux déterminations indépendantes. ^b Les valeurs d'EC₅₀ sont exprimées en nM, accompagnées de l'effet maximal mesuré en pourcentage par rapport à la réponse maximale de l'OT et de l'AVP et correspondent à la moyenne ±SEM de deux déterminations indépendantes. ^c Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en nM et correspondent à la moyenne ±SEM de deux déterminations indépendantes. ^d ns (non significatif) pour 5-10% de réponse à 1 µM par rapport à la stimulation maximale de l'agoniste endogène. ^e ns (non significatif) pour 5-10% d'inhibition de la réponse induite par l'agoniste endogène à [ligand]=1 µM ^f nd (non déterminé).

Tableau 25 : Affinité et fonction des ligands 93-95

ii. Fonction

La suppression du groupement méthyle sur la partie aromatique ou son remplacement par un OMe, supprime toute activité agoniste. Le remplacement du méthyle par un chlore (composé **94**) augmente légèrement l'EC₅₀ (43±4 nM) par rapport au **SL-II-135** de référence et considérablement le pourcentage de réponse qui passe à 100%.

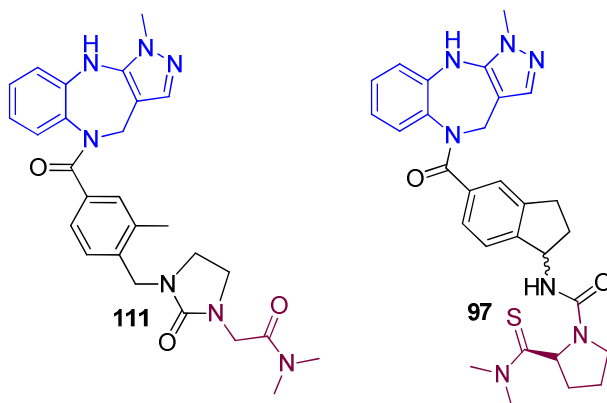
Le composé **94** a un profil pharmacologique amélioré, agoniste puissant du récepteur de l'ocytocine et antagoniste faible pour le récepteur de la vasopressine V_{1a}.

4. Ligands rigidifiés

i. Affinité

Les valeurs d'affinité et de fonction sont données dans le Tableau 26. La rigidification du lien urée permet de gagner en sélectivité. En effet l'affinité du composé **111** pour le récepteur de l'ocytocine est correcte avec une valeur de K_i de 321 nM. Les K_i pour les autres sous-types de

récepteurs sont supérieurs à 1 μM . Pour le composé rigidifié **97** comportant le bicycle indène, la valeur de K_i pour OTRX est de 321 nM avec une sélectivité de 2.8 pour $V_2\text{R}$ et $V_{1a}\text{R}$. La rigidification du lien urée permet d'augmenter la sélectivité ; cela nous renseigne donc sur la conformation active du ligand qui est proche du ligand urée. Le dérivé rigidifié indène **97** perd légèrement en sélectivité par rapport au **SL-II-135** sans doute dû à une conformation du ligand qui se fixe avec un peu plus d'affinité sur les autres sous-types de récepteurs.



| Nom | $V_{1a}\text{R}$ | | | $V_2\text{R}$ | | | OXTR | | |
|------------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|
| | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c |
| 111 | >1000 | ns ^d | 140±57 | >1000 | nd ^f | nd ^f | 321 | ns ^d | 700±0 |
| 97 | 935 | ns ^d | 70±28 | 918 | nd ^f | nd ^f | 321 | ns ^d | >1000 |

^a Les valeurs de K_i sont exprimées en nM et sont déterminées par TR-FRET sur cellules exprimant les récepteurs de la vasopressine V_{1a} , V_2 et de l'ocytocine marqués en utilisant la technologie SNAP-tag et incubés en présence d'un ligand fluorescent marqué au DY647 (20 nM) et en concentration croissante de compétiteurs. Les valeurs correspondent à une détermination. ^b Les valeurs d' EC_{50} sont exprimées en nM, accompagnées de l'effet maximal mesuré en pourcentage par rapport à la réponse maximale de l'OT et de l'AVP et correspondent à la moyenne \pm SEM de deux déterminations indépendantes. ^c Les valeurs d' IC_{50} sont exprimées en nM et correspondent à la moyenne \pm SEM de deux déterminations indépendantes. ^d ns (non significatif) pour 5-10% de réponse à 1 μM par rapport à la stimulation maximale de l'agoniste endogène. ^e ns (non significatif) pour 5-10% d'inhibition de la réponse induite par l'agoniste endogène à [ligand]=1 μM ^f nd (non déterminé).

Tableau 26 : Affinité et fonctions des composés rigidifiés 111 et 97

ii. Fonction

Les rigidifications entraînent une perte totale de l'agonisme pour le récepteur de l'ocytocine, les composés **97** et **111** passent antagonistes. La flexibilité du ligand est donc nécessaire pour activer le récepteur. On suppose que le ligand est dans une autre conformation que celle induite par les rigidifications pour se fixer sur le récepteur et l'activer.

5. Conclusion

En conclusion, ces études de relations structure-activité permettent d'affiner la caractérisation des déterminants essentiels pour garder une affinité et un caractère agoniste pour le récepteur de l'ocytocine.

- La flexibilité du ligand et la chaîne proline sont nécessaires pour garder un caractère agoniste.
- L'incorporation d'un groupement hydroxyle sur la chaîne proline (composé **88**) permet de gagner considérablement en affinité et en fonction au détriment de la sélectivité pour le récepteur de la vasopressine V₂.
- Le remplacement du groupement méthyle sur l'aromatique par un chlore (composé **94**) permet de gagner considérablement en fonction au détriment de la sélectivité pour le récepteur V₂.

Les mesures de fonction pour le récepteur de la vasopressine V₂ sont en cours. Le travail devra être poursuivi pour tenter de se débarrasser de la composante V₂ tout en conservant les avantages acquis.

IV. SL-II-135 et analogues : profil pharmacocinétique et pharmacodynamique - Agonisme biaisé.

1. Estimation du passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE)

Pour toutes les molécules synthétisées et les molécules de référence, une estimation du logP, logD et de la surface polaire est effectuée. Ces valeurs serviront à calculer le logBB qui est une valeur prédisant le passage de la BHE.

i. LogP

Le **LogP** est le coefficient de partage et permet de calculer expérimentalement le partage d'une molécule entre l'octanol et l'eau sous la forme neutre de la molécule. Une molécule hydrophobe va aller dans la phase organique (LogP>1). A l'inverse, une molécule hydrophile va aller dans l'eau (LogP<1). Lorsque LogP = 1, la molécule se partage identiquement entre les deux phases.

$$\text{LogP} = \text{Log} \left(\frac{[\text{octanol}]}{[\text{eau}]} \right)$$

ii. LogD

Le **LogD** est une mesure de LogP à un pH donné. Cette mesure prend donc en compte les formes neutres et chargées des molécules. Dans la zone de pH où les molécules sont neutres, $\log D = \log P$. Dans la zone de pH où les molécules sont ionisées, le logD devient fonction du LogP, du pH et du pKa.

Pour des bases, on exprime le logD avec l'équation suivante :

$$\text{LogD}_{(\text{pH})} = \log P - \log[1 + 10^{(\text{pKa}-\text{pH})}]$$

Pour des acides, on exprime le logD avec l'équation suivante :

$$\text{LogD}_{(\text{pH})} = \log P - \log[1 + 10^{(\text{pH}-\text{pKa})}]$$

iii. PSA

PSA (Å) pour Polar Surface Area, est l'aire de surface polaire qui permet de quantifier les contacts entre les groupements polaires (hydrophiles) et le milieu aqueux. La solubilité dans l'eau va augmenter avec la PSA.

iv. LogBB

Le **logBB** est le coefficient de partage théorique entre le sang et le cerveau¹⁶⁵. Il permet d'estimer le passage de la BHE par une molécule. Sa valeur peut être exprimée selon l'équation suivante.

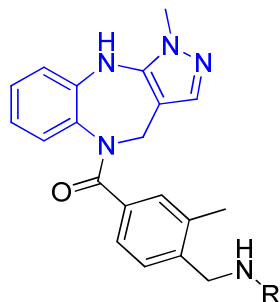
$$\text{LogBB} = \log \left(\frac{[\text{cerveau}]}{[\text{sang}]} \right)$$

Les valeurs expérimentales du LogBB sont comprises entre -2 et +1. Les composés dont le LogBB est supérieur à -0.3 passent bien la BHE alors que les composés dont le LogBB est inférieur à -1 ne passent pas bien la BHE. On exprime le LogBB en fonction de la PSA et du LogP :

$$\text{LogBB} = 0.133 - 0.0153\text{PSA} + 0.1522\text{CLogP}$$

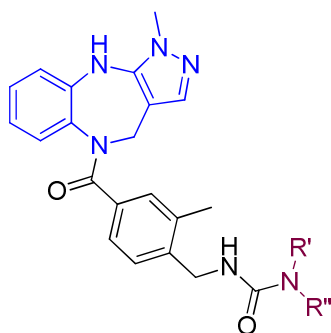
v. Calculs des mesures pharmacodynamiques

Les valeurs de logD, de logP et de PSA (Polar Surface Area) ont été estimées pour toutes les molécules synthétisées en utilisant le logiciel Marvin Sketch. Les valeurs sont présentées dans les tableaux 27, 28, 29 et 30.



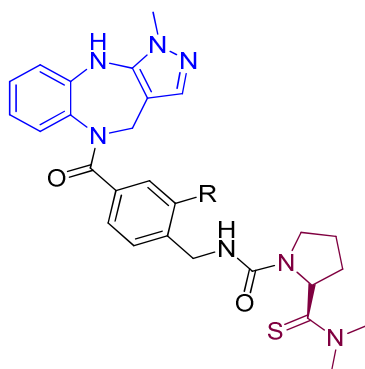
| Nom | R | MM (g/mol) | LogD calculé (pH =7.4) | LogP calculé | PSA (Å) | LogBB |
|-------------------|---|------------|------------------------|--------------|---------|-------|
| Ferring-1 | | 600.78 | 1.33 | 2.74 | 90.18 | -1.04 |
| WAY-267464 | | 581.66 | 2.69 | 2.71 | 127.40 | -1.41 |
| SL-II-135 | | 531.67 | 2.84 | 2.84 | 85.74 | -0.75 |
| 112 | | 444.53 | 2.62 | 2.62 | 82.50 | -0.73 |
| 113 | | 418.49 | 2.21 | 2.21 | 82.50 | -0.79 |
| 114 | | 389.45 | 2.10 | 2.10 | 79.26 | -0.76 |

Tableau 27 : Valeurs physico-chimiques théoriques des troncatures du Ferring-1



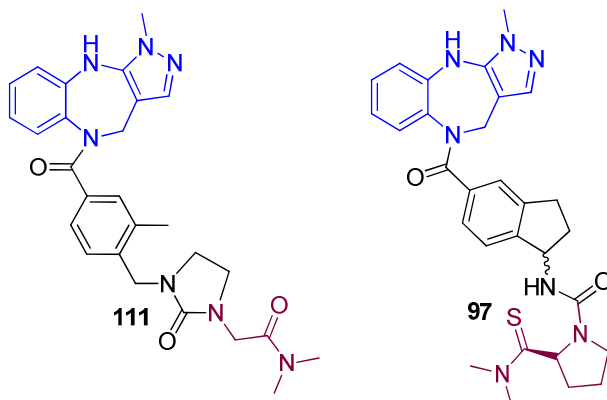
| Nom | | MM (g/mol) | LogD calculé (pH =7.4) | LogP calculé | PSA (Å) | LogBB |
|-------------------|--|------------|---------------------------|--------------|---------|-------|
| Ferring-1 | | 600.78 | 1.33 | 2.74 | 90.18 | -1.04 |
| WAY-267464 | | 581.66 | 2.69 | 2.71 | 127.40 | -1.41 |
| SL-II-135 | | 531.67 | 2.84 | 2.84 | 85.74 | -0.75 |
| 87 | | 515.61 | 1.39 | 1.39 | 102.81 | -1.22 |
| 88 | | 547.67 | 1.00 | 1.00 | 105.97 | -1.33 |
| 89 | | 531.60 | 0.80 | 0.80 | 123.04 | -1.63 |
| 90 | | 475.54 | 0.63 | 0.63 | 111.60 | -1.48 |
| 91 | | 491.61 | 1.36 | 1.36 | 94.53 | -1.11 |
| 92 | | 462.50 | 1.03 | 1.03 | 117.59 | -1.51 |

Tableau 28 : Valeurs physico-chimiques théoriques des dérivés 87-92



| Nom | R | MM (g/mol) | LogD calculé (pH =7.4) | LogP calculé | PSA (Å) | LogBB |
|-----------|------|------------|------------------------|--------------|---------|-------|
| SL-II-135 | -Me | 531.67 | 2.84 | 2.84 | 85.74 | -0.75 |
| 93 | -H | 517.64 | 2.32 | 2.32 | 85.74 | -0.82 |
| 94 | -Cl | 552.09 | 2.93 | 2.93 | 85.74 | -0.73 |
| 95 | -OMe | 547.67 | 2.16 | 2.16 | 94.97 | -0.99 |

Tableau 29 : Valeurs physico-chimiques théoriques des dérivés 93-95



| Nom | MM (g/mol) | LogD calculé (pH =7.4) | LogP calculé | PSA (Å) | LogBB |
|-----|------------|------------------------|--------------|---------|-------|
| 111 | 576.65 | 1.68 | 1.68 | 76.95 | -0.79 |
| 97 | 543.68 | 2.11 | - | 85.74 | -0.86 |

Tableau 30 : Valeurs physico-chimiques théoriques des dérivés rigidifiés 111 et 97

Il est nécessaire en premier lieu de rappeler que ce sont des valeurs calculées théoriques qui découlent de travaux de rationalisation antérieurs validés sur des séries chimiques qui peuvent être significativement différentes. Il convient donc de ne pas tirer de conclusions trop définitives de ces données, surtout des valeurs absolues. On peut cependant espérer que les tendances à la hausse ou à la baisse soient significatives. On constate que les valeurs

de LogBB des deux molécules de référence, le **Ferring-1** et le **WAY-267464**, sont nettement inférieures à 1, en accord avec leur faible lipophilie mesurée (Tableau 27). Plusieurs molécules synthétisées présentent un potentiel de pénétration cérébral amélioré avec un LogBB supérieur à -1.0. Le **SL-II-135** présente notamment un LogBB de -0.75 qui permet d'espérer une activité centrale. On peut voir que la substitution du noyau proline par une chaîne ouverte glycine ou l'ajout d'un groupement hydroxyle ou le remplacement du thioamide par un amide diminuent fortement le logBB (-1.22 à -1.64) (Tableau 28). Le passage de la BHE sera donc défavorisé avec ces composés. Par contre les rigidifications du squelette ou diverses substitutions sur le noyau aromatique central n'influent que marginalement sur le LogBB et sont donc des pistes à suivre pour améliorer le profil pharmacologique ciblé (Tableau 29, Tableau 30).

En conclusion, il est maintenant nécessaire de sélectionner la meilleure molécule et de tester expérimentalement le passage de la BHE *in vivo* sur souris. Ce test consiste à injecter à la souris le composé à tester et à doser dans le cerveau, la quantité de molécule qui s'y trouve par rapport à la périphérie. Cette étude est programmée dans un premier temps avec le composé **SL-II-135**.

2. Agoniste biaisé : activation des sous-types de protéine G

i. Voies de signalisation du récepteur de l'ocytocine

Lorsque l'on parle d'un agoniste de RCPG, il faut désormais pousser les investigations et préciser les voies de signalisation qu'il active ou pas. Un agoniste qui n'active que certaines voies est dit « biaisé ». En effet, il apparaît maintenant que la signalisation des RCPG est complexe : un récepteur peut activer plusieurs effecteurs dépendants ou non des protéines G, alors que différents agonistes peuvent activer différents effecteurs avec des efficacités variables. La complexité de la signalisation des RCPG provient du fait que ces récepteurs adoptent un panel de conformations induites ou stabilisées par des agonistes endogènes ou synthétiques. L'activation de différentes voies de signalisations dépendantes du type de ligand est appelé **sélectivité fonctionnelle**.

Le récepteur de l'ocytocine est couplé aux protéines G_q et G_i . Les voies d'activation des sous-unités de protéines G peuvent induire la même réponse ou des réponses différentes.

Les contractions utérines sont induites par les cellules myométriales à la fois par un couplage du récepteur de l'ocytocine avec G_{q-11} et avec la petite protéine G de la famille Rho¹⁶⁶.

Cependant des effets opposés peuvent aussi avoir lieu comme dans les cellules neuronales où OXTR inhibe (par une voie de signalisation PTX résistante) ou active (par une voie de signalisation PTX sensible) les canaux potassium¹⁶⁷. Dans les cellules embryonniques de foie HEK 293 transfectées avec OXTR le couplage à la protéine G_i est responsable de l'inhibition de multiplication cellulaire alors que le couplage à la protéine Pertussis (possible G_q) stimule la multiplication cellulaire¹⁶⁸.

Des ligands fonctionnellement sélectifs du récepteur de l'ocytocine seraient d'une grande aide afin d'identifier et de mieux comprendre les différentes voies de signalisation physiologiques et pourraient constituer des médicaments plus ciblés (notamment pour le traitement de l'autisme ou des cancers). Par exemple, dans le cas de tumeurs cancéreuses exprimant le récepteur de l'ocytocine, la signalisation G_i de OXTR inhibe la multiplication cellulaire et la migration des cellules. Un agoniste biaisé qui favoriserait le couplage G_i constituerait une possible voie thérapeutique pour ces tumeurs. L'atosiban a été décrit pour être sélectif de G_i et permet d'inhiber la croissance cellulaire de l'adenocarcinoma de la prostate *in vitro*¹⁶⁹ et du carcinoma des glandes mammaires chez la souris *in vitro* et *in vivo*^{170,171}. Nous allons étudier le profil agoniste de notre candidat initial, le **SL-II-135**.

ii. Mesure de l'activation des sous-types de protéines $G\alpha$ du récepteur de l'ocytocine

Le groupe de Bice Chini s'intéresse de près à l'activation des sous-types de protéine $G\alpha$ pour le récepteur de l'ocytocine¹⁷². Un test basé sur la technique de BRET a été utilisé afin de cribler différents ligands peptidiques du récepteur de l'ocytocine pour identifier leur capacité à activer les protéines G_q , G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_{oA} , G_{oB} et G_s (Figure 91.A).¹⁷³

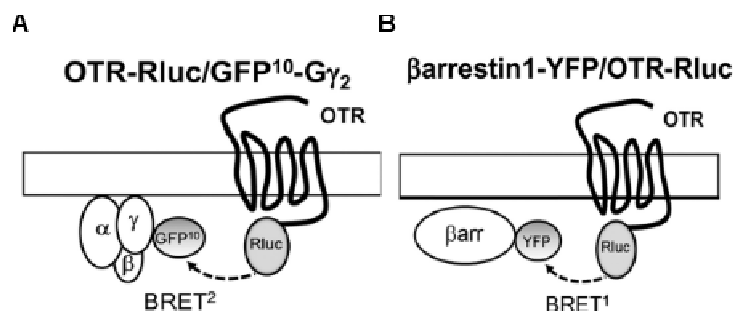
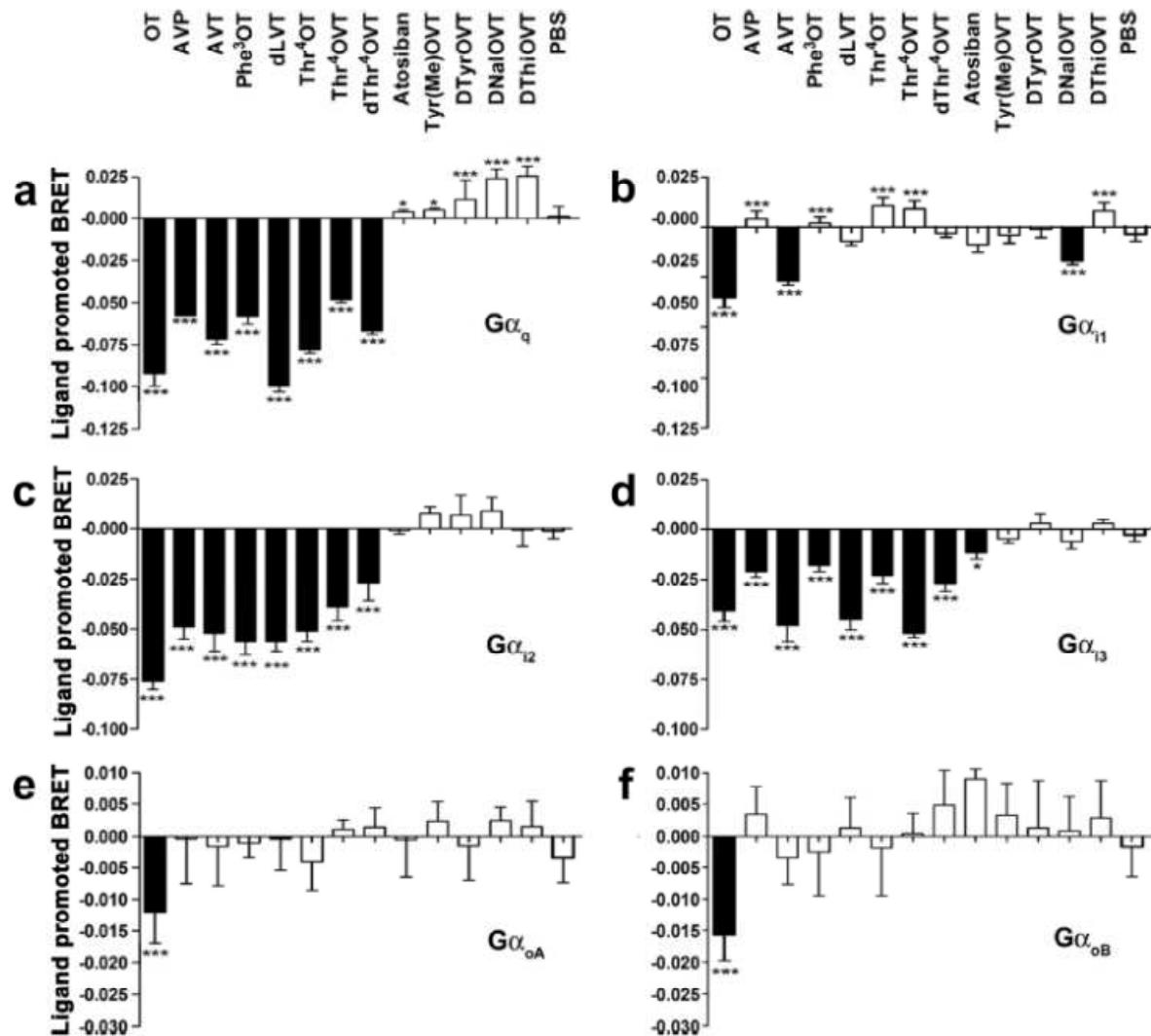


Figure 91 : Mesures de BRET (A) : Mesure de BRET de l'activation des complexes OT- $G\alpha\beta_1\gamma_2$ par l'activation des ligands ; (B) Mesure de BRET du recrutement des β -arrestines 1 et 2 par activation de OXTR

Le signal de BRET est mesuré entre RLuc (le donneur) et GFP (l'accepteur) introduits respectivement sur l'hélice α de la sous unité $G\alpha$ et sur la partie N-terminale du domaine de $G\gamma_2$ (GFP¹⁰- $G\gamma_2$). La fixation du ligand induit l'activation des protéines $G\alpha$ entraînant un

changement conformationnel du complexe hétérotrimérique de protéines G qui correspond à une diminution du ratio de BRET. Une mesure du recrutement des β -arrestines est également effectuée par mesure de BRET (Figure 91.B). Le signal de BRET est mesuré entre Rluc et YFP introduit respectivement sur la partie C-terminale de OXTR (OXTR-RLuc) et sur la β -arrestine (β -arrestine1-YFP et β -arrestine2-YFP).

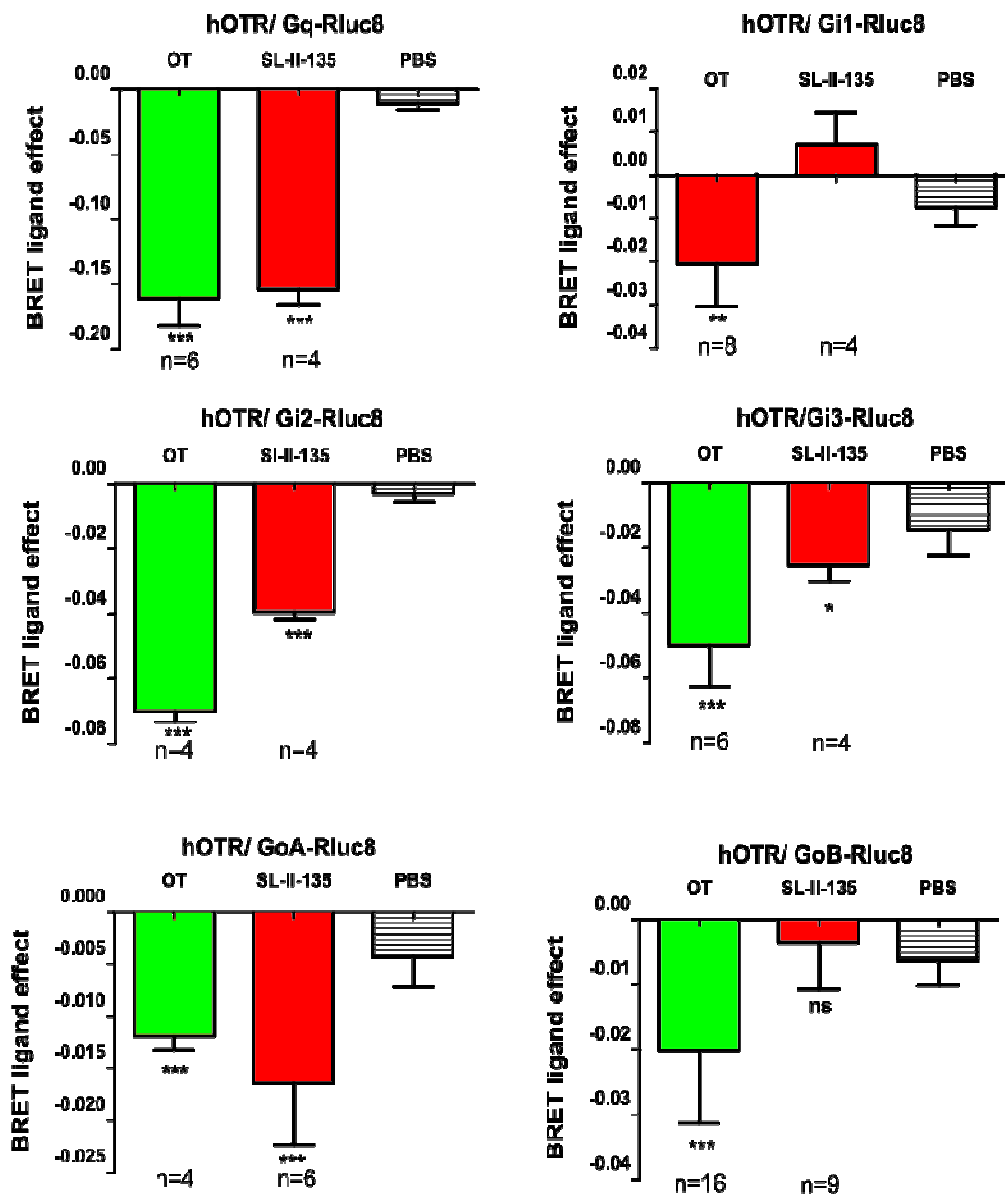


Le signal de BRET est mesuré dans des cellules HEK293 coexprimées avec OXTR, GFP¹⁰-G γ 2,G β 1 et les complexes G α -RLuc suivants : G α_q -RLuc (A), G α_{i1} -RLuc (B), G α_{i2} -RLuc (C), G α_{i3} -RLuc (D), G α_{oA} -RLuc (E), G α_{oB} -RLuc (F). Les cellules sont stimulées 2 minutes avec OT et les ligands peptidiques à une concentration finale de 10 μ M. A cette dose OT provoque un signal de ratio de BRET chez toutes les protéines G testées. Les résultats représentent la différence de signal de BRET en présence et en absence (10 μ M) de ligand et sont exprimés par une valeur moyenne issue de 6 déterminations indépendantes.

Figure 92 : Mesures de BRET de l'activation des complexes OT-G $\alpha\beta$ 1 γ 2 par l'OT et les ligands peptidiques sur cellules HEK293.

L'ocytocine active G $_q$ et toutes les sous-unités G $_{i/o}$. Dans la publication princeps, les ligands peptidiques sélectionnés montrent tous une activation biaisée des sous-unités de protéines

G. Aucun ligand sauf l'ocytocine n'active G_{oA} et G_{oB} . Tous les ligands peptidiques qui activent G_q activent également G_{i2} , G_{i3} mais pas G_{i1} , G_{oA} et G_{oB} . Deux peptides (DNalOVT et atosiban) activent seulement G_{i1} ou G_{i3} , ne participent pas au recrutement des β -arrestines et n'induisent pas d'internalisation des récepteurs. Ceci prouve bien une réelle sélectivité fonctionnelle entre ligands (Figure 92).



Le signal de BRET est mesuré dans des cellules HEK293 coexprimées avec OXTR, GFP¹⁰-Gγ2,Gβ1 et les complexes $G\alpha$ -Rluc suivants : $G\alpha_q$ -Rluc (A), $G\alpha_{i1}$ -Rluc (B), $G\alpha_{i2}$ -Rluc (C), $G\alpha_{i3}$ -Rluc (D), $G\alpha_{oA}$ -Rluc (E), $G\alpha_{oB}$ -Rluc (F). Les cellules sont stimulées 2 minutes avec OT et le composé SL-II-135 à une concentration finale de 10 μ M. A cette dose OT provoque un signal de ratio de BRET chez toutes les protéines G testées. Les résultats représentent la différence de signal de BRET en présence et en absence (10 μ M) de ligand et sont exprimés par une valeur moyenne issue de 6 déterminations indépendantes.

Figure 93: Mesures de BRET de l'activation des complexes OT- $G\alpha\beta\gamma$ 2 par l'OT et le composé SL-II-135 sur cellules HEK293.

Ces deux analogues permettent de discriminer les contributions $G_{i/o}$ dans des réponses biologiques complexes. Leur nature pseudo-peptidique reste cependant un handicap dans certains contextes plus physiologiques.

Un partenariat avec l'équipe de Bice Chini nous a permis d'évaluer la discrimination d'activation des sous-unités de protéines G pour le composé **SL-II-135**. Des mesures de BRET ont permis de comparer le profil d'activation des sous-types de protéine G entre l'ocytocine et le composé **SL-II-135** (Figure 93).

Le profil du composé **SL-II-135** est extrêmement intéressant. En effet on peut voir que le composé **SL-II-135** active G_q , G_{i2} , G_{i3} et G_{oA} et n'active pas G_{i1} et G_{oB} . C'est le premier agoniste qui montre une activation de la sous-unité G_{oA} . Il pourrait ainsi être intéressant de comparer les différences de réponse physiologique avec un ligand qui activerait les mêmes protéines G sauf la sous-unité G_{oA} pour mettre en évidence la fonction et l'importance de cette voie de signalisation.

En conclusion, nous avons découvert un agoniste biaisé original du récepteur de l'ocytocine. Il n'est pas exclu que d'autres profils existent parmi les différents composés analogues synthétisés. Ce profilage reste à effectuer. L'utilisation de ligands biaisés sélectifs du récepteur de l'ocytocine pourrait être envisagée dans le traitement des cancers pour traiter l'invasion des cancers du sein et de la prostate. Le lien entre les différentes voies de signalisation activées par l'ocytocine et ses diverses fonctions neurocomportementales est peu connu. Il serait intéressant d'utiliser ces ligands biaisés pour étudier ce lien afin de développer des traitements pour les maladies psychiatriques et pour l'autisme.

V. Conclusion

Les études de relations structure-activité autour du **Ferring-1** nous ont permis de caractériser les déterminants essentiels pour garder un caractère agoniste et l'améliorer significativement. Les composés de référence (**Ferring-1**, **WAY-267464** et **SL-II-135**) qui ont été testés en parallèle dans tous les essais en affinité et en fonction sont retrouvés agonistes *partiels* pour le récepteur de l'ocytocine comme décrit dans la littérature. Nos études de

relations structure-activité ont permis d'identifier deux nouvelles molécules (composés **88** et **94**) qui montrent une très bonne affinité avec un caractère agoniste entier beaucoup plus affirmé (Figure 94). Les molécules présentant les meilleures caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques sont rassemblées dans le Tableau 31.

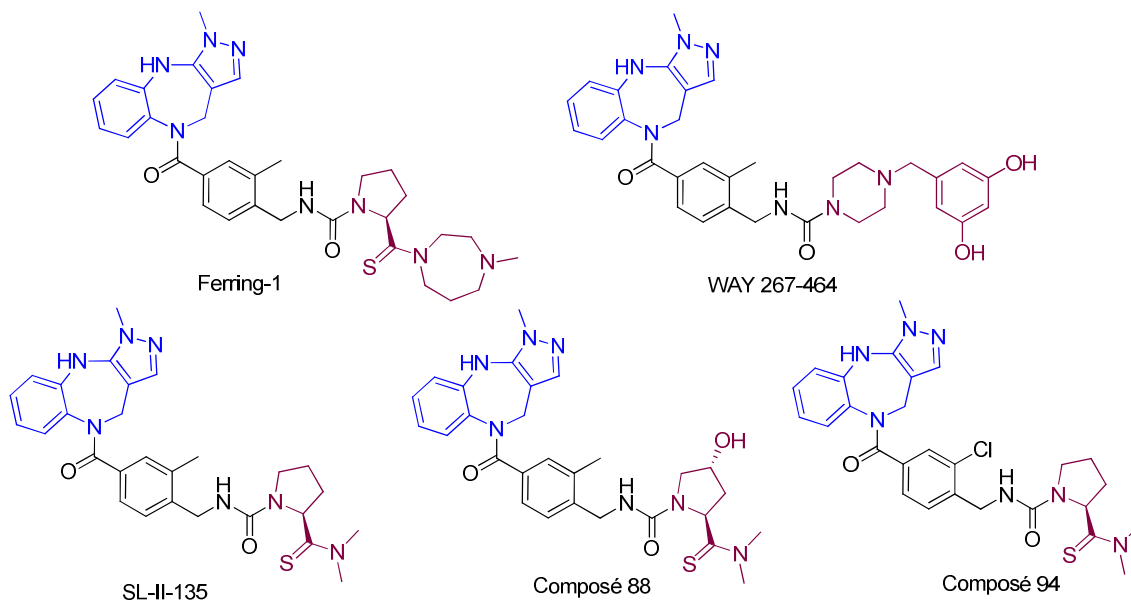


Figure 94 : Structure des principaux agonistes non-peptidiques du récepteur de l'ocytocine

Seuls le **SL-II-135** et le composé **94** gardent la potentielle pénétration de la BHE avec un log BB de respectivement -0.75 et -0.73 et les molécules les plus lipophiles sont le **WAY-267464**, le **SL-II-135** et le composé **94**.

| Composé | PSA (Å) | LogD | LogBB | OXTR : K _i (nM) | Sélectivité | | EC ₅₀ pour OXTR (nM) |
|------------|--------------|------|--------------|-------------------------------|------------------|-----------------|------------------------------------|
| | | | | | V _{1aR} | V _{2R} | |
| Ferring-1 | 90.18 | 1.33 | -1.04 | 141 | 1.39 | 197 | 28±11 (84%) |
| WAY-267464 | 127.40 | 2.69 | -1.41 | 30.5±6. | 0.5 | 79 | 3±0 (40%) |
| | | | | 5 | | | |
| SL-II-135 | 85.74 | 2.84 | -0.75 | 226±75 | 5.5 | 7.3 | 55±7 (52%) |
| Composé 88 | 105.97 | 1.00 | -1.33 | 26 | 34.4 | 2.4 | 28±4 (100%) |
| Composé 94 | 85.74 | 2.93 | -0.73 | 385.7 | 4.8 | 1.9 | 43±4 (104%) |

Tableau 31 : Tableau récapitulatif des molécules avec les meilleures caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques.

A ce jour comme le montre le Tableau 31, nous n'avons pas obtenu de molécule qui rassemble toutes les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques idéalement

requises mais nous nous en rapprochons. Comme cela a été fait pour le SL-II-135, il serait intéressant de tester la sélectivité fonctionnelle des autres agonistes non-peptidiques (composés **88** et **94**) pour identifier de potentiels outils permettant de mieux comprendre les différentes voies d'activation du récepteur de l'ocytocine

La meilleure molécule pour des tests *in vivo* reste le **SL-II-135**. Son profil pharmacologique est intéressant avec une masse moléculaire inférieure à celle des molécules de référence, une bonne affinité pour le récepteur de l'OT, une sélectivité modérée vis-à-vis des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V₂, un agonisme biaisé potentiellement intéressant, un profil pharmacocinétique qui se rapproche de l'idéal et qui sera approfondi par mesure expérimentale de la pénétration dans le cerveau. Cette molécule sera également prochainement étudiée *in vivo* dans différents modèles animaux :

- Chez les souris knock-out du récepteur mu de l'équipe de Brigitte Kieffer (IGBMC, Illkirch) qui montrent un phénotype d'autisme.
- Chez le singe au centre de neuroscience cognitive de Lyon. Ce laboratoire analyse les comportements d'un couple de singes amoureux après inhalation d'ocytocine.

Les composés **88** et **94** seront également étudiés *in vivo* dans un deuxième temps, si les résultats avec le **SL-II-135** sont intéressants.

Partie 2 Chapitre 3 : Nouvelles plateformes pour concevoir des agonistes du récepteur de l'ocytocine

Après l'échec actuel du criblage et l'optimisation réussie d'agonistes partiels existants, nous abordons une troisième stratégie consistant à concevoir aussi rationnellement que possible de nouveaux agonistes ocytocinergiques autour de plates-formes chimiques originales.

La plupart des molécules biologiquement actives naturelles sont des hétérocycles et les systèmes hétérocycliques sont largement exploités par les industries pharmaceutiques.

Il est intéressant de développer des châssis non privilégiés qui n'existent pas dans la littérature pour explorer un nouvel espace chimique. En se basant sur cette approche, à partir des données structurales et de modèles des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine V_{1a} , de nouvelles plates-formes chimiques ont été imaginées et développées pour mimer l'ocytocine et plus particulièrement les trois acides aminés clés nécessaires pour garder une affinité et un caractère agoniste pour le récepteur de l'ocytocine.

Dans ce troisième chapitre, nous présentons le développement de nouvelles plates-formes chimiques de types 1,2,4-triazine-3,6-diones et 1,4-diazepin-2-ones ainsi que des peptides cycliques contenant une aza-dicétopipérazine, pour mimer l'ocytocine. Des stratégies de synthèse originales ont été développées et une étude plus approfondie des 1,2,4-triazine-3,6-dione a été réalisée (étude structurale, comparaison avec les dicétopipérazines, étude de l'importance du châssis pour l'activité biologique).

*Toutes les molécules ont été testées en affinité et en fonction. De manière remarquable, le dérivé 1,2,4-triazine-3,6-dione **145**, mime peptidique rudimentaire de l'ocytocine, est trouvé affiné du récepteur de l'ocytocine avec un K_i de 835 nM et antagonise la fonction avec une CI_{50} >1000 nM.*

I. Modélisation moléculaire

Le modèle de l'ocytocine dans son récepteur et les études de RSA sur les peptides¹⁷⁴ montrent que les trois acides aminés cruciaux pour garder l'affinité et le caractère agoniste sont la tyrosine 2, l'isoleucine 3 et la glutamine 4. Ces trois acides aminés clés pointent vers les hélices 4, 5 et 6 au fond du site actif du récepteur. Nous avons essayé de concevoir des petites molécules qui orienteraient correctement dans l'espace les fonctions portées par ces trois acides aminés clés. Pour cela, nous sommes partis de plates-formes cyclisées, basées sur des châssis originaux, très peu décrits dans la littérature : les 1,2,4-triazine-3,6-diones dérivés de dicétopipérazines et les 1,4-diazepin-2-ones.

Un pharmacophore est un atome ou un groupe d'atomes communs à tous les ligands d'une même cible et essentiels pour avoir une activité biologique. Il est basé sur la représentation 3D des molécules. Ce pharmacophore a été établi à partir de la structure 3D de l'ocytocine prédite dans sa forme liée au récepteur de l'ocytocine (Didier Rognan, communication personnelle). A partir de ce modèle et des données publiées de RSA¹⁷⁴, un pharmacophore positionnant correctement les trois acides aminés clés dans l'espace a été défini (Figure 95). Quatre points de description ont été déterminés : le groupement aromatique de la tyrosine 2, le groupement aliphatique de l'isoleucine 3, l'accepteur et le donneur de liaison H de la glutamine 4. Le pharmacophore a été construit de manière automatique dans DiscoveryStudio 3.4 (*Accelrys Inc.*). Nous avons ensuite imaginé diverses molécules à partir des plates-formes hétérocycliques en les substituant de manière à tenter de mimer les points pharmacophoriques. Pour chaque molécule imaginée, un ensemble conformationnel a été généré dans DiscoveryStudio 3.1 et superposé au pharmacophore.

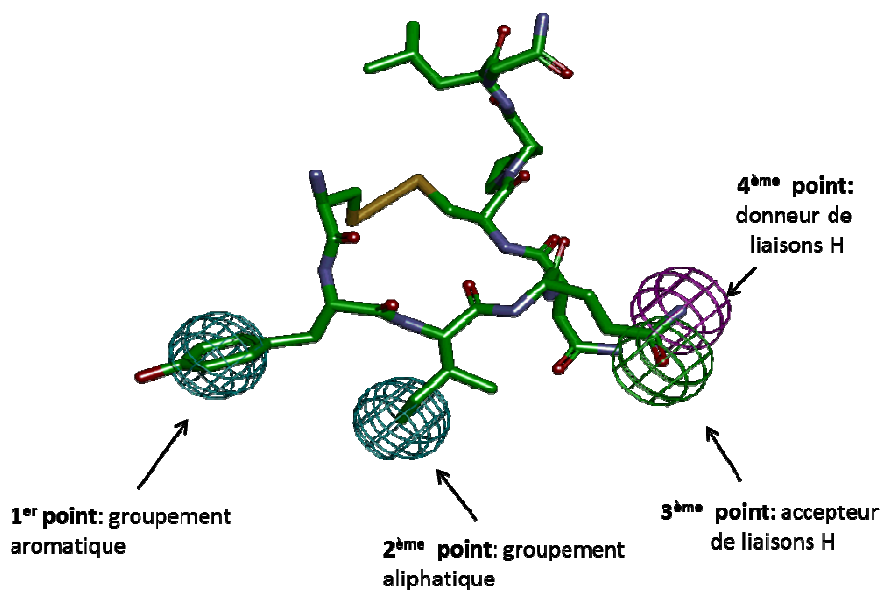


Figure 95 : Définition du pharmacophore qui oriente les trois acides aminés clés dans l'espace

Une sphère est générée autour de chaque point du pharmacophore. La valeur de fitness pour un point pharmacophorique est comprise entre 0 (atome de la molécule hors de la sphère) et 1 (superposition totale entre l'atome de la molécule et l'atome du centre de la sphère). La valeur de fitness d'une molécule s'estime à l'aide de l'équation suivante :

$$Fit = \sum \text{nombre de point pharmacophorique} \times W \left[1 - \sum \left(\frac{disp}{tol} \right)^2 \right]$$

avec W , le poids attribué à chaque sphère (dans notre cas nous avons donné à chaque point pharmacophorique la même importance, $W=1$) ; $disp$, la distance entre le centre du pharmacophore et le centre de l'atome de la molécule superposée ; tol , tolérance, le rayon de la sphère d'une valeur définie à 1.6 Å.

La valeur de fitness maximale est retenue pour chaque molécule. La valeur de fitness est comprise entre 0 et 4 avec la valeur de 4 correspondant à une superposition totale et la valeur de 0 à aucune superposition. A partir de 2, la valeur est considérée comme pertinente.

La superposition du dérivé 1,2,4-triazine-3,6-dione 2,4,5-trisubstituée **115** donne un fit de 2.52. On peut voir sur la Figure 96 que la superposition des dérivés tyrosine et glutamine est très bonne. Au niveau de la région de l'isoleucine, la cétone de l'hétérocycle ne se superpose pas avec le carbonyle du squelette peptidique. Un accepteur de liaison H en plus se trouve dans cette structure. La superposition reste cependant globalement intéressante et la

synthèse de cette molécule nous permettra d'étudier l'influence d'un accepteur de liaison H aux alentours de l'isoleucine.

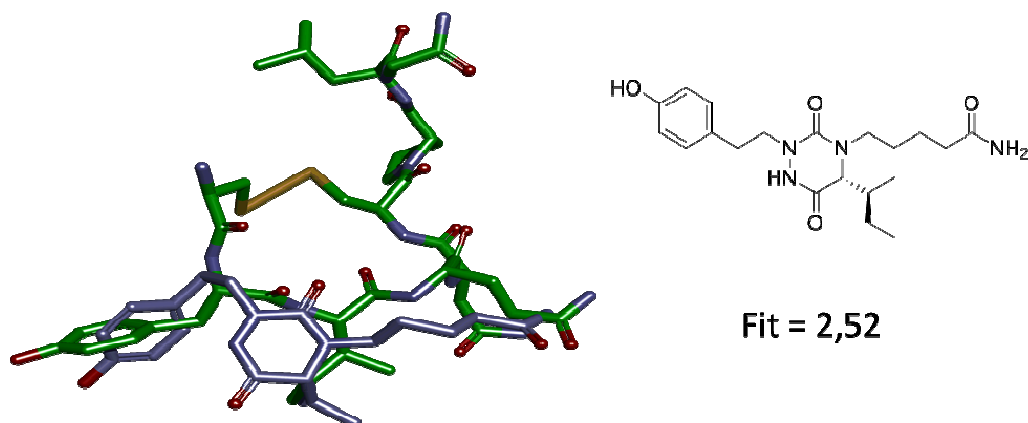


Figure 96 : Superposition de la 1,2,4-triazine-3,6-dione 2,4,5-trisubstituée **115** avec l'ocytocine

La deuxième molécule conçue est le dérivé 1,4-diazépin-2-one **116**. La superposition de ce dérivé avec l'ocytocine donne un fit de 3.32. Cette valeur de fit est meilleure que pour le dérivé 1,2,4-triazine-3,6-dione 2,4,5-trisubstitué **115** et se rapproche fortement de la valeur maximale de 4. Sur la Figure 97, on peut voir une très bonne superposition de tous les points définissant le pharmacophore.

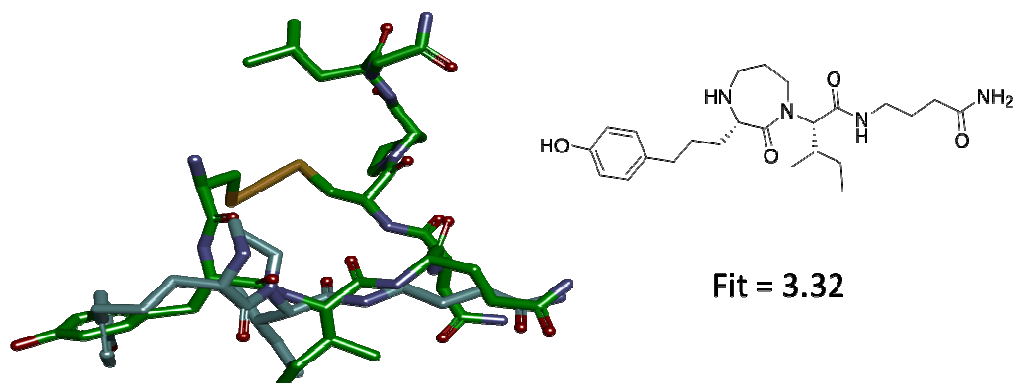


Figure 97 : Superposition du dérivé 1,4-diazépin-2-one **116** avec l'ocytocine

Cependant ces deux dérivés **115** et **116** présentent des chaînes latérales comprenant entre 2 et 4 CH₂ consécutifs qui induisent un grand nombre de conformations différentes et une perte potentielle d'affinité du fait de l'entropie à compenser.

En effet, le ligand et son récepteur sont entourés de molécules d'eau et ont une certaine flexibilité. Lors de la fixation du ligand sur son récepteur, la flexibilité à la fois du ligand et du récepteur est réduite. Les interactions polaires contribuent à une enthalpie libre standard de

réaction ΔG favorable ($\Delta H < 0$). Par contre, la mobilité réduite du ligand dans le récepteur entraîne une pénalité entropique ($\Delta S < 0$). La libération d'eau va favoriser l'entropie du système ($\Delta S > 0$). L'entropie d'une molécule est la mesure du degré de désordre d'un système au niveau microscopique. Plus l'entropie du système est élevée, plus ces éléments sont désordonnés. Donc, malgré la bonne superposition au pharmacophore, nous nous attendons à avoir une affinité relativement faible pour le récepteur dû au coût entropique pour que la molécule soit dans sa conformation active.

II. Les 1,2,4-triazine-3,6-diones ou aza-dicétopipérazines

1. Introduction

i. Dicétopipérazine

Les dicétopipérazines (DCP) sont des dipeptides cyclisés obtenus par la condensation de deux acides aminés α . Les DCP ne sont pas seulement retrouvées dans les produits naturels mais sont également produites par la dégradation des polypeptides, essentiellement dans la production de nourriture et de boissons. Les 2,5-DCP sont retrouvées dans de nombreux produits naturels, soit seules, soit comme sous-unités dans des architectures complexes de produits naturels retrouvés chez les champignons, les bactéries, les plantes et les mammifères¹⁷⁵. Par exemple, la spirotryprostatine A a été isolée du bouillon de fermentation de *A. fumigatus* et représente une classe d'agents antimittotiques. La brevicompanine A fait partie d'une classe de métabolites antifongiques et intervient dans la biosynthèse chez *P. brevicompactum* (Figure 98).

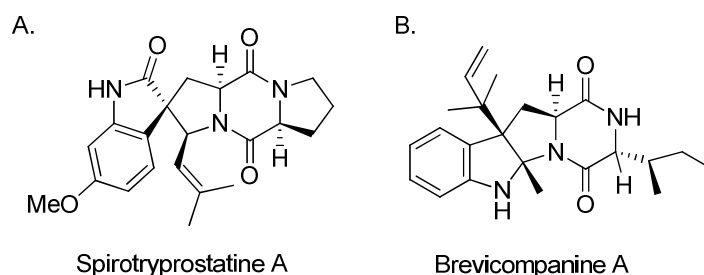


Figure 98 : Exemple de produit naturels contenant une dicétopipérazine

Les DCP sont de petites structures hétérocycliques avec une conformation relativement rigide qui peut être fonctionnalisée dans 4 positions différentes avec une stéréochimie potentiellement contrôlable. Ces structures sont importantes pour la conception de

nouveaux médicaments. En effet, leur châssis peut mimer la conformation d'un peptide tout en étant stable à la protéolyse. Leur structure 3D vient combler le manque de squelettes 3D retrouvés dans les bibliothèques de substances actives, qui pour la plupart ont un châssis moléculaire plan¹⁷⁶.

Les DCP sont en fait semi-rigides car le cycle à 6 atomes peut être présent sous forme plate ou sous la forme d'un bateau légèrement plié. La différence d'énergie entre les deux formes est seulement de quelques kcal/mol. Les substituants de la DCP influencent la conformation adoptée par le cycle à 6. Pour les DCP fusionnées à une pipéridine, le cycle à 6 va prendre la conformation stable bateau.

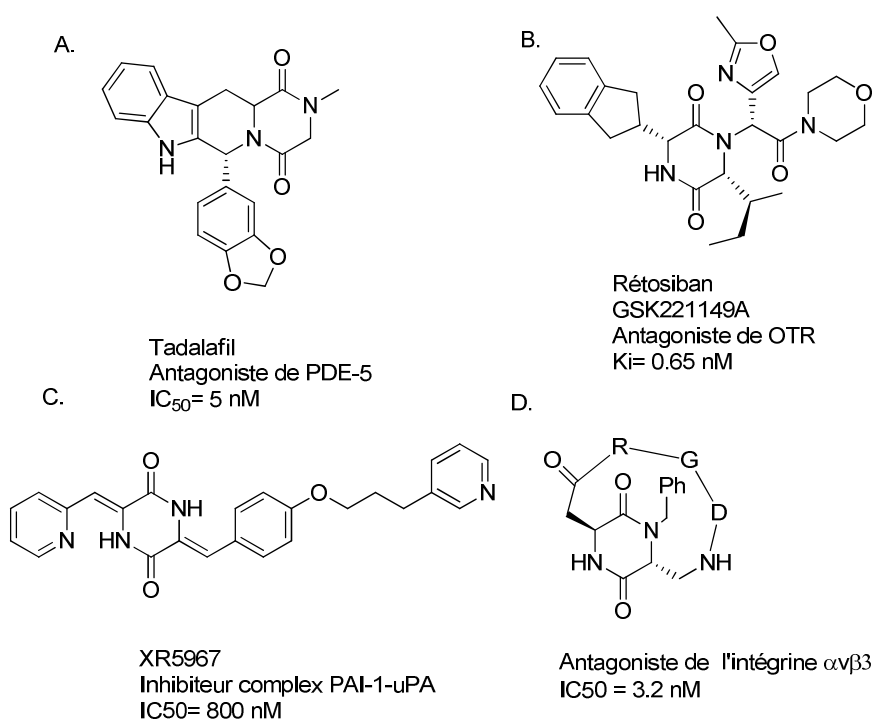


Figure 99 : Exemples de composés bioactifs contenant une dicétopipérazine

On retrouve le châssis DCP dans les inhibiteurs de phosphodiésterase-5 (PDE5). Ces inhibiteurs (Figure 99.A.) réduisent la dégradation de GMPc activant la fonction érectile par relaxation vasculaire des muscles du pénis et représentent une approche révolutionnaire pour le traitement des dysfonctionnements de l'érection¹⁷⁷. Une classe d'antagonistes du récepteur de l'ocytocine construite autour d'un châssis DCP a été développée par le laboratoire *GlaxoSmithKline*. Le GSK221149 (Figure 99.B.) a une affinité de l'ordre du nanomolaire pour le récepteur de l'ocytocine avec une sélectivité de plus de 1400 pour les récepteurs de la vasopressine⁹⁷. L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) est une cible thérapeutique potentielle dans le traitement du cancer et le traitement de

maladies cardiovasculaires. Le composé XR5967, dérivé de DCP (Figure 99.C.) et issu d'une étude de relations structure-activité à partir d'un produit naturel isolé de la fermentation de *Streptomyces* sp., supprime l'invasion cellulaire des tumeurs et l'angiogenèse. Ce composé empêche la formation du complexe PAI-1 avec sa cible (Activateur du Plasminogène de type urokinase uPA)¹⁷⁸.

Le tripeptide RGD (arginine, glycine, acide aspartique) est un motif commun retrouvé dans plusieurs ligands endogènes pour reconnaître les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_5\beta_1$ et s'y fixer. Ces intégrines jouent un rôle essentiel dans l'angiogenèse, la progression des tumeurs et des métastases. L'antagoniste de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Figure 99.D.) bloque la résorption de la matrice osseuse assurée par les ostéoblastes. L'affinité nanomolaire de ce composé peut être expliquée par sa rigidification qui mime un pseudo coude β qui oriente les chaînes latérales de la séquence RGD dans la bonne conformation¹⁷⁹.

Les coudes β sont des éléments structuraux secondaires majeurs retrouvés dans les peptides et protéines et jouent un rôle crucial dans la reconnaissance moléculaire d'éléments biologiques. C'est une structure retrouvée dans de nombreux peptides bioactifs. Il est défini comme une séquence térapeptidique avec une liaison H entre le CO du C α (i) et le groupement NH du résidu C α (i+3). La distance entre le C α (i) et le C α (i+3) varie entre 4 et 7 Å. Les coudes β peuvent être mimés avec des DCP bifonctionnalisées comprenant une fonction acide carboxylique et une fonction amine primaire en position cis¹⁸⁰ (Figure 100).

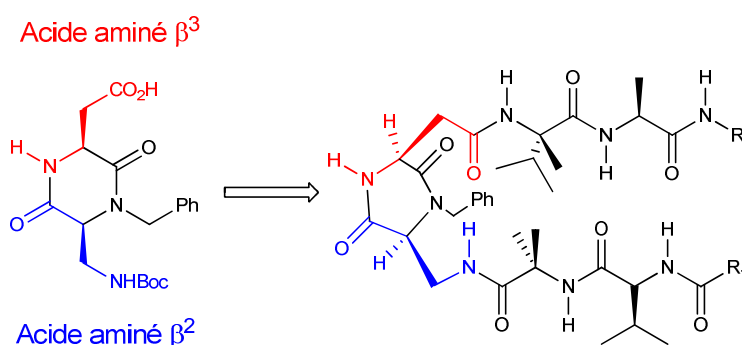


Figure 100 : DKP utilisés comme mimes des coudes β

Les DCP peuvent également être utilisées comme vecteur pour augmenter le passage de la barrière hémato-encéphalique. La baicalin qui est un flavonoïde issu de la plante *Scutellaria baicalensis Georgi* est un inhibiteur de la propyloligopeptidase associé à la schizophrénie et aux troubles bipolaires. Cependant cette molécule ne passe pas la barrière hémato-

encéphalique. La fixation d'une DCP sur la partie acide carboxylique de la molécule a permis de vectoriser la molécule dans le cerveau¹⁸¹.

Les DCP sont facilement accessibles en partant d'acides aminés commerciaux. Du point de vue combinatoire, une forte diversité peut être obtenue en peu d'étapes à partir d'acides aminés naturels ou non. De nouveaux châssis très proches de ces DCP ont été développés au laboratoire : les aza-dicétopipérazines.

ii. Aza-dicétopipérazines

Des nouveaux châssis basés sur les DCP seraient une bonne opportunité pour explorer un espace chimique peu couvert dans la littérature et pour développer de nouvelles molécules biologiquement actives.

Les 1,2,4-triazine-3,6-dione (aza-DCP) sont un exemple de châssis « sous représenté » où le centre chiral C α est remplacé par un azote plan. Il y a très peu d'exemples d'aza-DCP dans la littérature. Le groupe de Pinner décrit en 1993 pour la première fois la synthèse de c-[aza-Phe-Pro] dans leurs travaux de recherche sur les pseudopeptides ergopeptines¹⁸². Plus récemment deux groupes ont décrit la synthèse de c-[aza-alkyl Gly-Pro] (Figure 101.A.)¹⁸³¹⁸⁴. Deux exemples de synthèse de 1,2,4-triazine-3,6-dione 1,2,4-trisubstituées ont été décrits en solution et sur support¹⁸⁵¹⁸⁶ (Figure 101.B).

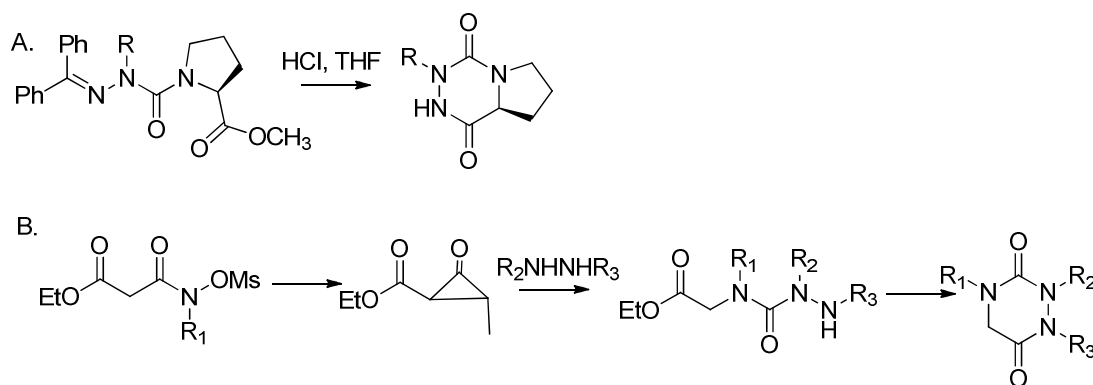


Figure 101 : Voies de synthèse des aza-DCP décrits dans la littérature

En plus de son originalité, ce nouvel hétérocycle apparaît comme être une molécule « drug-like » car elle remplit les conditions suivantes :

- Faible poids moléculaire qui peut être décoré avec 3 substituants variables
- 5 hétéroatomes qui augmentent le caractère hydrophile de la molécule

- Le nombre de donneurs de liaison H est de 1 et d'accepteurs de liaison H est de 2 ce qui permet de décorer la molécule en rajoutant des donneurs ou des accepteurs de liaison H sans enfreindre les règles de Lipinski¹⁸⁷

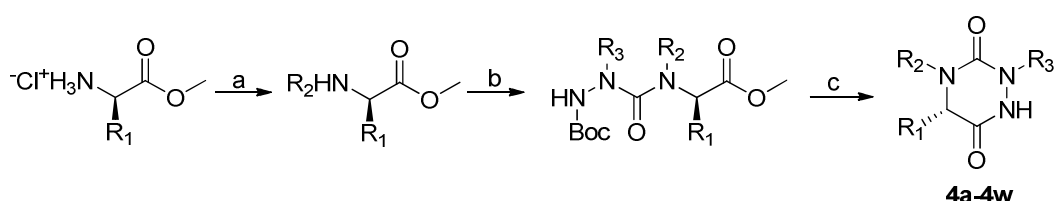
Une approche combinatoire sur support a été développée au laboratoire pour accéder pour la première fois à des 1,2,4-triazine-3,6-dione 2,4,5-trisubstituées.

2. Développement et synthèse des 1,2,4-triazine-3,6-diones

i. Voie de synthèse en solution

L'accès aux premières 1,2,4-triazine-3,6-dione 2,4,5-trisubstituées a été développée en collaboration avec le groupe du Dr Ganesan (Université de Southampton)¹⁸⁸.

La synthèse des 1,2,4-triazine-3,6-dione 2,4,5-trisubstituées en solution s'effectue en trois étapes. En partant d'un amino ester, une amination réductrice est effectuée à partir de dérivés aldéhydes en présence de NaBH₄ dans le méthanol. Les dérivés alkyl/aryl carbazates de *tert*-butyle sont préparés à partir du carbazate de *tert*-butyle soit par amination réductrice soit par alkylation à partir des dérivés bromures. L'amine secondaire obtenue est couplée aux dérivés alkyl/aryl carbazate de *tert*-butyle en présence de triphosgène dans le CH₂Cl₂ ou le méthanol avec des rendements compris entre 48% et 90%. La cyclisation s'effectue soit en présence de résine amberlyst 15 dans le méthanol au micro-onde entre 120 et 140 °C pendant 15 à 20 min, soit à reflux dans du toluène en présence de *p*-TsOH pendant 2h30 pour obtenir les aza-dicétopipérazines correspondantes **4a-4w** avec des rendements compris entre 19% et 72% (Figure 102).



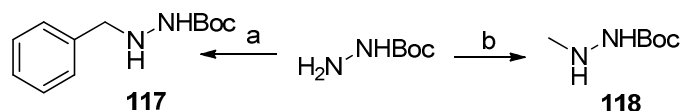
(a) i. Et₃N, MeOH, aldéhyde, 1 nuit, ii. NaBH₄, MeOH, 30 min ; (b) BocNHNHR, triphosgène, CH₂Cl₂ ou THF, DIEA, 10 min ; (c) *p*-TsOH, toluène, reflux, 2.5 h ou résine Amberlyst 15, MeOH, MW, 120-140 °C, 15-20 min.

Figure 102 : Synthèse en solution des 1,2,4-triazine-3,6-diones 2,4,6-trisubstituées

ii. Etude des déterminants essentiels pour une cyclisation en aza-DCP en milieu acide

Afin d'accélérer et de faciliter l'accès à ces composés originaux, une stratégie de synthèse sur support solide a été développée au laboratoire. Dans ce cadre, j'ai plus particulièrement participé à l'optimisation de l'étape de cyclisation finale des composés. Pour cela, six

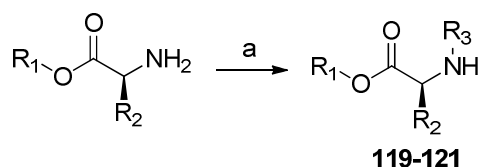
carbazates de *tert*-butyle substitués ont tout d'abord été préparés en solution ou sur support solide (Tableau 33).



(a) benzaldéhyde, THF, 1 nuit, NaBH₃CN, THF, 1 nuit, 94% ; (b) formaldéhyde, Et₃N, THF, 1 nuit, NaBH₄, MeOH, 2 h, 50%.

Figure 103 : Préparation des dérivés alkyl/aryl carbazate de *tert*-butyle 117 et 118

La synthèse débute par préparation des deux dérivés carbazates de *tert*-butyle **117** et **118**, en 1 étape par amination réductrice en présence respectivement de benzaldéhyde¹⁸⁹ et de formaldéhyde avec des rendements de 94% et 50% (Figure 103). Ensuite, la synthèse des semicarbazides **119-121** est réalisée en deux étapes. La première étape est une amination réductrice à partir des dérivés ester-aminés avec des rendements compris entre 39% et 99% (Tableau 32).

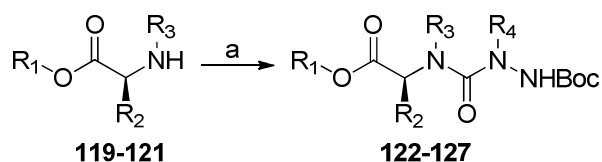


(a) formaldéhyde ou benzaldéhyde, Et₃N, MgSO₄, MeOH, 1 nuit, NaBH₄, 1 h

| Composé | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Rendement (%) |
|------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| 119 | -Bn | -Bn | -Bn | 94 |
| 120 | -Me | -Bn | -Bn | 68 |
| 121 | -Me | -Bn | -Me | 60 |

Tableau 32 : Rendement de l'étape d'amination réductrice

La seconde étape est un couplage de l'amide secondaire avec un des deux dérivés alkyl et aryl carbazate de *tert*-butyle **117** ou **118** en présence de triphosgène et de DIEA dans le THF ou le CH₂Cl₂ pour obtenir les semicarbazides **122-127** avec des rendements compris entre 47% et 74% (Tableau 33).

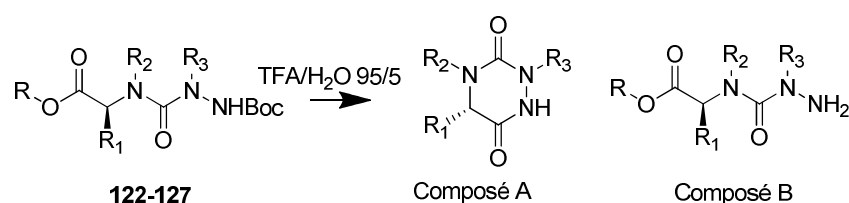


(a) triphosgène, DIEA, THF ou CH_2Cl_2 , composé **117** ou **118**, 1 nuit TA ou 70 °C.

| Composé | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | Rendement (%) |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| 122 | -Bn | -Bn | -H | -Bn | 71 |
| 123 | -Me | -Bn | -H | -Bn | 67 |
| 124 | -Bn | -Bn | -Bn | -Bn | 74 |
| 125 | -Me | -Bn | -Bn | -Bn | 30 |
| 126 | -Me | -Bn | -Me | -Bn | 47 |
| 127* | -Me | -Me | -Bn | -Bn | 48 |

Tableau 33 : Rendement de la formation des semicarbazides

Les dérivés **122-127** ainsi obtenus sont traités dans les conditions compatibles avec la synthèse sur support solide à savoir, en milieu acide (TFA/ H_2O , 95/5, v/v) afin de déprotéger le semicarbazide. De façon surprenante, le contrôle par LC-MS de l'avancement de la réaction montre la formation quantitative du composé cyclisé et ceci après seulement 30 min à TA. Dans ces conditions, la déprotection du semicarbazide est suivie de sa cyclisation rapide et quantitative en 1,2,4-triazine-3,6-diones quel que soit la nature de l'ester (méthylique ou benzylique). De façon intéressante, nous avons pu montrer qu'il est par contre nécessaire que l'azote de l'ester aminé soit alkylé pour que la molécule puisse cycliser (entrées 1 et 2). Si le substituant R₂ est un atome d'hydrogène, le traitement en milieu acide des composés **122** et **123** (entrées 1 et 2) ne permet pas d'accéder au composé cyclisé A mais uniquement au composé déprotégé B (Tableau 34).



| Entrée | Composé | R | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Pureté composé A | Pureté composé B |
|----------|------------|-----|----------------|----------------|----------------|------------------|------------------|
| 1 | 122 | -Bn | -Bn | -H | -Bn | / | 100% |
| 2 | 123 | -Me | -Bn | -H | -Bn | / | 100% |
| 3 | 124 | -Bn | -Bn | -Bn | -Bn | 100% | / |
| 4 | 125 | -Me | -Bn | -Bn | -Bn | 100% | / |
| 5 | 126 | -Me | -Bn | -Me | -Bn | 100% | / |
| 6 | 127 | -Me | -Me | -Bn | -Bn | 100% | / |

Tableau 34 : Etude de la cyclisation en solution des triazinediones à t=1h

En conclusion, nous avons pu montrer que le traitement du semicarbazide protégé en présence de TFA conduisait à une déprotection du composé suivie d'une cyclisation spontanée pour conduire à l'aza-DCP attendue avec un rendement et une pureté élevée. Par contre, il est nécessaire d'avoir un substituant en R₂ sur l'azote alpha de l'acide aminé pour que le semicarbazide cyclise spontanément en milieu acide en aza-DCP. En présence d'un proton sur le groupement R₂, il est plausible que la conformation soit non favorable à la cyclisation, le semicarbazide restant linéaire stabilisé et stabilisé par liaison H intramoléculaire.

iii. Voie de synthèse sur support solide

La synthèse a été adaptée sur support solide à partir des résines de Wang ou HMBA construites autour de billes de polystyrène (70 µmol)¹⁸⁸. La résine de Wang est construite à partir du linker 4-hydroxybenzyl alcool. Le premier résidu est introduit par acylation de l'alcool benzylique. A la fin de la synthèse, la coupure du produit de la résine peut être effectuée en milieu acide par hydrolyse du lien ester pour obtenir le produit sous forme d'acide carboxylique. La résine HMBA (hydroxyméthyl benzoic acid) est construite à partir du linker acide 4-hydroxyméthyl benzoïque et peut être coupée par attaque de nucléophiles (Figure 104).

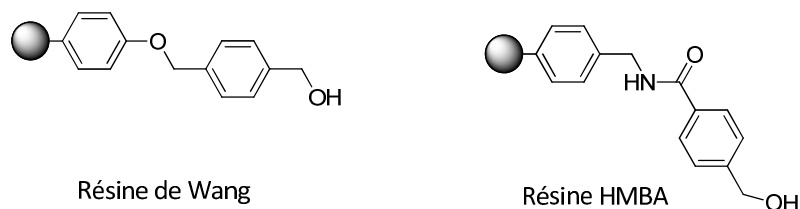
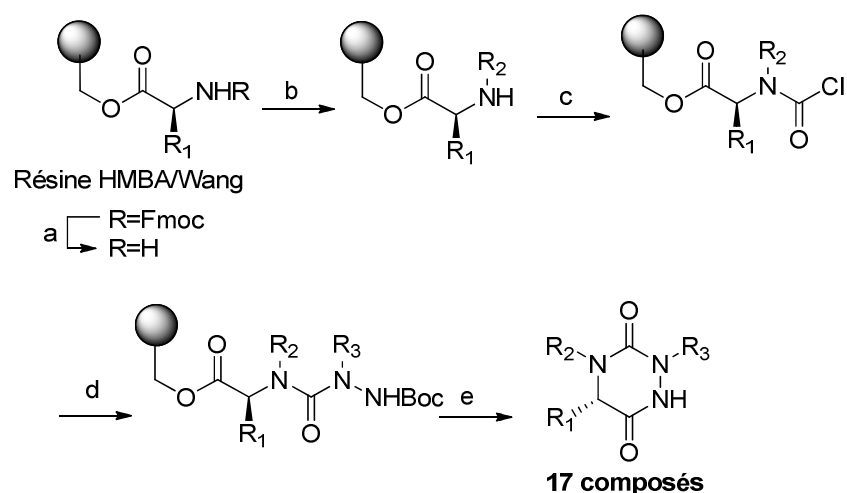


Figure 104: Structure des résines de Wang et HMBA

La synthèse sur support solide est suivie par des tests colorimétriques¹⁹⁰ (chloranil, trinitrobenzène sulfonate ou TNBS, ninhydrine). Les conditions réactionnelles ont été optimisées sur support solide (Figure 105). L'amination réductrice est effectuée dans le triméthylorthoformate (TMOF) en présence de l'aldéhyde et elle est suivie par la réduction de l'imine à l'aide de NaBH₃CN en présence d'acide acétique 0.1%. L'étape clé de cette synthèse est la formation du semicarbazide : l'amine secondaire est activée en présence de triphosgène et de 2,4,6-collidine et est couplée à un excès de dérivés alkyl/aryl carbazates de *tert*-butyle préparés en solution dans le THF à 70 °C. La cyclisation est réalisée dans les conditions que nous avons mis au point précédemment, à savoir un mélange TFA/H₂O (95/5,

v/v). La résine de Wang est traitée en milieu acide, tous les produits sur la résine vont être alors décrochés. Par contre, la résine HMBA est stable en milieu acide. Cela permet d'envisager une cyclisation-libération de la molécule conduisant aux produits attendus avec des puretés élevées, seul le produit attendu étant généré en solution. Dans les deux cas, le traitement final en milieu TFA a permis de conduire, comme observé en solution, à la déprotection du semicarbazide suivie de sa cyclisation spontanée. Cette stratégie de synthèse sur support solide est rapide et efficace et elle a permis la préparation au laboratoire de **17 produits** originaux non décrits dans la littérature¹⁸⁸. Cette approche est particulièrement adaptée à la synthèse combinatoire en parallèle pour la production de chimiothèques focalisées autour du motif aza-DCP.



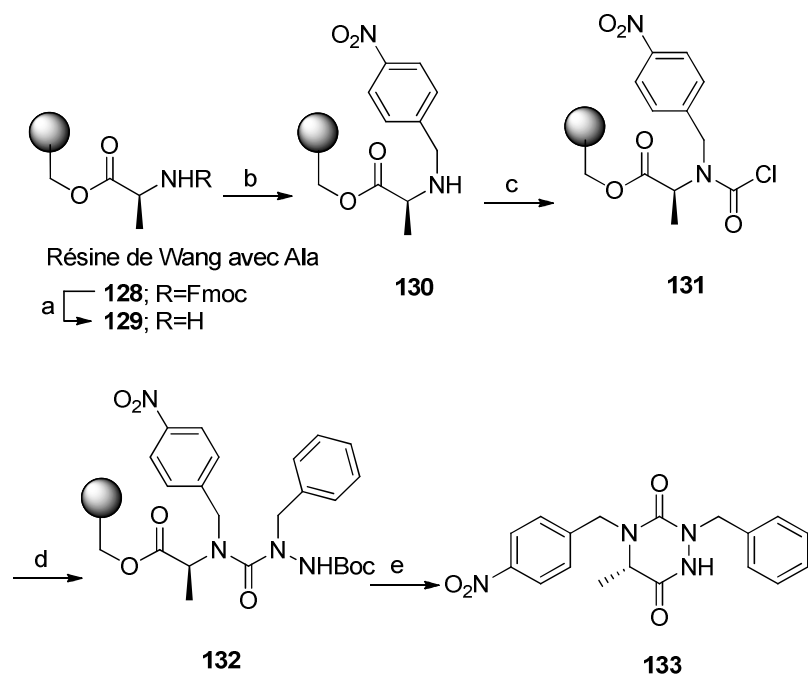
(a) 20% pipéridine/DMF, 2x15 min ; (b) benzaldéhyde, TMOF, NaBH₃CN, AcOH 1 %, 90 min ; (c) triphosgène, 2,4,6-collidine, THF, 30 min ; (d) alkyl/benzyl carbazate de *tert*-butyle, DIEA, THF, 70 °C, 1 nuit ; (e) TFA/H₂O (95/5, v/v), 1 h.

Figure 105 : Synthèse sur support solide des 1,2,4-triazine-3,6-iones 2,4,6-trisubstituées

Après avoir développé une voie d'accès aux aza-DCP, nous avons étudié leur structure 3D par des analyses RMN et RX.

3. Structure des 1,2,4-triazine-3,6-diones : Etude RMN et RX

Une 1,2,4-triazine-3,6-dione 2,4,5-trisubstituée portant un substituant nitro benzylique en position R₂ (composé **133**) a été synthétisée sur support solide. La synthèse de l'aza-DCP **133** est décrite dans la Figure 106. La voie de synthèse est la même que celle décrite précédemment, après cyclisation-libération, on obtient l'aza-dicétopipérazine **133** avec un rendement global de 28% (5 étapes).



(a) 20% pipéridine/DMF, 2x15 min ; (b) 4-nitrobenzaldéhyde, TMOF, NaBH₃CN, AcOH 1%, 90 min ; (c) triphosgène, 2,4,6-collidine, THF, 30 min ; (d) composé **117**, DIEA, THF, 70 °C, 1 nuit ; (e) TFA/H₂O (95/5, v/v), 1 h, 30%.

Figure 106 : Préparation de l'aza-dicétopipérazine 133

Des cristaux de la 1,2,4-triazine-3,6-dione 2,4,5-trisubstituée **133** ont été obtenus. L'analyse par rayon X a permis de déterminer la conformation du châssis ainsi que l'arrangement spatial des chaînes latérales. La représentation ORTEP montre que l'hétérocycle adopte une conformation pseudo-bateau (Figure 107). Les atomes C2-C3-N2-N3 sont plans alors que les atomes N3-C1-N1-2 montrent un angle de torsion de -33 °. Le groupement méthyle C4 (substituant R₁) est orienté en pseudo axial du même côté du plan que le groupement benzyle sur le N3 (substituant R₃). L'hydrogène pseudo équatorial sur le C2 montre la même orientation spatiale que le groupement p-nitrobenzyl sur le N1 (groupement R₂).

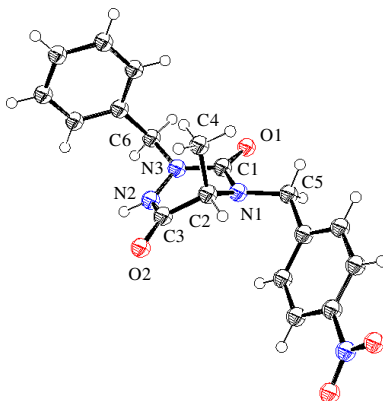


Figure 107: Vue ORTEP du composé 133

Afin de mieux appréhender l'organisation spatiale de la molécule en solution, une étude RMN du composé **133** a également été effectuée dans différents solvants deutérés, aprotique (chloroforme), protique/polaire (méthanol) ou aprotique/polaire (DMSO) (Figure 108). Dans le chloroforme deutéré à 298 K, les protons benzyliques forment un quartet AB pour H6a,b ($\Delta\delta_{AB} = 0.11$, $J_{AB} = 15.2$ Hz) et un motif AX pour H5a,b centré à 4.89 et 4.17 ppm ($\Delta\text{ppm} = 0.72$, $J_{AX} = 15.9$ Hz). Dans un mélange chloroforme/méthanol (1/1, v/v), les quatre protons H5a,b et H6a,b résonnent comme un système AX ($\Delta\text{ppm} = 0.71/0.68$, $J_{AX} = 15.2/15.8$ Hz) avec des petites modifications de leur déplacement chimique en comparaison de ceux obtenus dans le chloroforme. Dans le DMSO deutéré, les pics ont les mêmes déplacements chimiques à TA ou à 390 K mais sont bien mieux résolus lorsque la température augmente dû au changement de temps de relaxation. A 390K, les protons diastéréotopiques H5a,b et H6a,b montrent également un système AX ($\Delta\text{ppm} = 0.45/0.48$, $J_{AX} = 15.4/15.9$ Hz). Ces résultats montrent que la nature du solvant ainsi que la température n'ont que très peu d'influence sur le déplacement chimique et par conséquent le changement de conformation du châssis. Que ce soit dans les solvants protiques ou aprotiques, l'aza-dicetopiperazine **113** est plutôt rigide et a une structure figée avec une rotation bloquée au niveau des CH₂ des groupements phényles. Les structures chimiques 3D orientant les substituants dans l'espace hors d'un plan sont sous-représentées en chimie médicinale et constituent d'excellentes plates-formes pour essayer d'optimiser les interactions entre petites molécules et cibles biologiques. L'aza-dicétopipérazine **133** est un bon exemple de structure rigide orientant les substituants dans un espace 3D.

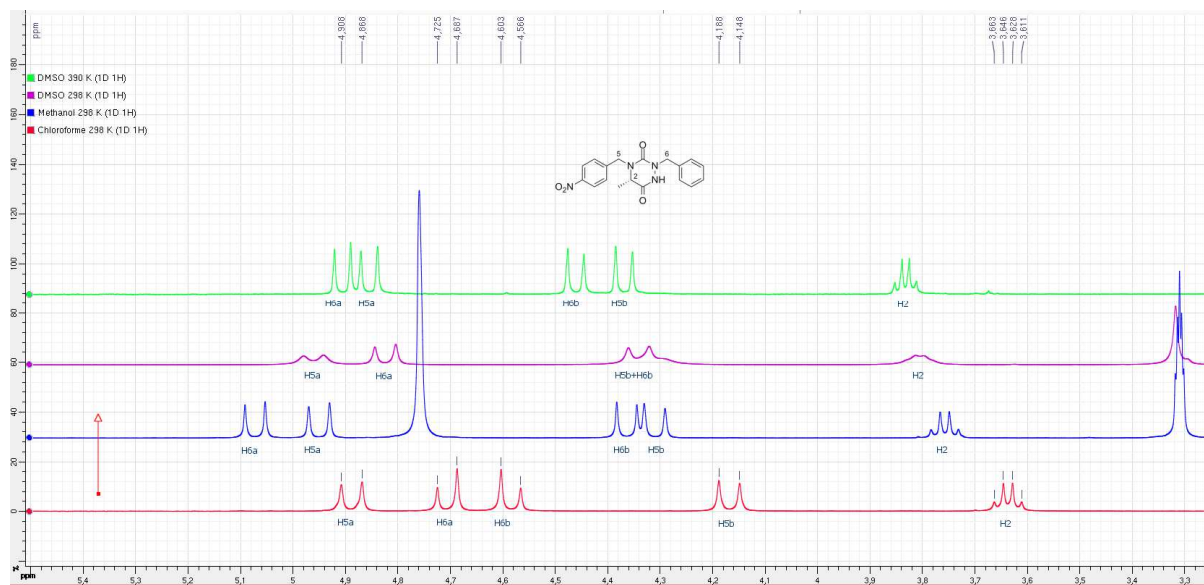
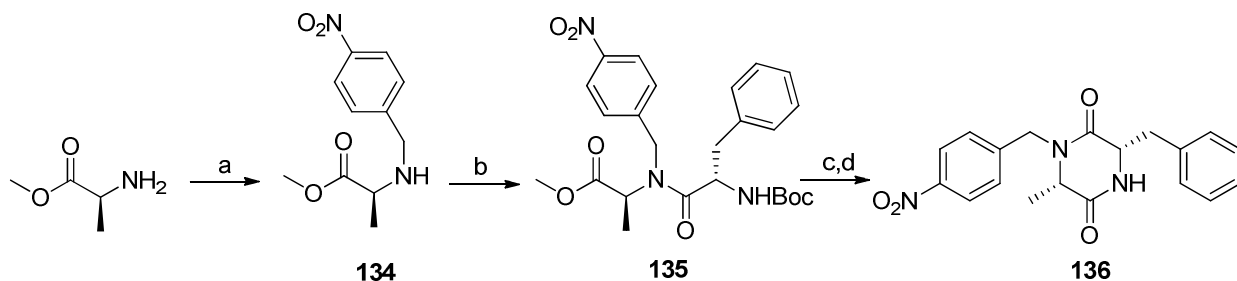


Figure 108 : Superposition des spectres RMN de l'aza-décétopipérazine **133 dans différentes conditions de solvants et températures.**

La dicétopipérazine **136** correspondante avec un carbone à la place de l'azote N3 est synthétisée pour pouvoir comparer l'organisation des substituants et la rigidité du châssis avec l'aza-dicétopipérazine **133** (Figure 109). La synthèse se fait en solution en 4 étapes. L'amination réductrice entre l'amine primaire de l'ester d'alanine et le 4-nitrobenzaldéhyde est réalisée avec un rendement de 60%. Le composé **134** est couplé avec la Boc-L-Phe-OH en présence de triphosgène et de 2,4,6-collidine pour obtenir le dipeptide **135** correspondant avec un rendement de 60%. L'amine est déprotégée dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v), la cyclisation de la dicétopipérazine ne s'effectue pas en milieu acide, contrairement à l'aza-DCP. La cyclisation est alors réalisée dans le DMF en présence de triéthylamine à 60 °C pendant 3 h pour obtenir la dicétopipérazine **136**.



(a) Benzaldéhyde, NaBH₄, Et₃N, méthanol, 2 h, 60% ; (b) Boc-L-Phe-OH, 2,4,6-collidine, triphosgène, THF, 1 nuit, 60% ; (c) TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v), 30 min, quant ; (d) Et₃N, DMF, 60 °C, 3 h, 60%.

Figure 109 : Synthèse de la dicétopipérazine **136**

La même étude RMN est effectuée (Figure 110). On constate les mêmes résonances pour le CH₂ benzylique que celles de l'aza-dicétopipérazine **133**. La structure de la dicétopipérazine **136** est plutôt figée. Il n'y a pas plus de changement de conformation du châssis en fonction de la température et du solvant. On constate dans le chloroforme que les protons H_{9a,b} du groupement benzyle de la phénylalanine résonnent sous la forme d'un système AB et dans le DMSO et le méthanol sous la forme d'un système AX. Dans le chloroforme deutéré à 298 K, les protons benzyliques forment un quartet AB pour H_{9a,b} ($\Delta\delta_{AB} = 0.096$, $J_{AB} = 13.6$ Hz) et un motif AX pour H_{7a,b} centré à 5.11 et 4.19 ppm ($\Delta\text{ppm} = 0.92$, $J_{AX} = 15.4$ Hz). Comme pour l'aza-dicétopipérazine **133**, à la fois les solvants et la température n'ont que très peu d'influence sur le déplacement chimique indiquant qu'il n'y a pas de changement de conformation du châssis.

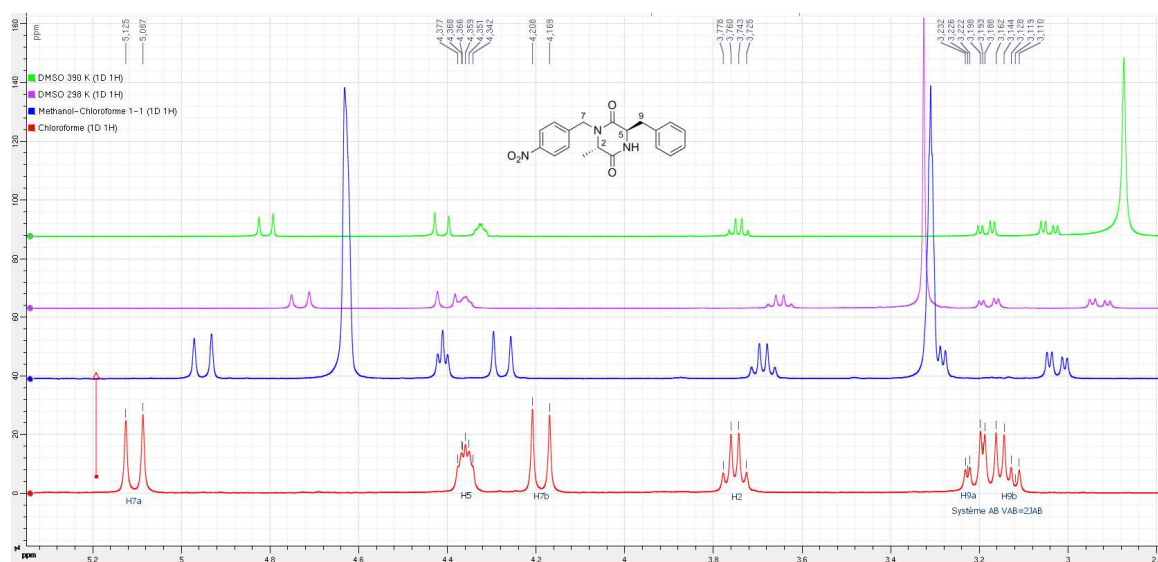


Figure 110 : Superposition des spectres RMN de la dicétopipérazine 136 dans différentes conditions de solvant et température

En conclusion, l'aza-dicétopipérazine a une conformation relativement figée avec une rotation bloquée au niveau des CH₂ des phényles. La dicétopipérazine correspondante a été synthétisée afin de comparer sa structure 3D avec celle des aza-dicétopipérazines. L'étude par résonance magnétique nucléaire permet de tirer comme conclusions préalables que la structure de la dicétopipérazine est également relativement figée avec rotation bloquée au niveau des CH₂. La cristallisation (qui est en cours) permettra de nous renseigner sur l'orientation relative des substituants et la forme adoptée par le cycle à 6. Des études de solubilité, de stabilité dans le PBS et dans le plasma permettront de comparer les paramètres physicochimiques des aza-DCP et des DCP.

4. Synthèse et évaluation du dérivé aza-dicétopipérazine **115** comme mime de l'ocytocine

i. Synthèse du dérivé aza-dicétopipérazine **115**

La synthèse de l'aza-dicétopipérazine **115** (Figure 111) est réalisée selon la stratégie présentée plus haut à partir de l'ester méthylique de L-isoleucine bien moins coûteuse que l'ester méthylique de D-isoleucine

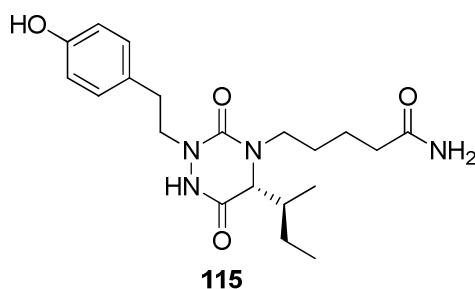
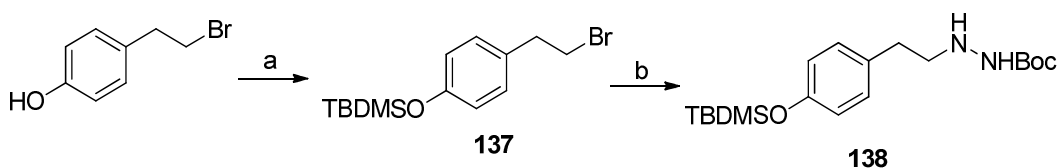


Figure 111 : Structure de l'aza-dicétopipérazine conçue par modélisation moléculaire

La stratégie de synthèse suivante a été utilisée. Tout d'abord le dérivé hydrazine est préparé en deux étapes. La première étape est la protection du 4-(2-bromoéthyl)phénol par un groupement TBDMS avec un rendement de 95%¹⁹¹. Le carbazate de *tert*-butyle est monoalkylé à partir du composé **137** pour obtenir le dérivé alkyl carbazate de *tert*-butyle **138** (62%).

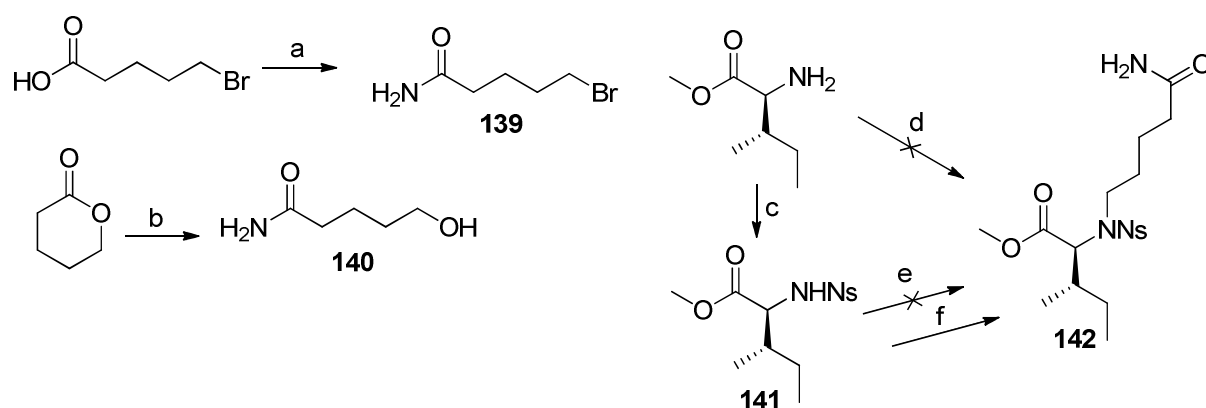


(a) TBDMSCl, imidazole, THF, 1 h, 95% ; (b) Boc-NH-NH₂, DMF, 80 °C, 1 nuit, 62%.

Figure 112 : Préparation du dérivé alkyl carbazate de *tert*-butyle **138**.

Plusieurs voies d'accès au composé alkylé **142** ont été envisagées (Figure 113). La première voie de synthèse consiste à alkyler directement l'amine primaire de l'isoleucine méthyle ester à partir de la chaîne bromo carboxamide **139**. Le produit n'a pu être obtenu que sous forme de traces. Le produit dialkylé se forme majoritairement. La deuxième voie de synthèse consiste à protéger l'amine primaire du dérivé ester méthylique d'isoleucine avec un groupement nosyle. Ce dernier permet de désactiver l'azote en le rendant moins

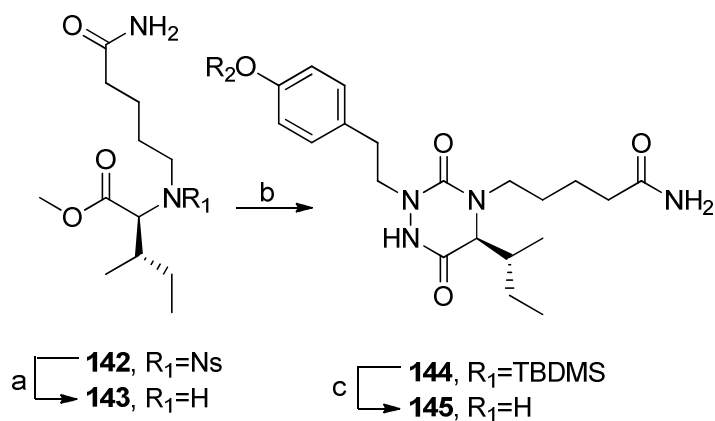
nucléophile. En effet, le nosyle est électroattracteur et rend le proton plus acide. Cependant, il est impossible d'alkyler le produit **141** nosylé même en chauffant une nuit à 100 °C en présence de carbonate de césium. L'azote est sans doute trop désactivé et utiliser une base plus forte n'est pas possible car la molécule présente un centre asymétrique susceptible de racémiser. La troisième voie de synthèse est une réaction de Mitsunobu à partir du dérivé nosylé **141**. Pour cela la chaîne alcool carboxamide est préparée en une étape par ouverture du tétrahydro-2H-pyran-2-one¹⁹². La réaction de Mitsunobu est réalisée entre les composés **141** et **140** en présence d'ADDP, de PPh₃ dans le THF pour obtenir le produit alkylé **142** avec un rendement de 66%.



(a) SOCl₂, NH₄OH, 1 nuit, 60% ; (b) NH₄OH 30 %, 1 h, 70% ; (c) NsCl, pyridine, CH₂Cl₂, 3 h, 70% ; (d) composé **139**, K₂CO₃, DMF, 1 nuit, TA ou 80 °C, 0% ; (e) composé **139**, Cs₂CO₃, DMF, 100 °C, 1 nuit, 0% ; (f) composé **140**, ADPP, PPh₃, THF, 1 nuit, 66%.

Figure 113 : Différentes voies d'accès au dérivé alkylé 142

Le groupement amino est déprotégé en présence de thiophénol et de carbonate de potassium dans le DMF (quant.). Les dérivés **143** et **138** sont couplés par un lien urée par activation de l'alkyl carbazate de *tert*-butyle **138** avec le triphosgène et déplacement avec l'amine secondaire **143** du chlorure de carbamoyle intermédiaire. Le déplacement de ce dernier est difficile et nécessite de chauffer le mélange à 110 °C pendant deux jours pour former le semicarbazide. Sous l'effet de la température, la cyclisation thermique de la molécule se produit pour conduire au dérivé **144** (22%). Le phénol est déprotégé dans une solution de TBAF 1M dans le THF pour obtenir l'aza-DCP **145** (Figure 114).



(a) thiophénol, K₂CO₃, 3 h, DMF, quant ; (b) triphosgène, DIEA, composé **138**, THF, 2 jours, 110 °C, 23% ; (c) TBAF 1M, THF, 1 nuit, 55%.

Figure 114 : Préparation du dérivé aza-dicétopipérazine 145

La modélisation nous indique que le centre asymétrique de l'isoleucine doit être de configuration R inverse. Aussi, la synthèse du dérivé de conformation absolue R, l'aza-dicétopipérazine **115**, est réalisée à partir de l'ester méthylique de la D-isoleucine en utilisant les protocoles optimisés décrits ci-dessus (Figure 115). Ainsi le composé **115** est obtenu en 8 étapes.

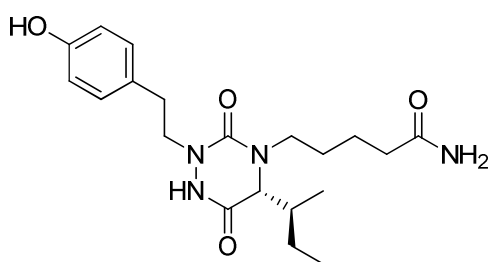


Figure 115 : Structure de l'aza-dicétopipérazine 115

ii. Evaluation des dérivés aza-dicétopipérazine 115 et 145

Une fois synthétisées, l'affinité et la fonction des deux aza-dicétopipérazines **115** et **145** ont été mesurées (Tableau 35) en utilisant le test de liaison TR-FRET décrit dans la *Partie 1 Chapitre 1*.

| Composé | V _{1a} R | | | V ₂ R | | | OXTR | | |
|------------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|
| | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c |
| 145 | 11538 | ns ^d | 600±0 | 9183 | nd ^f | nd ^f | 835 | ns ^d | >1000 |
| 115 | 16153 | ns ^d | 1400±141 | 12857 | nd ^f | nd ^f | 5785 | ns ^d | >1000 |

^a Les valeurs de K_i sont exprimées en nM et sont déterminées par TR-FRET sur cellules exprimant les récepteurs de la vasopressine V_{1a}, V₂ et de l'ocytocine marqués en utilisant la technologie SNAP-tag et incubés en présence d'un ligand fluorescent marqué au DY647 (20 nM) et en concentration croissante de compétiteurs. ^b Les valeurs d'EC₅₀ sont exprimées en nM, accompagnées de l'effet maximal mesuré en pourcentage par rapport à la réponse maximale de l'OT et de l'AVP et correspondent à la moyenne ±SEM de deux déterminations indépendantes. ^c Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en nM et correspondent à la moyenne ±SEM de deux déterminations indépendantes. ^d ns (non significatif) pour 5-10% de réponse à 1 μM par rapport à la stimulation maximale de l'agoniste endogène. ^e ns (non significatif) pour 5-10% d'inhibition de la réponse induite par l'agoniste endogène à [ligand]=1 μM ^f nd (non déterminé)

Tableau 35 : Affinités et fonctions des dérivés aza-dicétopipérazines 115 et 145

On peut voir que le composé **145** a une affinité préférentielle pour le récepteur de l'ocytocine (13.8 fois plus sélectif par rapport au récepteur de la vasopressine V_{1a} et 11 fois plus sélectif par rapport au récepteur de la vasopressine V₂). Le composé **115** a une moins bonne affinité que le composé **145** pour le récepteur de l'ocytocine mais également pour les autres sous-types de récepteurs.

Etonnamment, le composé affin est le composé avec le centre chiral inversé par rapport à ce qui avait été prévu. Afin de contrôler la pureté optique des deux composés, une mesure du pouvoir rotatoire est réalisée. Les deux valeurs de α_D pour deux énantiomères doivent être à l'opposé l'une de l'autre. Or pour le composé **145** la valeur de α_D est de +9 et pour le composé **115** la valeur de α_D est de +4. Les valeurs obtenues montrent qu'il y a eu racémisation partielle lors de la synthèse. Ainsi une nouvelle synthèse est en cours de développement qui va nous permettre d'obtenir les composés **115** et **145** optiquement purs. Une fois obtenus, l'affinité des composés sera évaluée.

5. Dicétopipérazine versus aza-dicétopipérazine : importance du châssis pour l'activité biologique

i. Bioisostérie

Le concept d'isostérie est le remplacement d'un atome ou d'un groupe d'atomes par un autre qui présente des propriétés physico-chimiques similaires. Le concept a été introduit en 1919 par Langmuir¹⁹³ qui s'est attardé sur la similarité électronique et stérique d'un arrangement d'atomes, de groupes d'atomes, de radicaux et de molécules. Il décrit 21

groupes d'isostères. En 1932, H. Erlenmeyer¹⁹⁴ décrit les isostères comme des atomes, ions et molécules qui ont des couches d'électrons périphériques considérées comme identiques. L'application de l'isostérie pour modifier une partie d'une molécule biologiquement active pour concevoir une autre molécule active a donné lieu au terme bioisostérie. Friedman¹⁹⁵ décrit les bioisostères comme tous les atomes et molécules qui entrent dans la définition des isostères et qui montrent une activité biologique similaire. En 1970, Burger classifie les bioisotères en deux catégories : les bioisostères classiques et les non-classiques suivant leur degré de similarité stérique et électronique.

ii. **Etude de l'influence du châssis sur l'activité biologique : modification d'un antagoniste dérivé de dicétopipérazine du récepteur de l'ocytocine en dérivé aza-dicétopipérazine.**

Dans le cas des aza-dicétopipérazines, la question qui se pose est : le remplacement d'un atome de carbone par un atome d'azote dans une dicétopipérazine induit-il une modification de l'activité biologique ? L'aza-dicétopipérazine est-elle un bioisostère de la dicétopipérazine ? Pour répondre à ces questions, nous avons sélectionné comme référence un antagoniste non-peptidique du récepteur de l'ocytocine construit autour d'un châssis dicétopipérazine.

Dans la littérature, la 2,5-dicétopipérazine **146** est décrite comme un antagoniste sélectif du récepteur de l'ocytocine⁹⁴. Les diastéréoisomères actifs (RRR, RRS, RSS) ont des affinités comprises entre 3.9 et 79 nM. La stratégie est d'étudier l'influence du châssis moléculaire sur l'activité de cette molécule, plus particulièrement le remplacement un atome de carbone par un atome d'azote pour former l'aza-dicétopipérazine **147** (Figure 116).

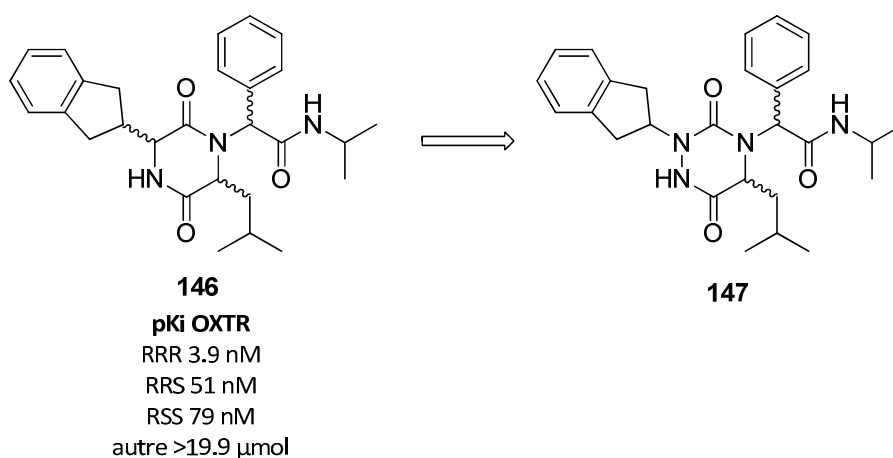


Figure 116 : Etude de l'influence du châssis sur l'activité biologique par le remplacement de la dicétopipérazine 146 par l'aza-dicétopipérazine 147.

Une réaction de Ugi « en un pot » permet d'obtenir la dicétopipérazine **146**. Cette voie de synthèse n'est pas envisageable pour la synthèse de l'aza-dicétopipérazine **147**. La stratégie envisagée est décrite dans la Figure 117.

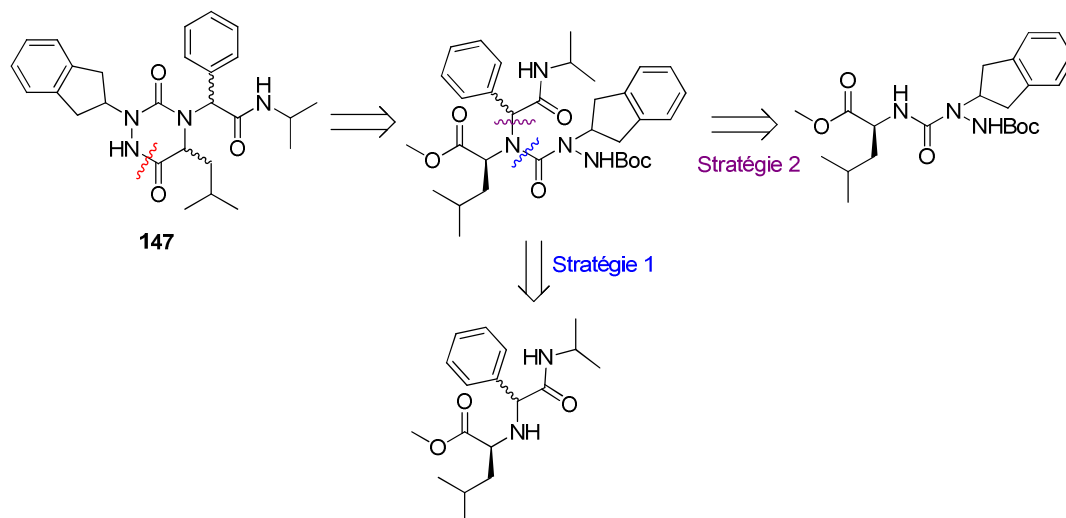
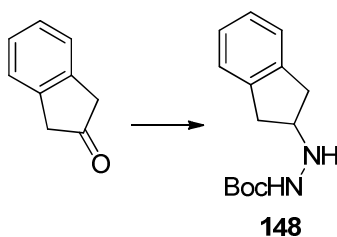


Figure 117 : Stratégies de synthèses de l'aza-dicétopipérazine **147**

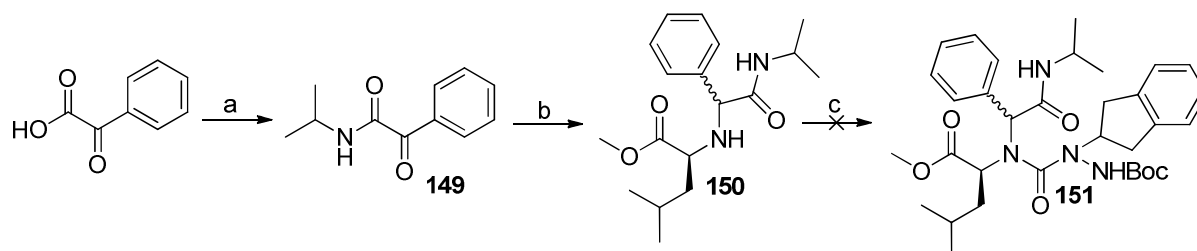
La première voie de synthèse envisagée pour former l'aza-dicétopipérazine **147** consiste à alkyler l'amine primaire puis former le lien urée (Figure 119). La première étape est la formation de l'amide par couplage entre l'acide 2-oxo-2-phénylacétique et la 2-propanamine¹⁹⁶. La deuxième étape est une amination réductrice de l'amido-cétone **149** par l'ester méthylique de la leucine. Dans les conditions classiques ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, AcOH , Et_3N), la formation de l'imine n'a pas lieu sans doute à cause de la faible réactivité de la cétone et de l'encombrement stérique. L'ajout d'isopropylate de titane comme acide de Lewis permet d'activer la cétone et d'obtenir le composé **150** avec un rendement de 30%^{197,198}. Le composé **150** est activé à l'aide de triphosgène et est déplacé avec le 2-indanyl carbazate de *tert*-butyle **148**, lui-même obtenu en deux étapes en un pot par amination réductrice entre le carbazate de *tert*-butyle et la 2-indanone (Figure 118).



(a) carbazate de *tert*-butyle, NaBH_3CN , AcOH , MeOH , 2 h, 57%.

Figure 118 : Préparation du dérivé *tert*-butyl carbazate **148**

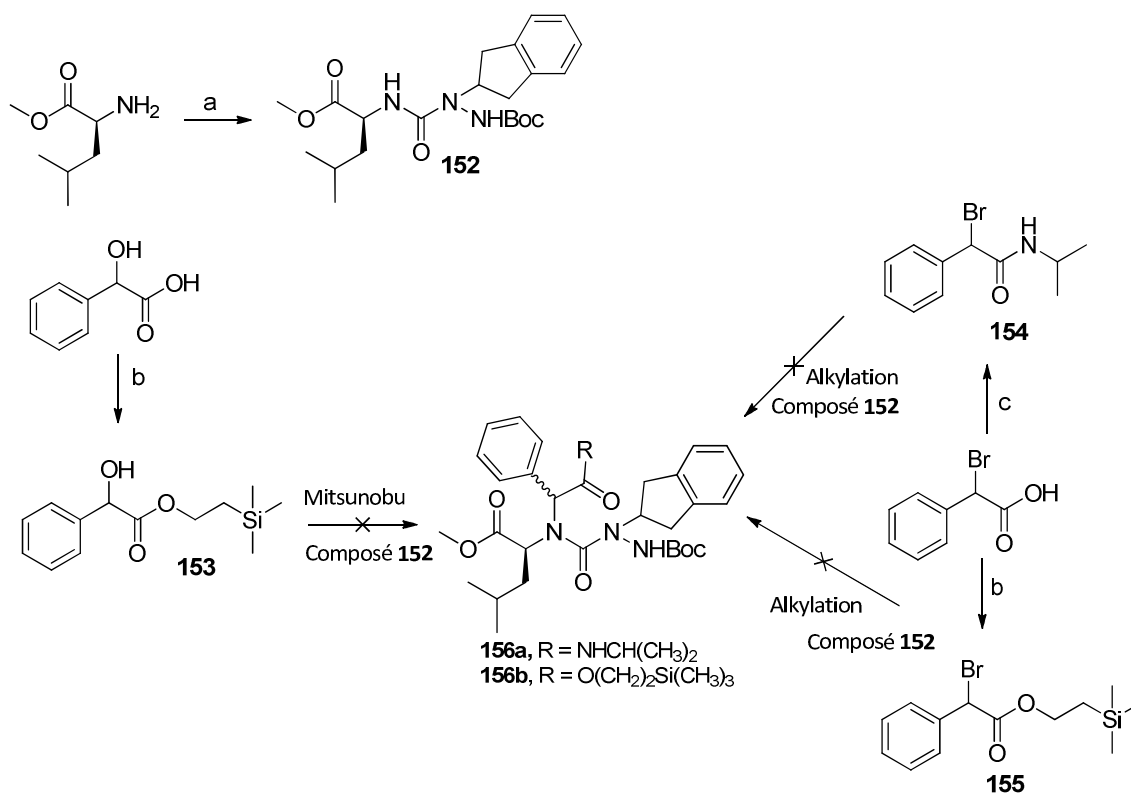
Malheureusement, et malgré l'évaluation de différentes conditions expérimentales, la formation du semicarbazide **151** n'est pas possible.



(a) 2-propanamine, SOCl_2 , Et_3N , CH_2Cl_2 , DMF, 16 h, 77% ; (b) ester méthylique d'isoleucine, isopropoxide de titane (IV), $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, AcOH, DCE, toluène, 16 h, 30% ; (c) composé **148**, triphosgène, DIEA, THF, 1 nuit, 70 °C.

Figure 119 : Première voie de synthèse du composé **151**

La deuxième voie de synthèse envisagée consiste à coupler directement le dérivé 2-indanyl-*tert*-butyl carbazate avec l'ester méthylique de l'isoleucine à l'aide de triphosgène. Pour obtenir le dérivé **156** (a ou b), différentes conditions ont été expérimentées : soit une réaction de Mitsunobu entre l'azote de l'urée et un dérivé alcool phénylacétate soit une réaction d'alkylation entre l'azote de l'urée et un dérivé bromé phénylacétamide (Figure 120).



(a) composé **148**, triphosgène, DIEA, THF, 2 h, 70 °C, 99% ; (b) 2-(triméthylsilyl)éthanol, SOCl_2 , CH_2Cl_2 , 24 h, 30-53% ; (c) 2-propanamine, EDCl, HOBT, CH_2Cl_2 , 1 nuit, 42%.

Figure 120 : Deuxième voie de synthèse du composé **151**

Préalablement les acides 2-hydroxy-2-phénylacétique et 2-bromo-2-phénylacétique sont protégés sous forme d'esters de 2-(triméthylsilyl)éthyle formés par estérification de l'acide carboxylique avec le 2-(triméthylsilyl)éthanol. Le semicarbazide **152** est engagé dans une réaction d'alkylation en utilisant soit les conditions de réaction Mitsunobu soit par substitution nucléophile du brome. Les différentes conditions réactionnelles sont regroupées dans le Tableau 36.

| | Conditions | Composé | Rendement ^a (%) |
|----------|--|---------|----------------------------|
| 1 | DEAD, PPh ₃ , THF, 1 nuit | 153 | 0 |
| 2 | ADDP, PBu ₃ , THF, 1 nuit | 153 | 0 |
| 3 | K ₂ CO ₃ , DMF, 1 nuit, 60 °C | 155 | 0 |
| 4 | K ₂ CO ₃ , KI, DMF, 1h | 155 | 0 |
| 5 | K ₂ CO ₃ , DMF, MW, 10 min, 80 °C | 155 | 0 |
| 6 | Cs ₂ CO ₃ , DMF, 1 nuit | 155 | 20 |
| 7 | Cs ₂ CO ₃ , KI, DMF, 1 nuit | 155 | 20 |
| 8 | Cs ₂ CO ₃ , DMF, MW, 10 min, 80 °C | 155 | 0 |
| 9 | Cs ₂ CO ₃ , DMF, 1 nuit | 154 | 0 |

(^a rendement estimé par HPLC)

Tableau 36 : Conditions réactionnelles de la réaction de Mitsunobu et d'alkylation pour former les composés 156a et 156b

Les deux différentes conditions de Mitsunobu ne permettent pas d'obtenir le produit attendu, seuls les produits de départ étant isolés. L'alcool est sans doute trop encombré pour se complexer à la phosphine. Différentes conditions d'alkylation ont été évaluées en utilisant le dérivé bromé **155**. En utilisant le carbonate de potassium comme base, à température ambiante, aucun produit ne se forme. En chauffant, le dérivé bromé **155** se dégrade. Le remplacement du carbonate de potassium par le carbonate de Césium permet, au bout d'une nuit à TA en présence ou non de KI, de former un produit avec un temps de rétention de 8.3 min qui est mis en évidence par LC-MS. La masse observée pourrait correspondre à un produit d'alkylation soit sur l'amide soit sur l'azote protégé par le groupement Boc ($[M+Na^+]=676.2$). L'optimisation des conditions d'alkylation ne permet pas d'avoir un rendement estimé supérieur à 20% (Tableau 36). Le remplacement du dérivé bromé **155** par le dérivé bromé **154** ne permet pas de détecter de produit formé. Un échantillon du brut réactionnel contenant l'intermédiaire **157** est dissous dans du TFA. La LC-MS nous indique qu'il n'y a pas cyclisation de la molécule mais un produit de masse $[M+H^+]=454.2$ est obtenu qui pourrait correspondre au produit **158** (Figure 121).

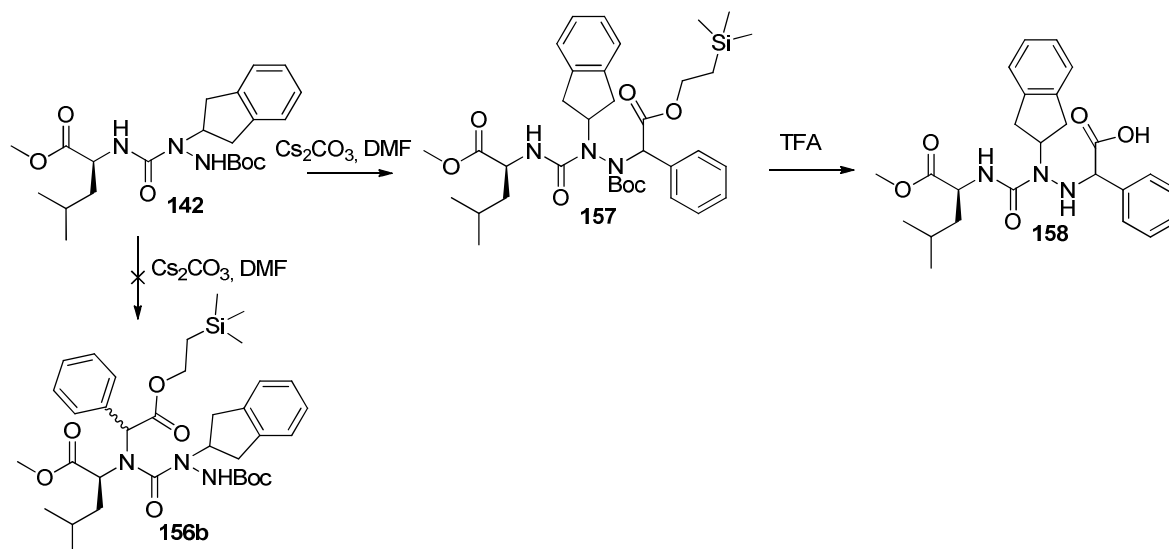


Figure 121 : Produit secondaire obtenu lors de l'alkylation du semicarbazide 142

Les aza-dicétopipérazines doivent normalement se former spontanément en milieu TFA. Trop peu de produit est obtenu pour faire une étude RMN des différents intermédiaires. Nous supposons que l'alkylation du semicarbazide n'a pas eu lieu sur l'azote du lien urée mais sur l'azote du carbazate de *tert*-butyle. La cyclisation des aza-dicétopipérazines ne peut se faire sans alkyler l'azote du lien urée (Figure 121). Les synthèses des composés **156a** et **156b** sont stoppées.

En perspective, il faudrait développer une voie d'alkylation du *tert*-butyle carbazate après avoir formé le lien urée. La stratégie serait de protéger l'amine avec un groupement phthalimide pour n'avoir qu'un azote accessible pour l'alkylation ou la Mitsunobu (Figure 122).

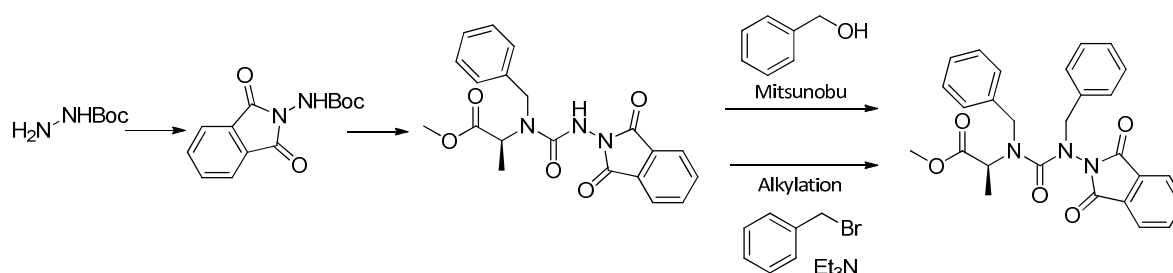


Figure 122 : Perspective pour la synthèse de l'aza-dicétopipérazine

III. Les 1,4-diazépin-2-ones

1. Introduction

Les 1,4-diazépin-2-ones ont de nombreuses propriétés pharmacologiques dues à leur potentiel à mimer les coudes β et γ des structures secondaires de peptides. Des études par diffraction de rayons X montrent que la 1,4-diazépin-2-one adopte une conformation en coude γ . Les 1,4-diazépin-2-ones sont connues pour avoir des propriétés anticonvulsives et antimorales ainsi qu'antibactériennes.

En 1997 est décrite la cyclisation des 1,4-diazépin-2-ones par réaction du bis-triflate de propanediyle avec un dipeptide en présence d'hydrure de sodium avec un rendement de 23%¹⁹⁹ (Figure 123.A.). En 2005, un groupe de Corée du sud décrit la cyclisation d'analogues dipeptidiques par l'attaque nucléophile intramoléculaire du bromoacétamide sans stéréosélectivité avec des rendements compris entre 42% et 84%²⁰⁰ (Figure 123.B.). Le groupe de Lubell, en 2006, décrit la synthèse de 1,4-diazépin-2-ones obtenues par amination réductrice intramoléculaire avec des rendements d'environ 50%²⁰¹ (Figure 123.C.).

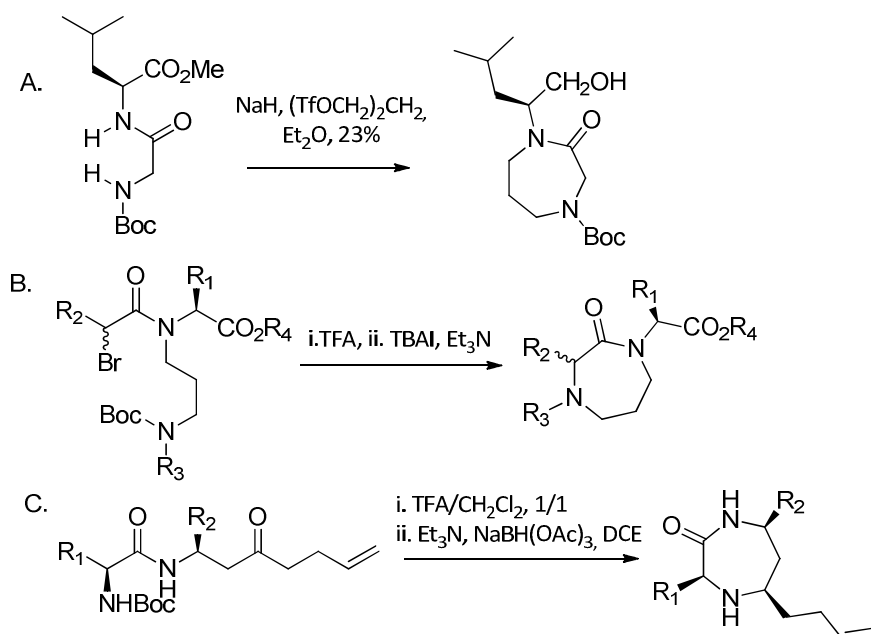


Figure 123 : Exemples de synthèse de 1,4-diazépin-2-ones décrites dans la littérature

Le groupe pharmaceutique Merck décrit en 2007 des inhibiteurs de DPP4 (dipeptidyl peptidase IV) construits autour de 1,4-diazépin-2-ones. Ces inhibiteurs permettent d'augmenter la tolérance au glucose chez les patients diabétiques. Différentes voies de synthèse des 1,4-diazépin-2-ones ont été développées : des conditions classiques de

couplage peptidique entre l'amine primaire et l'acide carboxylique avec EDC/HOBt ou par activation de l'ester avec l'acide de Lewis triméthylaluminium²⁰² (Figure 124.A.). A partir du dérivé nitrile, une cyclisation en « one pot » avec l'oxyde de platine comme catalyseur sous une atmosphère d'hydrogène permet au groupement nitrile d'être réduit en amine primaire qui peut se condenser sur la cétone pour former l'imine cyclique qui est ensuite réduite (Figure 124.B.). La troisième cyclisation est effectuée à l'aide de bromure de *tert*-butylmagnésium²⁰³ (Figure 124.C.)

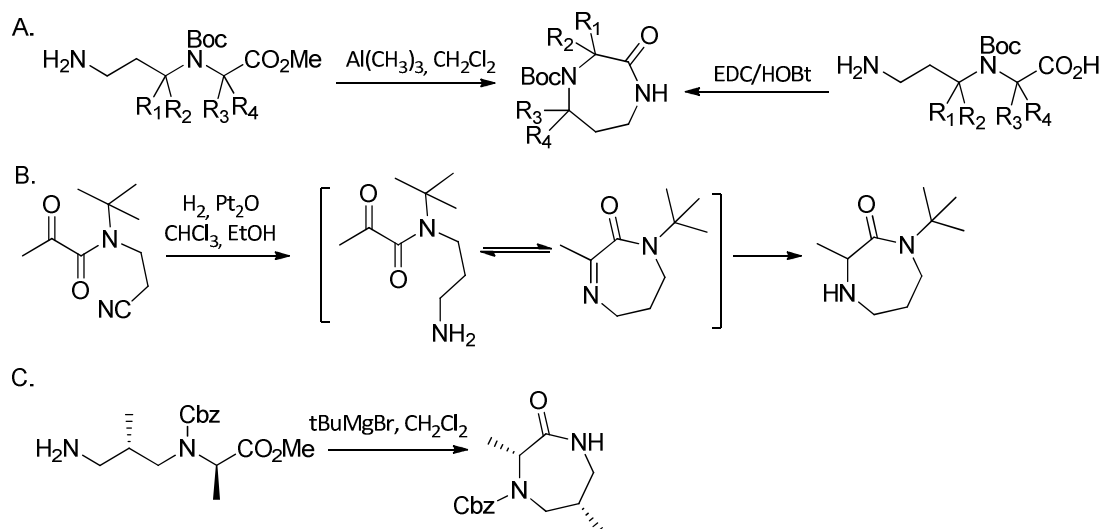


Figure 124 : Exemples de synthèse de 1,4-diazépine-2-ones décrites dans la littérature

Ce châssis 1,4-diazépine-2-one a été choisi pour orienter les trois acides aminés clés correctement dans l'espace. Une stratégie de synthèse originale a été développée pour former le cycle à 7 chaînons.

2. Synthèse du dérivé 1,4-diazépine-2-one 116

La synthèse du dérivé 1,4-diazépine-2-one **116** (Figure 125) s'effectue à partir d'un dérivé tyrosine non naturel. La stratégie envisagée est décrite dans la Figure 125.

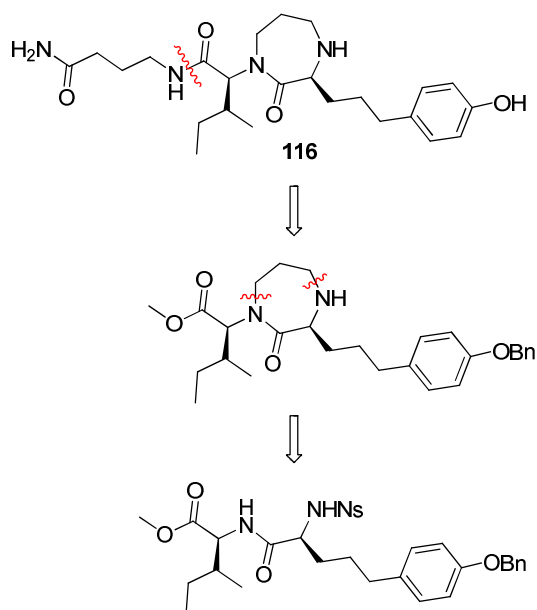
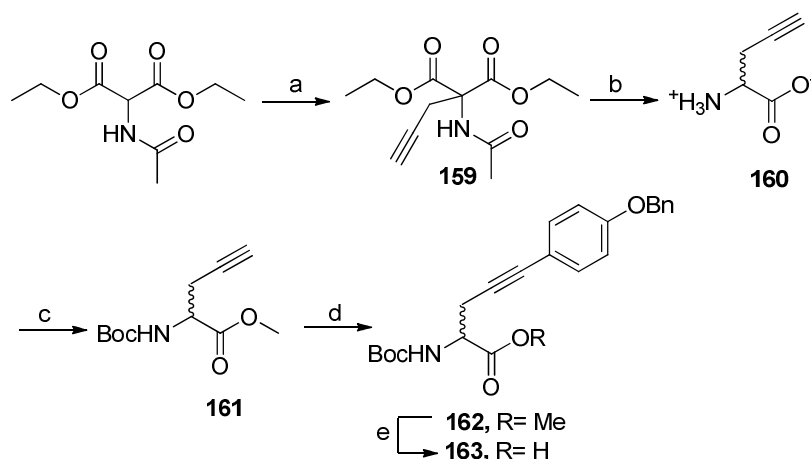


Figure 125 : Stratégie de synthèse de la 1,4-diazépin-2-one 116

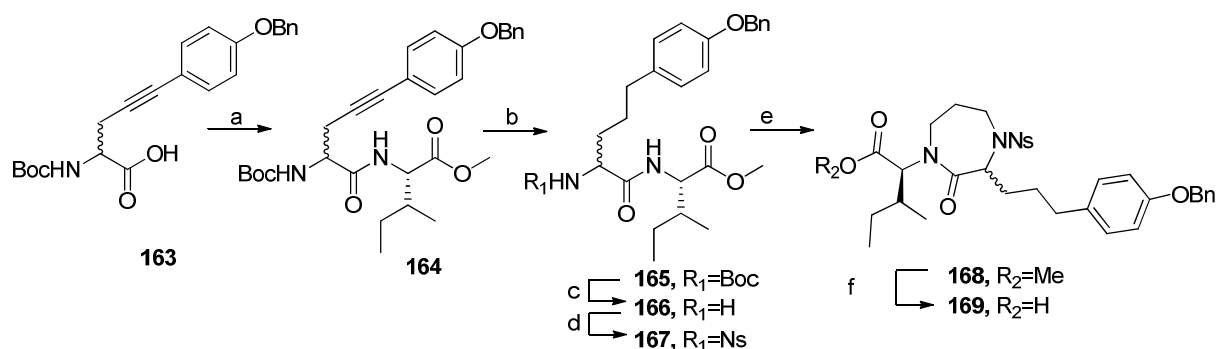
La substitution nucléophile du bromure de propargyle par le 2-acétamidomalonate de diéthyle permet d'obtenir l'intermédiaire **159** avec un rendement de 77%²⁰⁴ (Figure 126). Après hydrolyse acide, le zwitterion **160** est estérifié et protégé par un groupement Boc avec un rendement de 60%. La réaction de Sonogashira entre le composé **161** et le 1-(benzyloxy)-4-iodobenzène a été optimisée. Les meilleures conditions sont l'utilisation de Pd(PPh₃)₂Cl₂ en présence de triéthylamine et de CuI dans le DMF (66%). L'intermédiaire **162** est obtenu avec un rendement de 66%. L'ester est hydrolysé pour obtenir l'acide **163** (quant).



(a) CsCO₃, bromure de propargyle, ACN, MW, 130 °C, 10 min, 77% ; (b) HCl 6N, MW, 105 °C, 30 min, 85% ; (c) i. SOCl₂, MeOH, 1 nuit, ii. Boc₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 6 h, 60% ; (d) 1-(benzyloxy)-4-iodobenzène, Pd(PPh₃)₂Cl₂, Et₃N, CuI, DMF, 1 nuit, 40 °C, 66% ; (e) LiOH, H₂O/THF (3/1, v/v), 4 h, quant.

Figure 126 : Synthèse de l'intermédiaire 163

L'acide **163** est couplé à l'ester méthylique d'isoleucine en présence d'ECDI et HOBT (86%). On obtient deux diastéréoisomères en proportion 50/50 qui seront séparés lors de la dernière étape par HPLC semi-préparative. Lors de la déprotection du composé **164** dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v), on observe la dégradation du produit. Il semble que l'amine primaire s'additionne sur la triple liaison pour former un cycle à 5 chaînons. Pour pallier ces réactions secondaires, la triple liaison est réduite sélectivement avant de déprotéger l'amine. La réduction sélective de l'alcyne **164** est catalysée par Rh/C dans l'acétate d'éthyle sous une atmosphère d'hydrogène²⁰⁵. Ces conditions permettent de réduire l'alcyne sans toucher au groupement benzyle avec un rendement de 94%. L'amine du dérivé **165** est déprotégée par une solution d'HCl 4N aqueux dans le dioxane (quant.). L'amine primaire **166** est activée par un groupement nosyle, qui empêche également sa dialkylation, avec un rendement de 70%. La cyclisation est effectuée par une double substitution nucléophile sur le 1,3-dibromopropane en présence de K₂CO₃ pour obtenir le dérivé **169** (Figure 127).



(a) ester méthylique d'isoleucine, ECDI, HOBT, Et₃N, CH₂Cl₂, 1 nuit, 86% ; (b) Rh/C, AcOEt, 14 h, 94% ; (c) HCl 4N dans dioxane, 2 h, quant ; (d) NsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 3 h, 70% ; (e) 1,3-dibromopropane, K₂CO₃, 65 °C, 20 h ; (f) LiOH, THF/H₂O (3/1, v/v), 2 h, 46%.

Figure 127 : Synthèse de l'intermédiaire cyclisé **169**

Cette réaction a été optimisée sur un modèle simplifié avec une tyrosine (Figure 128). Une publication de 2008 décrit la synthèse de pipérazine en présence de 1,2-dibromoéthane et de carbonate de potassium en chauffant à 60 °C²⁰⁶. En s'inspirant de cette réaction, le 1,3-dibromopropane a été sélectionné pour former la diazépín-2-one. Les premières conditions réactionnelles (10 eq de K₂CO₃, 5 eq de 1,3-dibromopropane) ont conduit à la formation d'une nitroaniline **175** avec un rendement de 50%. Un résultat analogue avait été décrit précédemment par Bowman et Coghlan²⁰⁷. Selon ces auteurs, en présence d'un excès de base, l'intermédiaire alkylé **170** est déprotonné sur le carbone en α de l'azote ce qui génère

l'anion **171** qui se réarrange pour former l'anion **172**. Puis une réaction de S_NAr a lieu, favorisée par la présence d'un groupe nitro électro-attracteur, qui voit la formation d'un dioxyde de thiaziridine intermédiaire **173** et sa décomposition avec perte de dioxyde de soufre, ce qui mène à la nitro-aniline **175**.

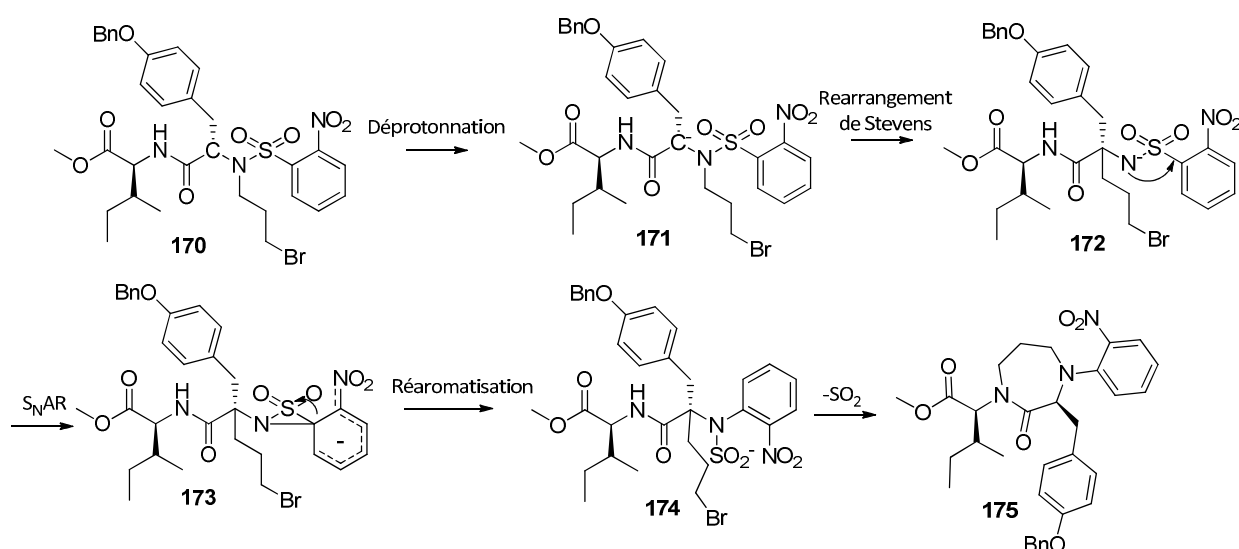


Figure 128 : Mécanisme réactionnel de formation du produit secondaire **175** lors de la cyclisation²⁰⁷

Sans excès de base aucun produit issu de ce réarrangement n'est observé. Après cyclisation, le produit est directement hydrolysé en présence de LiOH dans un mélange THF/eau (3/1, v/v) pour obtenir l'acide **169** avec un rendement de 46% sur deux étapes.

Le 4-aminobutanamide **178** est préparé en 3 étapes à partir de la pyrrolidin-2-one²⁰⁸. Le couplage de la 4-aminobutanamide **178** en présence de EDCI, HOBt et de triéthylamine dans le CH_2Cl_2 est suivi de la déprotection du groupement nosyle en présence de thiophénol et de carbonate de potassium pour obtenir le composé **181** avec un rendement sur deux étapes de 36%. Les conditions classiques de débenzylation par hydrogénolyse dans le méthanol avec comme catalyseur Pd/C vont entraîner la réduction d'un des carbonyles en hydroxyle. Les conditions thioanisole/TMSOTf 1M dans le TFA²⁰⁹ pendant 30 min suivies d'une purification par HPLC semi-préparative permettent d'obtenir les deux diastéréoisomères **182a** et **182b** avec un rendement quantitatif (Figure 129).

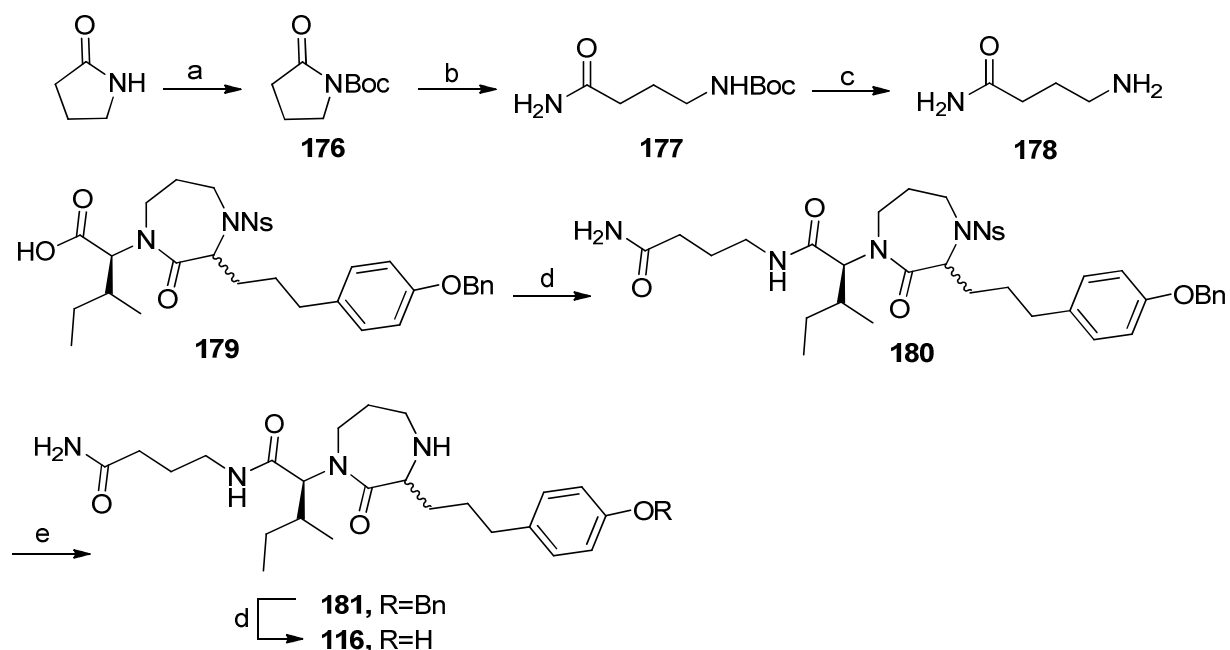


Figure 129 : Synthèse du dérivé 1,4-diazépin-2-one 116

3. Evaluation du dérivé 1,4-diazépin-2-one 116

L'activité fonctionnelle des deux diastéréoisomères a été testée par mesure du signal calcique seulement (la mesure d'affinité est en cours). Ces deux molécules ne sont ni agonistes, ni antagonistes à la fois pour le récepteur de l'ocytocine et pour le récepteur de la vasopressine V_{1a}. Ces résultats infèrent que nous n'avons pas réussi à préparer de ligands affins des deux récepteurs-cibles. La plate-forme 1,4-diazépin-2-one ne positionne donc probablement pas favorablement les chaînes latérales mimant celles de l'ocytocine.

IV. Les aza-peptides

1. Introduction

Les peptidomimétiques sont des molécules conçues pour garder les effets biologiques des peptides naturels et enlever les effets indésirables comme la faible biodisponibilité, la métabolisation rapide et la faible sélectivité pour leurs récepteurs endogènes. Les effets biologiques des peptides dépendant de leur conformation, l'introduction de contraintes

géométriques dans la structure de peptides peut augmenter la sélectivité des peptides actifs.

Les aza-peptides formés par le remplacement d'un carbone α par un atome d'azote dans un ou plusieurs acides aminés conduisent à la formation de coudes β dans les peptides. Le remplacement d'une liaison $C\alpha-C(O)$, disposant d'une flexibilité, par une liaison urée $N\alpha-C(O)$, plus rigide, réduit la flexibilité du peptide²¹⁰. Une étude a été réalisée sur l'influence de la méthylation des atomes d'azote du semicarbazide sur la conformation adoptée par le peptide²¹¹ (Figure 130). La méthylation sur l'azote N1 ou N2 ne perturbe pas les angles de torsion du squelette peptidique. Par contre la méthylation sur l'azote N3 change significativement les angles de torsions. Cette étude montre que les dérivés N-méthyle aza-acides aminés peuvent être utilisés comme initiateur d'hélices α ou de coudes β .

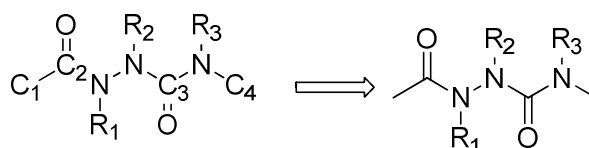


Figure 130 : Influence de la méthylation des azotes sur la conformation des aza-peptides

Plusieurs aza-peptides analogues de peptides biologiquement actifs montrent des activités biologiques semblables aux peptides endogènes. Le Zoladex est un analogue de l'hormone naturelle LHRH (l'hormone de libération de la lutéinostimuline) développé par les laboratoires *Zeneca* et utilisé comme traitement dans les cancers de la prostate et du sein²¹² (Figure 131.A). *Bristol-Myers* brevète en 1992, l'atazanavir, un aza-peptide inhibiteur de la protéase HIV-1²¹³ (Figure 131.B). En 2004, *Serono* brevète la synthèse d'un aza-peptide qui prévient l'agrégation de la protéine β amyloïde qui contribue à la destruction des neurones chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer²¹⁴ (Figure 131.C).

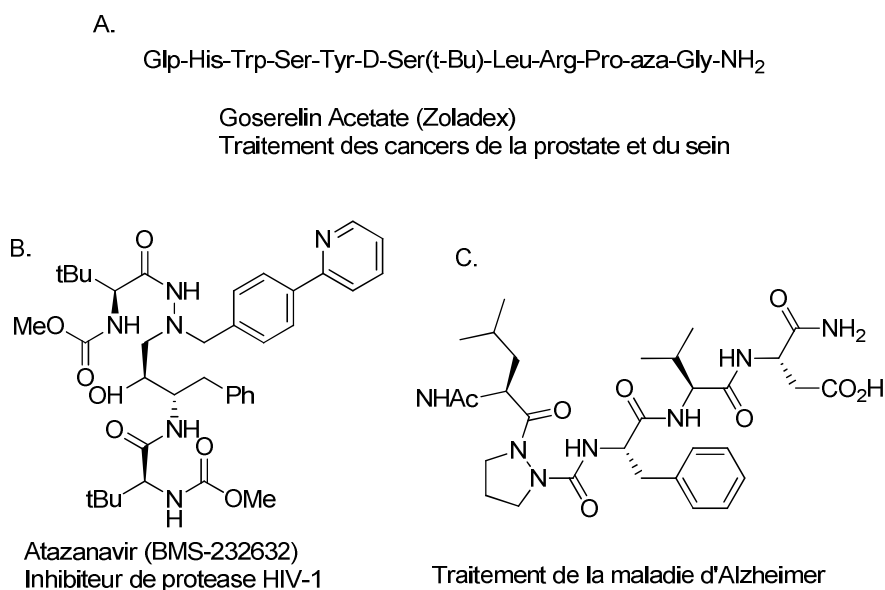


Figure 131 : Exemples d'aza-peptides biologiquement actifs¹⁸³

La synthèse d'aza-peptides peut être effectuée en solution ou sur support. La formation du lien urée entre l'hydrazine et la partie N-terminale du peptide peut s'effectuer de différentes manières. La plus classiquement utilisée est l'activation d'une des deux parties par la formation d'un chlorure d'acide ou d'un ester activé et la formation d'un isocyanate pour la partie N-terminale du peptide.

En 2003, le groupe du CEA à Saclay décrit la formation d'un produit secondaire lors de la synthèse d'aza-peptides contenant un motif Phe-pNA (N-(4-nitroanilyl)-N-benzylaza-urée) comme inhibiteur de l'activité PPIase (peptidylprolyl isomerase)²¹⁵. Lors de la déprotection du groupement Boc du composé semicarbazide, l'amine primaire se condense sur le lien ester pour former un aza-peptide à cycle à 9 atomes (Figure 132). Cet exemple d'aza-peptide cyclique à 9 atomes est le seul retrouvé dans la littérature.

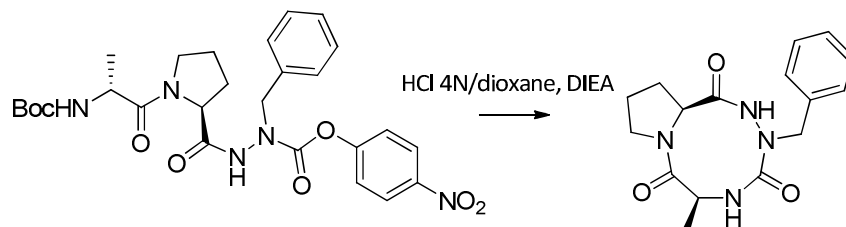


Figure 132 : Première synthèse d'aza-peptide cycliques à 9 atomes décrits dans la littérature²¹⁵

2. Synthèse d'aza-peptides cycliques, une réaction secondaire inattendue

Basée sur la synthèse des 1,2,4-triazine-3,6-diones 2,4,5-trisubstituées développées au laboratoire, la stratégie consiste à rajouter un acide aminé avant la formation de la triazinedione pour essayer de former des aza-peptides cycliques avec un cycle à 9 atomes comprenant 4 points de diversité (Figure 133).

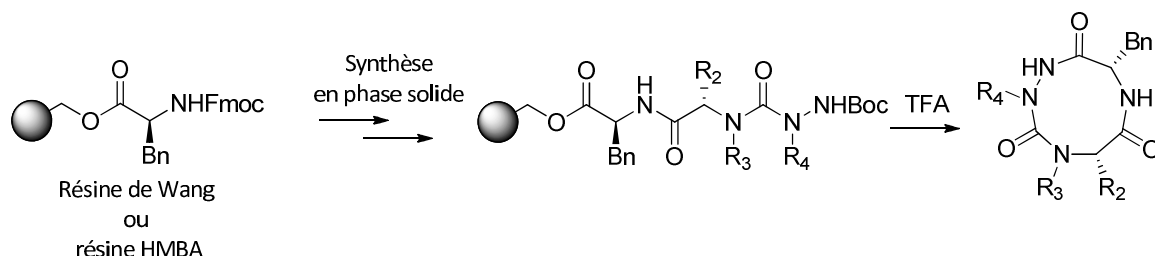
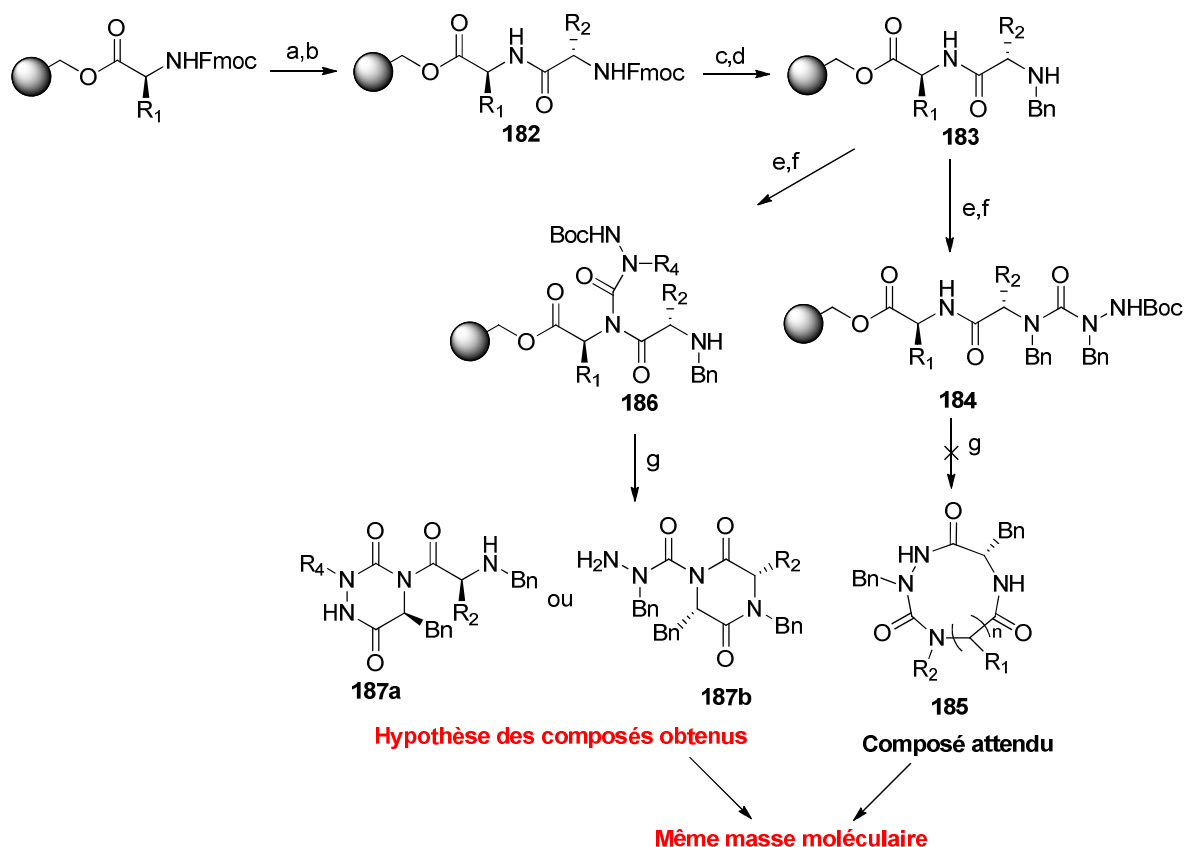


Figure 133 : Stratégie de synthèse pour former des aza-peptides cycliques

i. Première voie de synthèse

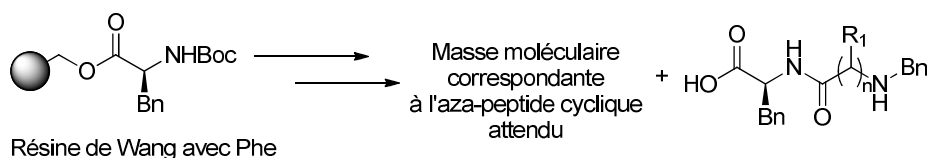
On part de la résine de Wang fonctionnalisée avec la phénylalanine protégée par un groupement Fmoc (Figure 134). L'amine est déprotégée dans une solution de 20% de pipéridine dans le DMF. Un premier acide aminé est couplé en présence de HBTU, HOBt et DIEA dans le DMF pour obtenir la résine **182**. L'amine primaire est déprotégée et une amination réductrice du benzaldéhyde en présence de NaBH_3CN dans le triméthylorthoformate (TMOF) nous permet d'accéder à l'amine secondaire **183** qui est activée à l'aide de triphosgène. Le chlorure de carbamoyl ainsi formé est déplacé par le N-aryl carbamate de *tert*-butyle **117** dans le THF pendant une nuit à 70 °C. Après traitement de la résine dans un mélange TFA/ H_2O (95/5, v/v) pendant 1 h, on récupère le ou les produits dans le filtrat. La réaction-clé dans cette synthèse est l'activation de l'amine secondaire avec du triphosgène suivie de la substitution du chlorure de carbamoyl pour former un lien urée. L'étude des conditions réactionnelles et des produits obtenus laisse à supposer que l'aza-peptide cyclisé **185** ne se forme pas mais un produit de même masse aza-dicétopipérazine **187a** ou dicétopipérazine **187b** se formerait (Figure 134). La démarche entreprise pour aboutir à ces conclusions est décrite ci-dessous. On postule dès le départ que c'est le produit aza-peptide cyclisé **185** que l'on caractérise par LC-MS lors de l'optimisation.



(a) 20% pipéridine/DMF, 2×15 min ; (b) acide aminé Fmoc, HBTU, HOBT, DIEA, DMF, 45 min ; (c) 20% pipéridine/DMF, 2×15 min ; (d) benzaldéhyde, TMOF, NaBH₃CN, AcOH 1%, 120 min ; (e) triphosgène, 2,4,6-collidine, THF, 30 min ; (f) composé **117**, DIEA, THF, 70 °C, 1 nuit ; (g) TFA/H₂O (95/5, v/v), 2 h.

Figure 134 : Schéma de synthèse des aza-peptides cycliques

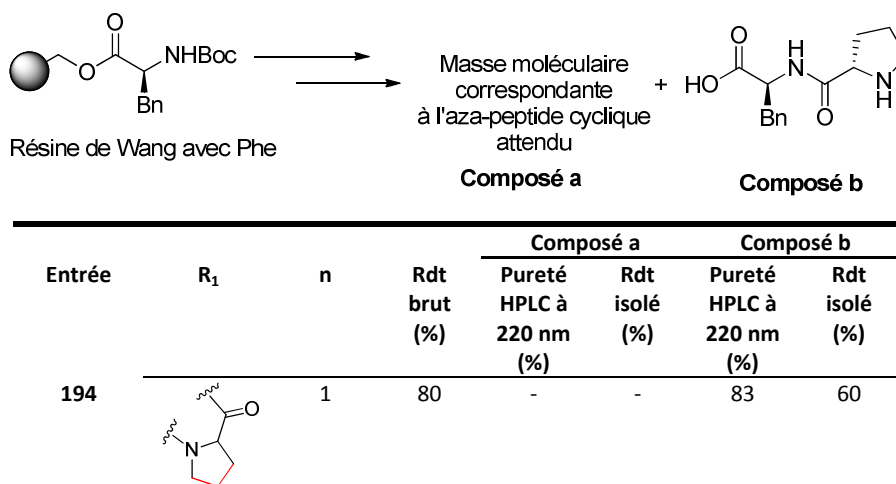
On décide de fixer le premier acide aminé (phénylalanine) et de faire varier le second. Le tout premier résultat avec une glycine en second acide aminé (Tableau 37) est encourageant. L'analyse LC-MS du milieu réactionnel montre que le produit obtenu possède une masse moléculaire pouvant correspondre au produit **188a** avec un rendement de 10%. Par contre, le remplacement du deuxième acide aminé par l'isoleucine, l'alanine et la sérine conduit à la formation d'un produit dont la structure pourrait correspondre aux composés **190b-192b**. Dans le cas de la phénylalanine et de la β-alanine en second acide aminé, nous détectons également un produit de masse correspondant à l'aza-peptide linéaire (Tableau 37).



| Entrée | R ₁ | n | Rdt brut (%) | Composé a | | Composé b | | Autre produits secondaires identifiés |
|--------|---|---|--------------|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|---|
| | | | | Pureté HPLC à 220 nm (%) | Rdt isolé (%) | Pureté HPLC à 220 nm (%) | Rdt isolé (%) | |
| 188 | H- | 1 | 68 | 43 | 10 | 14 | 22 | - |
| 189 | Bn- | 1 | 130 | - | - | 43 | 47 | Produit linéaire Pureté 13%, Rdt 3% |
| 190 | CH ₃ - | 1 | 61 | traces | - | 30 | - | - |
| 191 | HOCH ₂ - | 1 | 60 | traces | - | 16 | - | - |
| 192 | CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH- | 1 | 93 | - | - | 38 | - | - |
| 193 | H- | 2 | 138 | - | - | 10 | 14 | Produit linéaire Pureté 33%, Rdt 28% |

Tableau 37 : Résultats préliminaires de la formation d'aza-peptides cycliques

Lors de l'incorporation d'une proline en second acide aminé (pas d'alkylation dans ce cas-là), on obtient le produit **194b** non couplé au dérivé carbamate de *tert*-butyle **117** avec un rendement isolé de 60% (Tableau 38). Nous décidons alors d'optimiser la réaction prenant comme cible le composé **188a** modèle.



| Entrée | R ₁ | n | Rdt brut (%) | Composé a | | Composé b | |
|--------|----------------|---|--------------|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|
| | | | | Pureté HPLC à 220 nm (%) | Rdt isolé (%) | Pureté HPLC à 220 nm (%) | Rdt isolé (%) |
| 194 | | 1 | 80 | - | - | 83 | 60 |

Tableau 38 : Résultats préliminaires de la formation d'aza-peptides contenant une proline

L'influence de deux paramètres a été testée :

- La température lors du déplacement du chlorure de carbamoylé.
- L'activation avec le triphosgène sur support versus activation en solution.

c. Influence de la température

L'influence de la température de déplacement du chlorure de carbamoyle avec le carbazate de *tert*-butyle **117** a été étudiée. Trois températures ont été testées : TA, 40 °C et 70 °C (Tableau 39). Nous n'avons pas sélectionné de température plus élevée pour éviter l'épimérisation des centres asymétriques. Le rendement n'est pas influencé par la température lors du déplacement.

| Entrée | Température | Rendement brut (%) | Pureté HPLC à 220 nM (%) | Rendement isolé (%) |
|--------|-------------|--------------------|--------------------------|---------------------|
| 1 | TA | 90 | 48 | 9 |
| 2 | 40 °C | 78 | 48 | 8 |
| 3 | 70 °C | 68 | 43 | 10 |

Tableau 39 : Variation de la température lors du déplacement

d. Influence de l'activation

Pour former le motif semicarbazide, l'activation avec le triphosgène peut se faire soit sur le réactif supporté par activation de l'amine secondaire soit sur le réactif en solution par activation de l'hydrazine. Les deux voies d'activation ont été évaluées pour tenter de préparer l'aza-peptide cyclique (Figure 135).

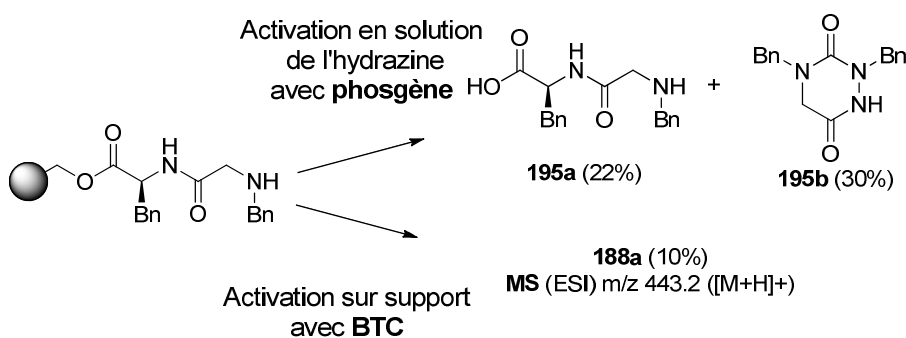


Figure 135 : Etude de l'influence des conditions de formation du semicarbazide

Lors de l'activation sur support, on obtient 10% d'un composé pouvant correspondre à la masse moléculaire de l'aza-peptide **188a**. Par contre, lors de l'activation en solution, on isole l'aza-dicétopipérazine **195b** avec un rendement de 30% et le produit **195a** non couplé avec un rendement de 22% (caractérisation par RMN). Nous avons essayé de rationaliser ces observations en proposant un mécanisme d'accès à ces composés (Figure 136). Lors de la déprotection du semicarbazide et le décrochage du composé de la résine en milieu acide, l'amine primaire viendrait réagir avec le lien amide pour conduire à la formation de l'aza-

DCP **195b**. Pourquoi n'observons nous pas de formation de ce composé dans le cas de l'activation sur support ?

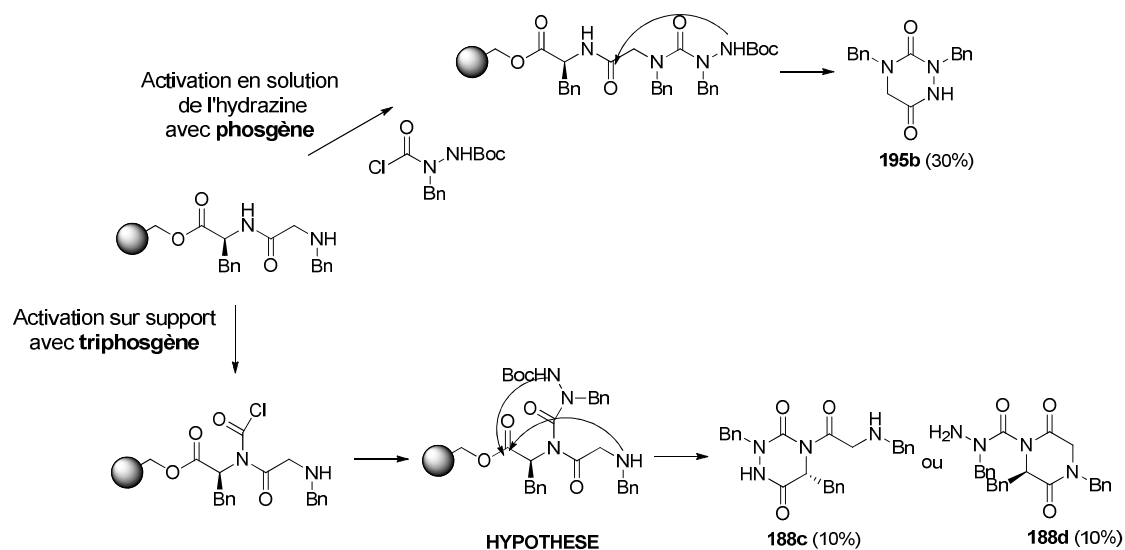


Figure 136 : Réaction secondaire lors de la synthèse d'aza-peptides cycliques

L'hypothèse est que l'activation sur support ne se fait pas au niveau de l'amine secondaire mais du lien amide (Figure 136). Deux produits peuvent être théoriquement formés lors de la cyclisation en milieu TFA, l'aza-dicétopipérazine **188c** ou la dicétopipérazine **188d** de même masse moléculaire que l'aza-cyclopeptide **188a** attendu. L'amine secondaire est peut-être trop encombrée pour que le chlorure de carbamoyle se forme ou elle forme des liaisons H intramoléculaires qui rendent l'activation impossible à cet endroit-là. Pour valider l'hypothèse que l'activation se fait au niveau de l'amide, nous décidons de méthyler l'azote du lien amide pour empêcher l'activation et la formation de produit (Figure 137).

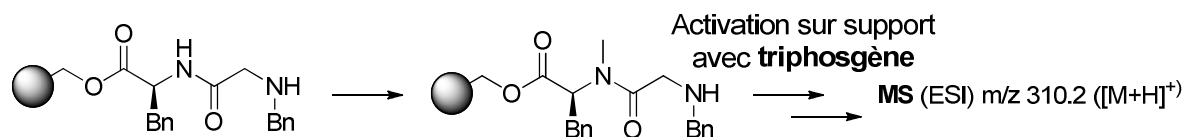


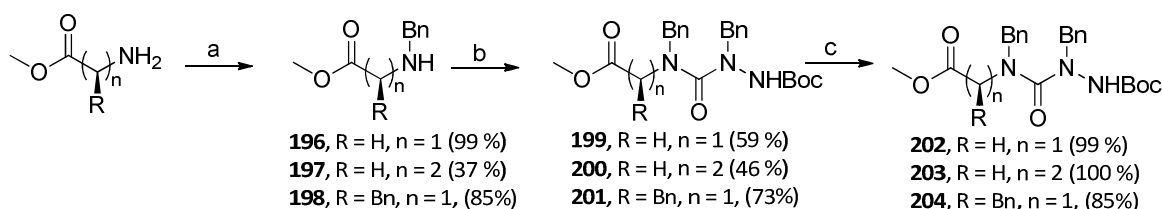
Figure 137 : Influence de la méthylation de l'amide sur la synthèse sur support

Après méthylation, aucun produit cyclisé n'est isolé. Cela va dans le sens d'une possible activation de l'amide au lieu de l'amine secondaire. Nous essayons de déterminer par RMN la structure obtenue. Le produit est présent sous deux formes de mêmes masses non séparables par HPLC semi-préparative. Une expérience de DOSY ne nous permet pas de séparer les deux spectres du proton. Il est donc difficile d'identifier si nous sommes en présence de la molécule **187a** ou **187b**.

En conclusion, l'activation du semicarbazide ne peut se faire sur support et la cyclisation ne peut se faire en milieu acide à cause de la condensation sur l'amide et la formation d'une aza-dicétopipérazine.

ii. Deuxième voie de synthèse : synthèse des semicarbazides en solution et incorporation sur support

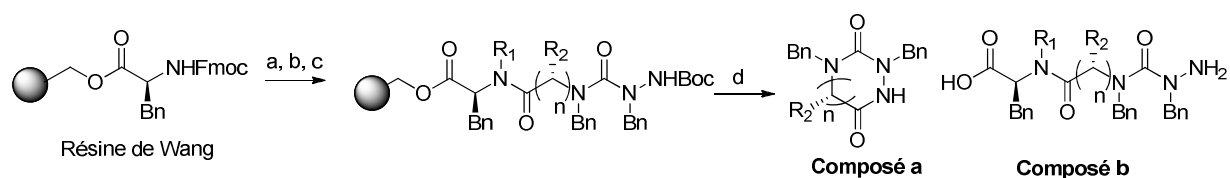
Nous décidons alors de synthétiser les semicarbazides en solution et de les incorporer sur support. La synthèse s'effectue en trois étapes (Figure 138). Les amines secondaires **196-198** sont obtenues par amination réductrice entre différents aldéhydes et l'amine primaire des dérivés acides aminés. Le lien urée est formé entre le N'-benzylcarbazate de *tert*-butyle **117** et les amines secondaires **199-201** en présence de triphosgène et de DIEA dans le THF avec des rendements compris entre 46% et 73%. L'hydrolyse de l'ester conduit aux semicarbazides **202-204** prêts à être incorporés sur la résine.



(a) benzaldéhyde, Et₃N, MgSO₄, MeOH, 1 nuit, NaBH₄, 1 h ; (b) triphosgène, DIEA, THF ou CH₂Cl₂, composé **117**, 1 h, TA ou 50 °C ; (c) LiOH, MeOH/H₂O (3/1, v/v), 3 h.

Figure 138 : Synthèse des semicarbazides **202-204** en solution

Les trois semicarbazides sont incorporés sur la résine de Wang fonctionnalisée avec la phénylalanine (Figure 139). Un double couplage du semicarbazide est réalisé en présence de HBTU, HOBT et DIEA dans le DMF. La cyclisation-libération s'effectue dans un mélange TFA/H₂O (95/5, v/v).



(a) DMF/pipéridine 20%, 2×15 min ; (b) i. formaldéhyde, TMOF, 1 h, ii. NaBH₃CN, AcOH 1%, TMOF, 90 min ; (c) HBTU, HOBT, composé **202-204**, DIEA, 2×45 min ; (e) TFA/H₂O (95/5, v/v), 1 h.

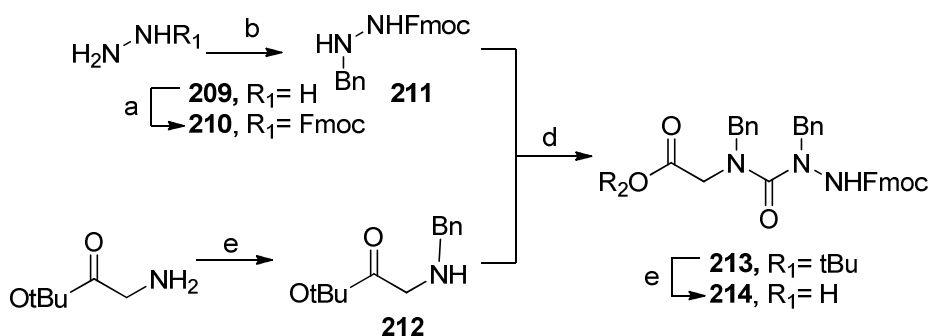
| Composé | R ₁ | R ₂ | n | Rdt brut (%) | Composé a | | Composé b | |
|------------|------------------|----------------|---|--------------|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|
| | | | | | Pureté HPLC à 220 nm (%) | Rdt isolé (%) | Pureté HPLC à 220 nm (%) | Rdt isolé (%) |
| 205 | -H | -H | 1 | 153 | 92 | 52 | / | / |
| 206 | -CH ₃ | -H | 1 | 120 | 83 | / | / | / |
| 207 | -H | -Bn | 1 | 133 | 77 | / | / | / |
| 208 | -H | -H | 2 | 104 | / | / | 92 | / |

Figure 139 : Incorporation des semicarbazides sur support

Quel que soit la nature des semicarbazides, les aza-DCP **205a**, **206a** et **207a** sont obtenues certainement de l'attaque nucléophile du semicarbazide sur le carbonyle de l'amide. Ces produits sont obtenus avec de bonnes puretés. Par ailleurs, la méthylation préalable de l'amide ne permet pas d'éviter la cyclisation. Ainsi, le composé **206a** est obtenu avec une pureté de 83%. Par contre, l'homologation d'un carbone en utilisant la β -alanine prévient la cyclisation, en effet un cycle à 7 est plus difficile à obtenir qu'un cycle à 6. On obtient alors majoritairement le produit linéaire non cyclisé **208b** avec une pureté de 92%. Pour éviter la cyclisation sur le lien amide et la favoriser sur le lien ester, nous envisageons une cyclisation en milieu basique.

iii. Troisième voie de synthèse : étude de la cyclisation en milieu basique

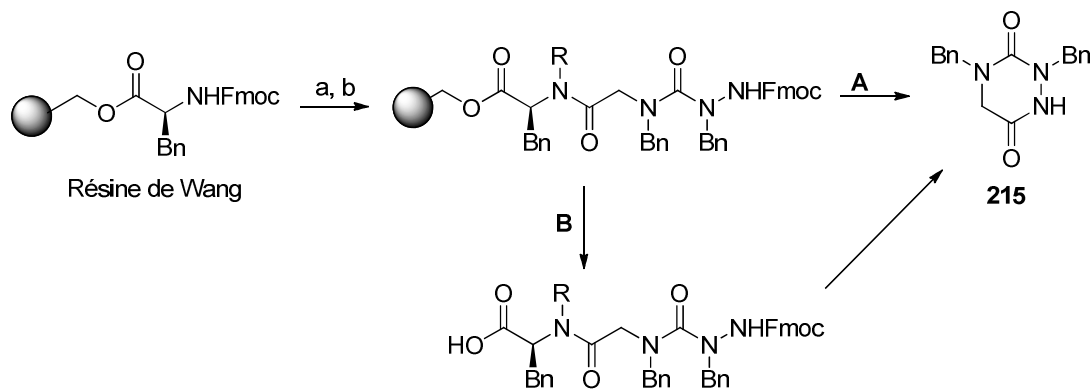
On envisage de cycliser le produit en milieu basique. Pour cela le semicarbazide protégé par un groupement 9-fluorénylméthyle (Fmoc) **214** est préparé en solution (Figure 140). On effectue d'abord l'amination réductrice du benzaldéhyde avec le glycinate de *t*-butyle avec un rendement de 49%. En parallèle, la synthèse de N'-benzylcarbazate de Fmoc **211** est réalisée en deux étapes à partir de l'hydrazine qui est monoprotégée par un groupement Fmoc puis benzylée par amination réductrice du benzaldéhyde. Le semicarbazide **213** est obtenu par formation d'un lien urée entre les composés **211** et **212** avec un rendement de 94%. L'ester *tert*-butylique est hydrolysé en milieu acide pour obtenir l'acide **214** correspondant.



(a) 9-fluoronylméthylchloroformate, ACN, H₂O, 1 nuit, 93% ; (b) benzaldéhyde, EtOH, 2 h, reflux, NaBH₃CN, HCl 2N, MeOH/DMF (1/3, v/v), 1 h, 53% ; (c) benzaldéhyde, NaBH₄, Et₃N, MgSO₄, MeOH, 16 h, 49% ; (d) 20% phosgène dans toluène, DIEA, CH₂Cl₂, 90 min, 94% ; (e) TFA/CH₂Cl₂ (95/5, v/v), 1 h, quant.

Figure 140 : Synthèse du semicarbazide-Fmoc 214

Le semicarbazide Fmoc **214** est incorporé sur la résine de Wang et deux voies de cyclisation en milieu basique, en solution et sur support, sont envisagées (Figure 141). La résine fonctionnalisée avec la N-Fmoc-L-Phe-OH est déprotégée dans un mélange de 20% de pipéridine dans le DMF puis est couplée au semicarbazide **214** en présence de HBTU, HOBT et de DIEA dans le DMF. La voie de synthèse **A** passe par la déprotection du groupement Fmoc sur support et la cyclisation en milieu basique sur support dans un mélange de 10% Et₃N dans toluène/éthanol (2/1, v/v) à 70 °C pendant une nuit.



(a) 20% pipéridine dans DMF, 2×15 min ; (b) composé **214**, HBTU, HOBT, DIEA, DMF, 2×45 min ; Voie A: i. 20% pipéridine dans DMF, 2×15 min; ii. 10% Et₃N dans toluène/éthanol (2/1, v/v) ; Voie B: i. TFA/H₂O (95/5, v/v); ii. 10% Et₃N, toluène/éthanol (2/1, v/v).

Figure 141 : Incorporation du semicarbazide-Fmoc 214 sur résine de Wang

On obtient le produit aza-dicetopipérazine **215** par cyclisation sur la fonction amide avec un rendement brut de 18% et une pureté HPLC à 220 nm de 43% (Tableau 40). La voie de synthèse **B** passe par la coupure du semicarbazide de la résine en milieu acide puis la déprotection du groupement Fmoc du semicarbazide en solution. Après déprotection du

groupement Fmoc en solution, le produit cyclise spontanément en aza-dicétopipérazine **215** avec un rendement de 22% (Tableau 40).

| Entrée | Voie | Rdt brut (%) | Rdt purifié (%) | Pureté HPLC à 220 nm (%) |
|--------|------|--------------|-----------------|--------------------------|
| 1 | A | 18 | / | 43 |
| 2 | B | / | 22 | 100 |

Tableau 40 : Cyclisation en milieu basique sur support

En conclusion, la cyclisation en milieu basique ne permet pas de contourner la formation de l'aza-dicétopipérazine et d'accéder à l'aza-peptide cyclique. Le développement de ces aza-peptides cycliques est stoppé.

3. Synthèse sur support et évaluation de peptides contenant une aza-dicétopipérazine

Deux stratégies de synthèse ont été envisagées pour concevoir des mimes peptidiques de l'ocytocine contenant une aza-dicétopipérazine (Figure 142). Les deux voies de synthèse sont effectuées à partir de la résine HMBA fonctionnalisée avec la (Boc)-L-Lys(Fmoc). La fermeture des peptides cycliques varie selon la voie de synthèse empruntée : la première voie utilise un couplage peptidique en solution en présence de PyBOP alors que la seconde voie utilise la chimie click sur support solide.

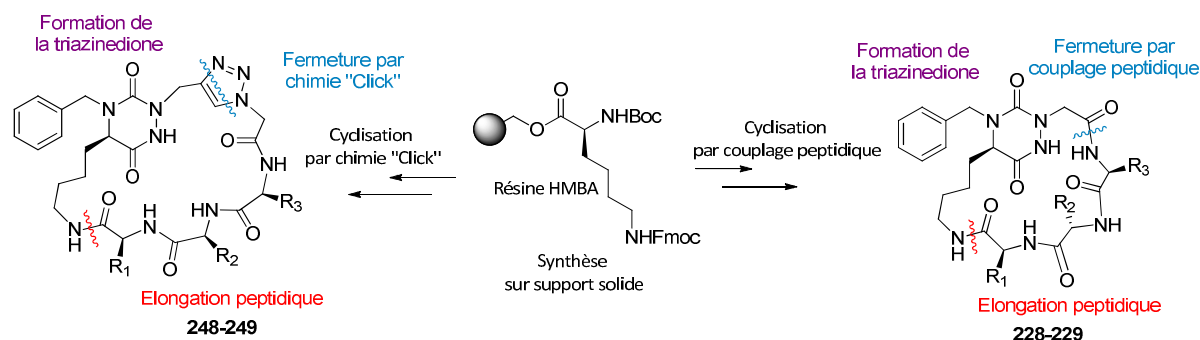


Figure 142 : Stratégie de synthèse des peptidomimétiques contenant une aza-DCP

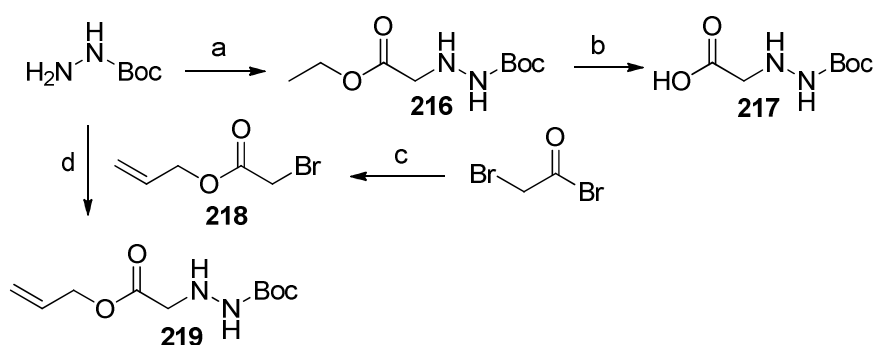
La première et la deuxième étape sont la déprotection de l'amine et la synthèse du semicarbazide, les troisième et quatrième étapes sont la déprotection de la chaîne latérale de l'isoleucine et l'élongation de la chaîne peptidique comprenant les trois acides aminés clés. Les dernières étapes sont les étapes de cyclisation du bras peptidique par chimie click ou couplage peptidique. En milieu acide, l'aza-dicétopipérazine se cyclise spontanément et le produit est récupéré dans le filtrat.

Pour chaque voie de synthèse, le composé avec les trois acides aminés clés de l'ocytocine (Gln, Ile, Tyr) ainsi qu'un dérivé modèle sont synthétisés (Ala, Tyr, Lys).

i. Première voie de synthèse : cyclisation en solution par couplage peptidique

Trois dérivés carbazates de *tert*-butyle portant un acide **217**, un ester éthylique **216** et un ester allylique **219** sont synthétisés pour étudier l'influence de la protection de l'acide sur la synthèse des peptides cycliques contenant une aza-dicétopipérazine.

Les dérivés du N'-alkyl carbazate de *tert*-butyle **216**, **217** et **219** sont préparés en solution (Figure 143). Le carbazate de *tert*-butyle est monoalkylé par le bromoacétate d'éthyle avec un rendement de 74%²¹⁶. L'ester **216** est hydrolysé pour aboutir à l'acide **217** avec un rendement de 71%. Le groupement protecteur choisi pour protéger l'acide est un ester allylique. Le bromoacétate d'allyle **218** est préparé par substitution nucléophile du bromure de 2-bromoacétyle par le prop-2-én-1-ol. Ce dernier est utilisé pour monoalkyler le carbazate de *tert*-butyle avec un rendement de 52%. Les trois dérivés N'-alkyl carbazate de *tert*-butyle **216**, **217** et **219** sont prêts à être couplés sur support solide.

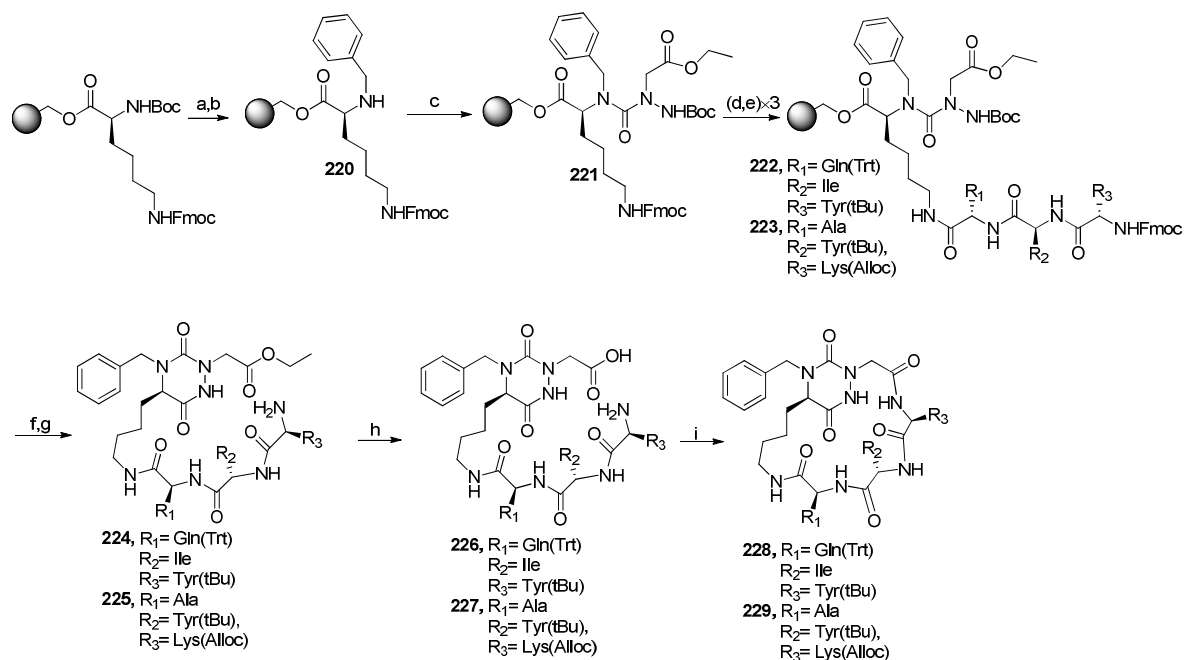


(a) éthylbromoacétate, H₂O, 2 h, 74%; (b) LiOH, H₂O, dioxane, 40 °C, 1 h, 71%; (c) prop-2-én-1-ol, pyridine, CH₂Cl₂, 1 nuit, 40% ; (d) DIEA, 2 jours, 52%.

Figure 143 : Synthèse de N'-alkyl *tert*-butyl carbazate **216, **217** et **219****

La synthèse des dérivés aza-peptides cycliques **228** et **229** en utilisant le groupement ester se fait en 13 étapes sur support solide (Figure 144). Le groupement Boc de la résine (Boc)-L-Phe-(Fmoc) est déprotégé dans un mélange TFA/CH₂Cl₂/H₂O (50/45/5, v/v/v). L'amine primaire est benzylée et couplée au dérivé ester carbazate de *tert*-butyle **216** pour obtenir la résine **221**. Le traitement de cette dernière dans un mélange 20% pipéridine dans le DMF permet de déprotéger la fonction ε-amino de la lysine. Trois acides aminés sont alors

couplés à la suite en utilisant les conditions de couplage décrites précédemment pour obtenir les résines **222** et **223**. La fonction α -amino du troisième acide aminé est déprotégée.



(a) TFA/CH₂Cl₂/H₂O (50/45/5, v/v/v), 10 min ; (b) i. benzaldéhyde, TMOF, 1 h, ii. NaBH₃CN, AcOH 1%, TMOF, 90 min ; (c) i. triphosgène, 2,4,6-collidine, THF, 30 min; ii. composé **216**, DIEA, THF, 1 nuit, 70 °C ; (d) DMF/pipéridine 20%, 2×15 min ; (e) HATU, HOBT, acide aminé Fmoc, DIEA, 45 min ; (f) DMF/pipéridine 20%, 2×15 min ; (g) TFA/H₂O, (95/5, v/v), 3 h ; (h) LiOH, THF, 30 min ; (i) PyBOP, DIEA, CH₂Cl₂/DMF (10/1, v/v), 1 nuit.

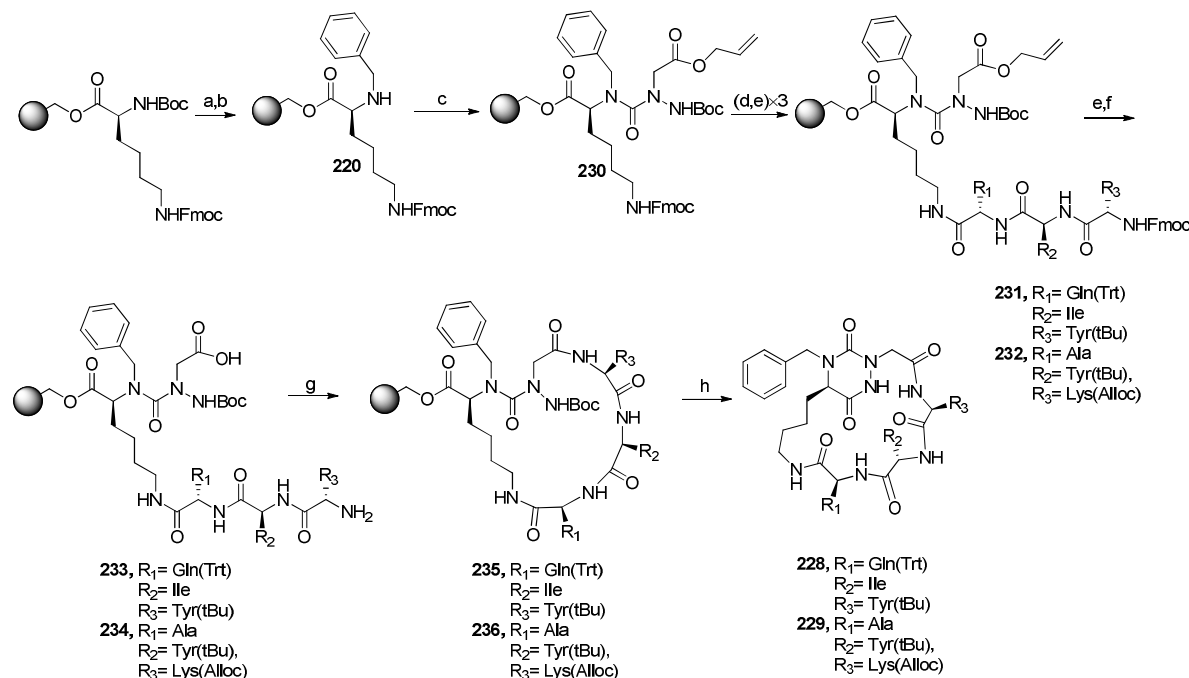
Figure 144 : Voie de synthèse des aza-peptides cycliques **228** et **229** en utilisant le dérivé N'-alkyl *tert*-butyl carbazate ester éthylique **217**

Ensuite, la résine est agitée pendant 3 h dans un mélange TFA/H₂O (95/5, v/v) : dans ces conditions, le composé est décroché de la résine, le semicarbazide est déprotégé et la cyclisation spontanée conduit à l'aza-dicétopipérazine ; les produits **224** et **225** sont récupérés dans le filtrat. Il n'est pas possible d'effectuer l'hydrolyse basique de l'ester et la cyclisation sur support car l'hydroxyde de lithium conduirait également à l'hydrolyse du linker de la résine HMBA sensible en milieu basique (ester benzyle). Les composés **224** et **225** sont hydrolysés en solution en présence d'hydroxyde de lithium dans le THF. La cyclisation est réalisée dans des conditions très diluées (0.001 M) pour éviter la polymérisation. Au bout d'une nuit les aza-peptides cycliques **228** et **229** sont obtenus avec des rendements globaux respectifs de 2% et 6% (13 étapes).

L'inconvénient majeur de cette approche réside dans la nécessité de réaliser une partie de la synthèse en solution (hydrolyse et cyclisation). Une voie alternative en utilisant le dérivé carbazate de *tert*-butyle **216** portant directement le groupement acide non protégé est

envisagée. Cette approche permettrait ainsi de cycliser le peptide sur support solide via un lien amide avant le traitement en milieu acide afin de générer le cycle aza-DCP. Malheureusement, l'accès au peptide cyclique en utilisant ce dérivé n'a pas été possible : les analyses HPLC et LC-MS montrent qu'il se forme de nombreux produits secondaires.

Nous avons alors envisagé la protection de l'acide sous la forme d'un ester. Ainsi, le dérivé carbamate de *tert*-butyle comprenant un acide protégé sous la forme d'un ester allylique (composé **219**) est synthétisé. L'ester allylique peut être déprotégé sur support solide à l'aide de tétrakis(triphénylphosphine)palladium dans un mélange CHCl₃/AcOH/NMM (37/2/1, v/v/v). La voie d'accès aux aza-peptides cycliques avec cette méthode s'effectue en 13 étapes (Figure 145). Les premières étapes sont similaires à celles décrites précédemment. La déprotection de l'ester allylique sur support est contrôlée par un test au vert de malachite. Une fois déprotégé, la cyclisation sur support s'effectue en présence de PyBop et de DIEA dans le DMF. Après traitement dans un mélange TFA/H₂O (95/5, v/v), les aza-peptides cycliques **237** et **238** sont directement obtenus avec des puretés de 53% et 51% respectivement. Après purification par HPLC semipréparative, **237** et **238** sont obtenus avec des rendements isolés de 2% et 4% respectivement (13 étapes).

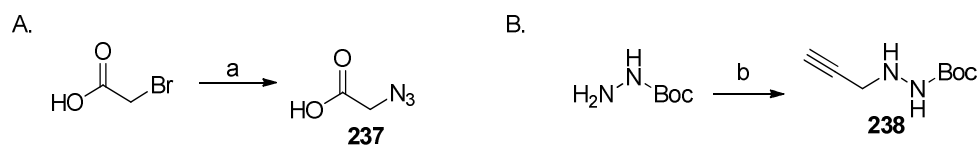


(a) TFA/CH₂Cl₂/H₂O (50/45/5, v/v/v), 10 min ; (b) i. benzaldéhyde, TMOF, 1 h, ii. NaBH₃CN, AcOH 1%, TMOF, 90 min ; (c) i. triphosgène, 2,4,6-collidine, THF, 30 min; ii. composé **219**, DIEA, THF, 1 nuit, 70 °C ; (d) DMF/pipéridine 20%, 2x15 min; (e) HATU, HOBT, acide aminé FMOC, DIEA, 45 min ; (f) Pd(PPh₃)₄, CHCl₃/AcOH/NMM (37/2/1, v/v/v), 2 h ; (g) PyBOP, DIEA, DMF, 6 h ; (h) TFA/H₂O, (95/5, v/v), 3 h.

Figure 145 : Voie de synthèse des aza-peptides cycliques 237 et 238 en utilisant le dérivé N'-alkyl *tert*-butyl carbamate ester allylique 219

ii. Deuxième voie de synthèse : cyclisation sur support par chimie Click

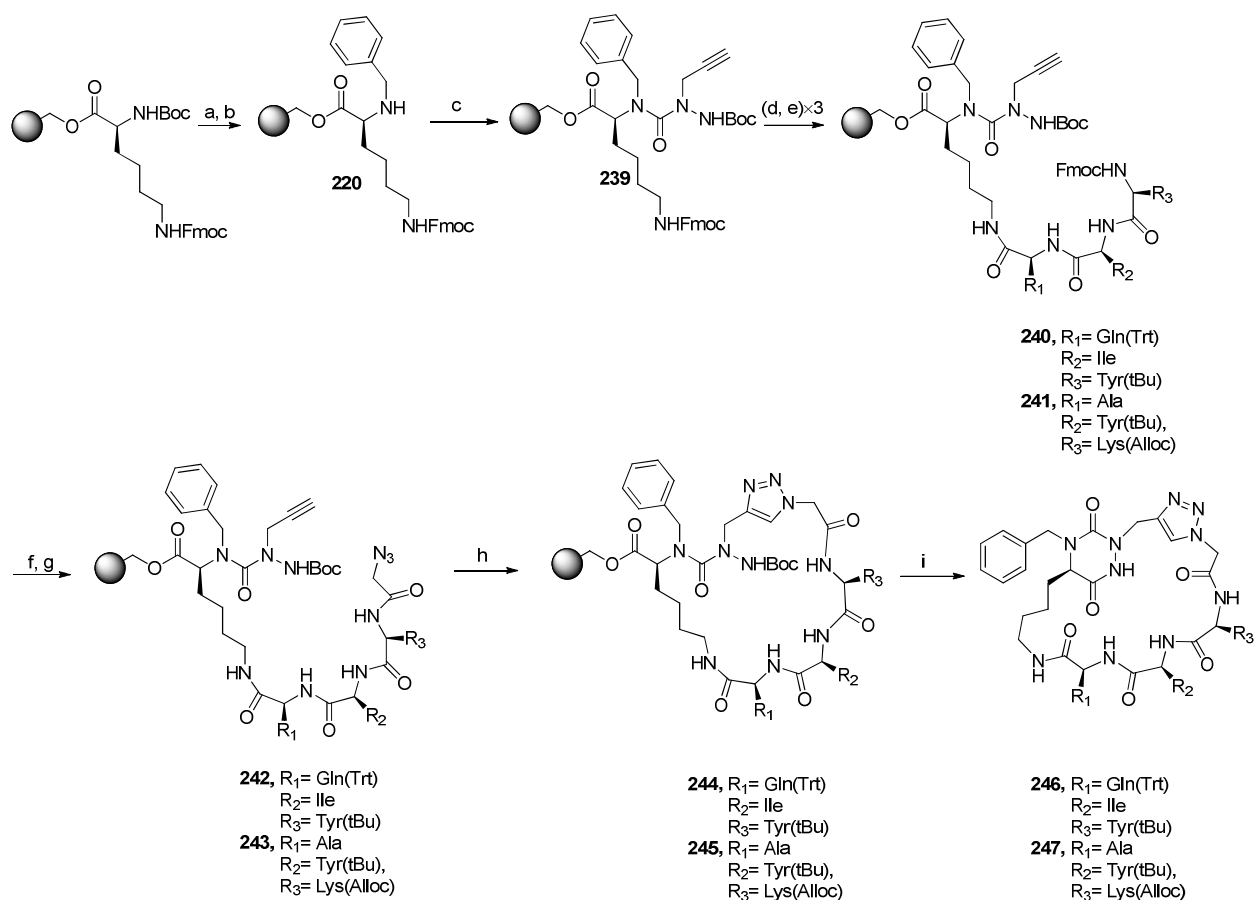
La seconde voie de synthèse avec la cyclisation par chimie click nécessite la préparation préalable en solution de l'azoture **237** et de l'alcyne **238**. La synthèse du dérivé **237** s'effectue en une étape par substitution nucléophile du brome de l'acide 2-bromoacétique par l'azoture de sodium avec un rendement de 87% (Figure 146.A.). La préparation du carbazate **238** est réalisée par monoalkylation du carbazate de *tert*-butyle par substitution nucléophile du 3-bromopropyne (Figure 146.B). Le faible rendement est dû à la difficile séparation du composé **238** et du dérivé dipropargylique.



(a) NaN_3 , H_2O , 1 nuit, 87% ; (b) 3-bromopropyne, K_2CO_3 , THF/DMF (9/1, v/v), 1 nuit, 30%.

Figure 146 : Synthèse de l'acide 2-azido acétique **237** et du N'-alkyl-carbazate **238**.

La synthèse s'effectue à nouveau sur support à partir de la (Boc)-L-Lysine(Fmoc) fonctionnalisée sur une résine HMBA (Figure 147). Le début de la synthèse s'effectue de la même manière que précédemment. Tout d'abord, l'amine primaire de la chaîne principale est déprotégée en milieu acide et une amination réductrice à partir du benzaldéhyde est effectuée pour obtenir l'amine secondaire **220**. Cette dernière est ensuite couplée au dérivé carbazate de *tert*-butyle **238** en présence de triphosgène et de 2,4,6-collidine. La fonction ϵ -amino de la chaîne latérale de la lysine est déprotégée en milieu basique et couplée à un acide aminé en présence de HATU, HOBT et DIEA dans le DMF. Deux autres acides aminés protégés par un groupement Fmoc et le dérivé **237** sont couplés à la suite pour obtenir les résines **242** et **243** prêtes à être cyclisées. La cyclisation s'effectue sur support par une cycloaddition 1,3 dipolaire catalysée par la cuivre +1 et formation d'un triazole 1,4-disubstitué. Les meilleures conditions de formation du triazole sont TBTA, ascorbate de sodium, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans un mélange NMP/ H_2O (10/1, v/v). Afin de faire le suivi de la réaction, un aliquot de résine est traité dans un mélange TFA/ H_2O (95/5, v/v) et le résidu est analysé par LC-MS. Après 1 nuit, la réaction est complète. La résine est alors traitée en milieu acide et le brut réactionnel est purifié par HPLC semi-préparative pour obtenir les aza-peptides cycliques **246** et **247** avec des puretés de 71% et 96% respectivement. Après purification par HPLC semi-préparative, **246** et **247** sont obtenus avec des rendements isolés de 3% et 4% respectivement (13 étapes).



(a) TFA/CH₂Cl₂/H₂O (50/45/5, v/v/v), 10 min ; (b) i. benzaldéhyde, TMOF, ii. NaBH₃CN, AcOH 1%, TMOF, 1 h ; (c) i. triphosgène, 2,4,6-collidine, 30 min, ii. composé **238**, DIEA, THF, 1 nuit, 70 °C ; (d) DMF/pipéridine 20%, 2×15 min ; (e) HATU, HOBT, acide aminé FMOC, DIEA, 45 min ; (f) DMF/pipéridine 20%, 2×15 min ; (g) composé **237**, HATU, HOBT, DIEA, 45 min ; (h) TBTA, CuSO₄ · 5 H₂O, ascorbate de sodium, NMP/H₂O (10/1, v/v), 1 nuit ; (i) TFA/H₂O (95/5, v/v), 1h30.

Figure 147 : Voie de synthèse sur support solide pour accéder aux aza-peptides cycliques par chimie « Click »

Après avoir développé les synthèses de ces deux types d'aza-peptides cycliques, nous avons essayé d'optimiser les rendements. Nous avons pu montrer que l'étape limitante du procédé était les synthèses des aza-DCP **248** et **249** précurseurs des aza-peptides cycliques (Figure 148). En effet, les composés **248** et **249** après traitement en milieu acide sont obtenus avec un rendement de 20% et 18% respectivement.

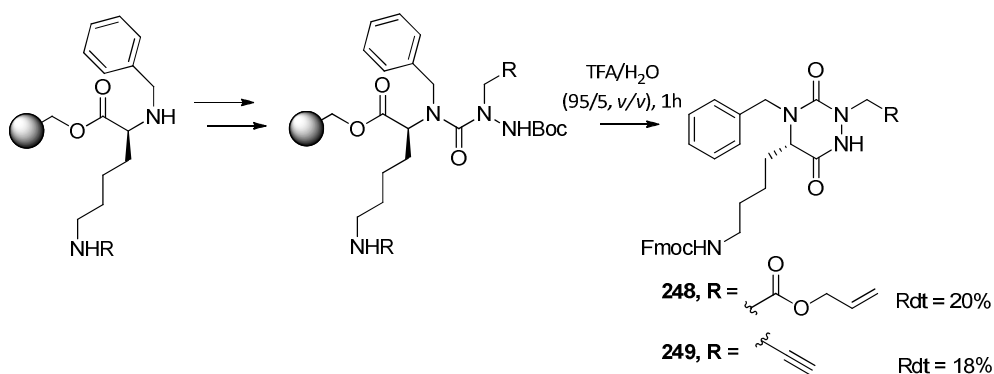


Figure 148 : Rendement des aza-DCP 248 et 249 précurseurs des aza-peptides cycliques

Différentes conditions ont été évaluées sur support (conditions réactionnelles de la formation du semicarbazide et influence du groupement protecteur de la lysine) pour améliorer ce rendement (Tableau 41, Figure 149).

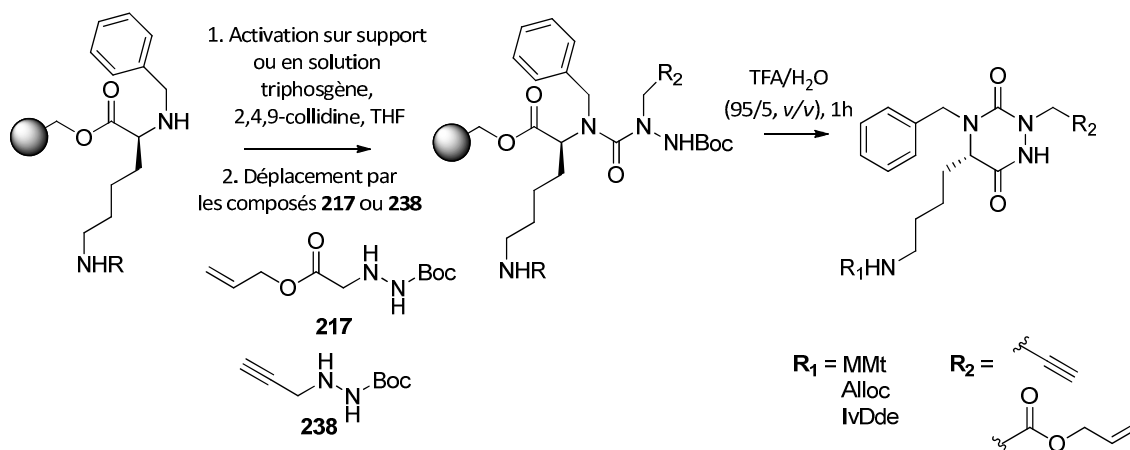


Figure 149 : Optimisation de la formation du semicarbazide sur support

Les deux dérivés carbazates de *tert*-butyle **217** et **238** s'incorporent sur la résine avec les mêmes rendements dans les conditions classiques : activation de la résine avec le triphosgène et la 2,4,6-collidine dans le THF pendant 30 min à TA et déplacement en présence de DIEA dans le THF à 70 °C pendant une nuit (Entrées 1 et 2). L'activation en solution du dérivé carbazate de *tert*-butyle ne permet pas d'améliorer le rendement brut ou la pureté (Entrée 3). Différents groupements protecteurs de la chaîne latérale ont été utilisés : Fmoc, IvDde et Alloc (Entrées 4-9). Le groupement IvDde qui remplace le groupement Fmoc est dégradé lors du déplacement (attaque de l'hydrazine et déprotection de l'amine primaire de la chaîne latérale de la lysine). Un déplacement à TA conduit également à la dégradation du produit (Entrée 5). La substitution du groupement Fmoc par un groupement Alloc ne permet pas non plus d'améliorer les rendements bruts compris

entre 12 et 18% (Entrées 6 et 7). L'utilisation du groupement MMt ne permet pas d'accéder au composé (Entrées 8 et 9).

Les conditions de déplacement sur le dérivé modèle ont alors été étudiées. Ni la réaction à température ambiante (Entrée 10), ni l'augmentation de la température à 90 °C (Entrée 11), ni le double couplage pendant 2×16 heures (Entrée 12), ni le chauffage au micro-onde à 100 °C pendant 30 min (Entrée 13) ne permettent d'améliorer les rendements.

Les conditions réactionnelles ont été modifiées. Le déplacement est effectué en présence de pyridine et de DMAP dans le THF à 70 °C avec un rendement brut de 16% (Entrée 14). L'activation de la résine à l'aide de carbonyldiimidazole dans le THF pendant une nuit puis la méthylation du dérivé imidazole dans le DMF pendant 24 heures suivi du déplacement du dérivé **238** en présence de triéthylamine dans le CH₂Cl₂ ne permettent pas d'obtenir le produit^{217,218} (Entrée 15).

Une dernière étude de l'influence du solvant sur le déplacement a été effectuée. Ni le déplacement dans le toluène à 70 °C (Entrée 16), ni dans un mélange de solvant DMF/DCE/NMP (3/2/2, v/v/v) + 1% Triton X-100²¹⁹ (Entrée 17) ne permettent d'améliorer les rendements.

| Entrée | Résine | Groupement protecteur | Carbazate de tert-butyle | Activation | Conditions réactionnelles du déplacement | Température | Rdt brut (%) | Pureté à 220 nM (%) |
|--------|----------|-----------------------|--------------------------|------------|---|-------------------|--------------|---------------------|
| 1 | HMBA-Lys | Fmoc | 217 | Support | DIEA, THF | 70 °C | 20 | 60 |
| 2 | HMBA-Lys | Fmoc | 238 | Support | DIEA, THF | 70 °C | 18 | 87 |
| 3 | HMBA-Lys | Fmoc | 217 | Hydrazine | DIEA, THF | 70 °C | 19 | 97 |
| 4 | Wang-Lys | IvDde | 217 | Support | DIEA, THF | 70 °C | / | traces |
| 5 | Wang-Lys | IvDde | 217 | Support | DIEA, THF | TA | / | traces |
| 6 | HMBA-Lys | Alloc | 217 | Support | DIEA, THF | 70 °C | 12 | 89 |
| 7 | HMBA-Lys | Alloc | 238 | Support | DIEA, THF | 70 °C | 18 | 82 |
| 8 | HMBA-Lys | MMt | 217 | Support | DIEA, THF | 70 °C | 10 | traces |
| 9 | HMBA-Lys | MMt | 238 | Support | DIEA, THF | 70 °C | 9 | traces |
| 10 | HMBA-Lys | Fmoc | 217 | Support | DIEA, THF | TA | 7 | 33 |
| 11 | HMBA-Lys | Fmoc | 217 | Support | DIEA, THF | 90°C | 15 | 93 |
| 12 | HMBA-Lys | Fmoc | 217 | Support | DIEA, THF | 70 °C (2×16h) | 13 | 80 |
| 13 | HMBA-Lys | Fmoc | 217 | Support | DIEA, THF | MW, 100°C, 30 min | 6 | 82 |
| 14 | HMBA-Lys | Fmoc | 217 | Support | Pyridine/ DMAP/THF | 70 °C | 16 | 92* |
| 15 | HMBA-Lys | Fmoc | 238 | Support | Mel/CDI/ DCM/DMF | TA | 0 | 0 |
| 16 | HMBA-Lys | Fmoc | 238 | Support | Toluène | 70 °C | 22 | 95 |
| 17 | HMBA-Lys | Fmoc | 238 | Support | DMF/DCE/NMP (3/2/2, v/v/v) +1% Triton X-100 | 70 °C | 0 | 0 |

* produit sans le Fmoc

Tableau 41 : Optimisation de la formation de l'urée sur support

Différentes hypothèses peuvent être faites pour expliquer ce déplacement difficile. Le chlorure de carbamoyl ainsi formé est difficilement accessible à cause de l'encombrement stérique de la chaîne de la lysine et de ses groupements protecteurs. La réaction effectuée en solution ne donne pas de meilleurs rendements. La difficulté de synthèse n'est donc pas dépendante du support solide.

iii. Evaluation des dérivés peptides cycliques 228 et 246 contenant une aza-dicétopipérazine

Aucune des deux molécules ne se fixe sur les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine et n'a de caractère agoniste ou antagoniste. Il est possible que la présence du groupement benzyle sur l'aza-dicétopipérazine puisse gêner la fixation de la molécule.

| Composé | V _{1a} R | | | V ₂ R | | | OXTR | | |
|------------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------------|
| | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c | Affinité ^a | Ago ^b | Antago ^c |
| 228 | 11538 | ns ^d | ns ^e | 9183 | ns ^d | ns ^e | 32142 | ns ^d | ns ^e |
| 246 | 11538 | ns ^d | ns ^e | 12857 | ns ^d | ns ^e | 25714 | ns ^d | ns ^e |

^a Les valeurs de K_i sont exprimées en nM et sont déterminées par TR-FRET sur cellules exprimant les récepteurs de la vasopressine V_{1a}, V₂ et de l'ocytocine marqués en utilisant la technologie SNAP-tag et incubés en présence d'un ligand fluorescent marqué au DY647 (20 nM) et en concentration croissante de compétiteurs. Les valeurs correspondent à une détermination. ^b Les valeurs d'EC₅₀ sont exprimées en nM, accompagnées de l'effet maximal mesuré en pourcentage par rapport à la réponse maximale de l'OT et de l'AVP et correspondent à la moyenne ±SEM de deux déterminations indépendantes. ^c Les valeurs d'IC₅₀ sont exprimées en nM et correspondent à la moyenne ±SEM de deux déterminations indépendantes. ^d ns (non significatif) pour 5-10% de réponse à 1 µM par rapport à la stimulation maximale de l'agoniste endogène. ^e ns (non significatif) pour 5-10% d'inhibition de la réponse induite par l'agoniste endogène à [ligand]=1 µM.

Tableau 42 : Affinité et fonction des dérivés peptides cycliques 228 et 246 contenant une aza-dicétopipérazine

Il serait intéressant de synthétiser le produit équivalent avec un méthyle à la place du benzyle pour étudier l'importance des substituants sur cette position pour garder une affinité pour le récepteur de l'ocytocine (Figure 150). En perspectives, des études de modélisation et de superposition avec l'ocytocine sont nécessaires pour optimiser au mieux la structure.

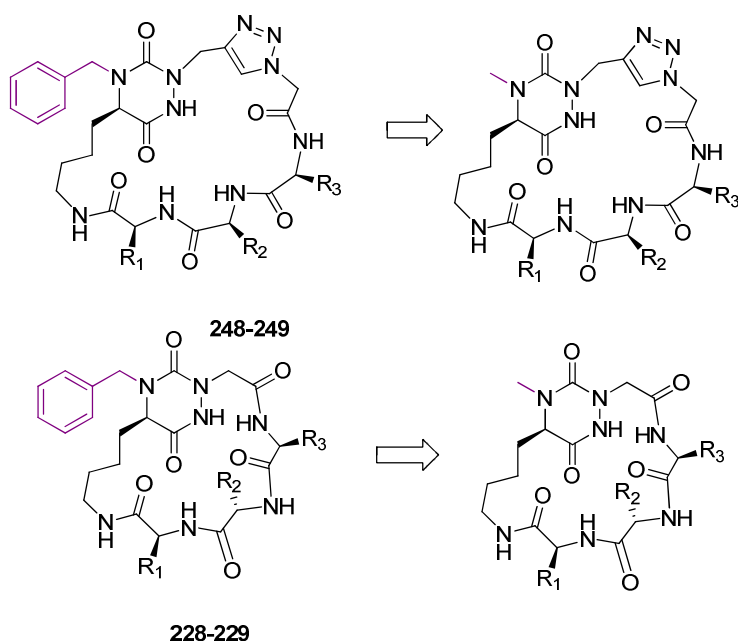


Figure 150 : Etude de l'influence du groupement benzyle sur l'activité biologique des aza-peptides cycliques

iv. Conclusion

Deux voies de synthèse originales sur support solide pour accéder à des peptides cycliques contenant une aza-dicétopipérazine ont été développées. Après 13 étapes, les composés sont obtenus avec des puretés de 54% à 96% et des rendements isolés de 2% à 4%. Cette structure permet l'incorporation d'un point de diversité sur l'aza-dicétopipérazine, et de trois points de diversité par les chaînes latérales des acides aminés. Il serait intéressant d'étudier l'étendue de la méthode et de la généraliser à la synthèse d'aza-peptides cycliques contenant plus de trois acides aminés.

V. Conclusion et perspectives

En conclusion, sur les deux molécules modélisées pour mimer l'ocytocine, l'une d'entre elle, l'aza-dicétopipérazine **115**, se fixe effectivement efficacement sur le récepteur de l'ocytocine avec des propriétés d'antagoniste, comme attendu. Cette molécule ayant racémisé, une optimisation de la formation du semicarbazide est nécessaire pour obtenir un produit optiquement pur et déterminer quel énantiomère est actif.

La transformation de la DCP antagoniste du récepteur de l'ocytocine en aza-dicétopipérazine **147** n'a pas pu être effectuée. En perspective, une nouvelle voie de synthèse est envisagée.

Une nouvelle voie de synthèse originale des 1,4-diazépin-2-ones a été développée. Le dérivé synthétisé **116** ne présente cependant aucune activité sur les récepteurs de la vasopressine

V_{1a} et de l'ocytocine. Le châssis 1,4-diazepin-2-one n'oriente sans doute pas les trois acides aminés idéalement dans l'espace.

Deux voies de synthèse de peptides cycliques contenant une aza-dicétopipérazine ont été développées. Les deux molécules testées **228** et **246** n'ont pas d'activité, ni de liaison sur les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V₂ et de l'ocytocine. Une superposition de ces molécules sur l'ocytocine nous permettrait d'optimiser la structure du mime peptidique. Ces deux peptides contenant une aza-DCP sont néanmoins des mimes peptidiques originaux, jamais décrits dans la littérature obtenus par synthèse sur support solide avec de très bonnes puretés.

Conclusion générale et perspectives

Les récepteurs couplés aux protéines G constituent la plus grande famille de protéines membranaires et interviennent dans de nombreux processus physiologiques. Il est donc intéressant de s'y intéresser d'un point de vue mécanistique mais également thérapeutique. Ce travail de thèse s'intéresse plus particulièrement aux récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine.

Le projet avait deux objectifs majeurs. Il s'agissait dans un premier temps de concevoir des sondes moléculaires fluorescentes afin de mieux comprendre l'architecture fonctionnelle des récepteurs et de développer des tests permettant d'accélérer la découverte de nouveaux ligands. Il s'agissait dans un second temps de concevoir des agonistes non-peptidiques des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine afin de moduler leur activité *in vivo* et d'étudier, à termes, leurs implications dans l'affect, l'attachement et l'autisme.

Dans une **première partie**, nous avons conçu et synthétisé les **premiers ligands fluorescents non-peptidiques des récepteurs de l'ocytocine et de la vasopressine**. Ces ligands fluorescents ont permis de développer en partenariat avec l'IGF de Montpellier et la société CisBio des **tests de liaisons par TR-FRET** pour les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine. Ces tests ont été validés par des expériences de compétitions (*Partie 1 Chapitre 1*) et ont été utilisés pour effectuer du criblage robotisé à haut débit en évitant ainsi de recourir à la radioactivité.

Les ligands fluorescents développés ont permis par ailleurs d'aborder la question plus fondamentale et mécanistique de la dimérisation fonctionnelle des récepteurs. Les ligands des récepteurs V_{1a} et V_2 ont permis de démontrer sur cellules la possibilité pour ces récepteurs **d'homodimériser ou d'hétérodimériser**. Par ailleurs un test de liaison sur le récepteur V_{1a} en hétérodimère avec le récepteur V_2 est réalisé pour la première fois ce qui permet d'étudier l'influence de l'hétérodimérisation sur l'activité des ligands pour le récepteur de la vasopressine V_{1a} . Les sondes fluorescentes non-peptidiques développées sont stables en milieu physiologique contrairement aux ligands peptidiques et pourraient dans un futur proche être utilisées pour étudier l'hétérodimérisation en conditions physiologiques sur tissus natifs (*Partie 1 Chapitre 2*).

Dans une **deuxième partie**, nous avons cherché à développer des agonistes non-peptidiques des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine. Actuellement, il n'existe pas d'agoniste non-peptidique du récepteur de la vasopressine V_{1a} et seulement deux agonistes non-peptidiques partiels et peu sélectifs du récepteur de l'ocytocine (Ferring-1 et WAY-267464). Nous avons suivi trois stratégies pour atteindre cet objectif : le criblage, l'optimisation des structures existantes et la conception de novo d'agonistes autour de plates-formes chimiques originales.

Les criblages de la chimiothèque du laboratoire et de la chimiothèque Prestwick en utilisant notamment les tests que nous avons mis au point, n'ont pas permis d'isoler de touches agonistes pour les récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine (*Partie 2 Chapitre 1*). Ces récepteurs semblent résister particulièrement à l'activation pour protéger les fonctions qu'ils contrôlent, essentielles pour la pérennité de l'espèce. Le criblage pourra cependant être étendu à d'autres chimiothèques.

L'optimisation de benzodiazépines ocytocinergiques par études de relations structure-activité montre la subtilité de l'activation du récepteur de l'ocytocine. Les déterminants essentiels pour une fixation et une bonne efficacité du ligand ont été identifiés. La plupart des modifications des ligands de référence, agonistes partiels et non spécifiques, entraînent soit une perte de sélectivité soit une perte de fonction. Cependant, nous avons développé trois molécules particulièrement intéressantes :

- Le ligand **SL-II-135**, conçu au laboratoire avant mes travaux par troncature du Ferring-1, présente un agonisme partiel mais des caractéristiques pharmacocinétiques améliorées. Nous avons engagé des études de signalisation en partenariat avec Bice Chini qui nous ont permis de montrer que cette molécule est un **agoniste biaisé** (*Partie 2 Chapitre 2*) qui permettra d'explorer certaines fonctions particulières de l'OT associées aux voies de signalisation spécifiquement activées ;
- Deux nouvelles molécules (composés **88** et **94**) se sont révélées être les premiers **agonistes entiers non-peptidiques** du récepteur de l'ocytocine, avec une très bonne efficacité pour OXTR mais avec une sélectivité et des caractéristiques pharmacocinétiques qui restent à améliorer.

Les trois molécules mériteront d'être étudiées *in vivo* chez l'animal (modèle d'autisme chez les souris knock-out du récepteur mu et modèle d'interaction sociale chez le singe).

Des **petites plates-formes originales** dérivées **d'aza-dicétopipérazine** et de **1,4-diazépin-2-ones** ainsi que des **aza-peptides** ont été développées afin de venir mimer les trois acides aminés clés de l'ocytocine. Nous avons mis au point une méthode de synthèse en solution pour accéder à des molécules construites autour du châssis 1,4-diazépin-2-ones et une synthèse sur support pour accéder à des peptides cycliques contenant une aza-dicétopipérazine. Le dérivé 1,4-diazépin-2-ones **116** et les dérivés peptides cycliques contenant une aza-dicétopipérazine **228** et **246** ne montrent malheureusement aucune affinité et/ou activité pour le récepteur de l'ocytocine (*Partie 2 Chapitre 3*). Par contre, la stratégie de synthèse développée préalablement au laboratoire a permis d'accéder facilement à des dérivés aza-dicétopipérazines. Parmi ceux-ci, la molécule **115** montre comme espéré une affinité préférentielle pour le récepteur de l'ocytocine, ce qui ouvre la voie à des études ultérieures d'optimisation vers des ligands non-peptidiques totalement originaux.

En conclusion, nos travaux ont fourni des outils et des méthodes pour accélérer la découverte de ligands ocytocinergiques et explorer quelques mécanismes fondamentaux de leur action (oligomérisation ; diversité fonctionnelle). Nous avons produit les meilleurs agonistes non-peptidiques du récepteur de l'ocytocine disponibles à ce jour et l'étude de leur activité in vivo est amorcée. Du chemin reste à parcourir pour optimiser leur profil pharmacodynamique et pharmacocinétique, alors que le récepteur V_{1a} reste encore pour l'instant vierge d'agonistes. La recherche peut et doit donc continuer pour apporter une solution thérapeutique aux problèmes d'interaction sociale et d'autisme.

Méthodes d'évaluation biologique

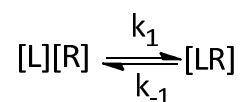
La caractérisation biologique au cours de cette thèse est effectuée par deux groupes de biologistes :

- Pour la mise au point de tests de criblage et la mesure d'hétérodimérisation sur cellules : l'équipe du Département de Pharmacologie Moléculaire de l'Institut de Génomique Fonctionnelle (Thierry Durroux et Thiéric Rodrigues) ainsi que l'entreprise CisBio (Elodie Dupuis, Laurent Lamarque).
- Pour la biologie moléculaire et pour le criblage du récepteur V_{1a} (mesure de l'affinité et de la fonction) : la plateforme PCBIS (Pascal Villa, Christel Valencia et Sophie Gioria).

Les principes des tests de liaison et de fonction sont décrits plus en détails dans cette partie.

I. Principe des tests de liaison

La liaison du ligand sur son récepteur est une réaction réversible. L'étude de cette liaison suit la loi de masse, modèle proposé au début du XX^{ème} siècle, qui postule que lors d'une réaction chimique, les concentrations de réactifs de départ et de produits formés sont reliées par une valeur constante à température donnée. Cette loi d'action de masse est utilisée pour quantifier l'interaction ligand récepteur par l'équation suivante :



Avec k_{-1} , la constante cinétique de dissociation exprimée en $\text{mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$; k_1 , la constante cinétique d'association exprimée en $\text{mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$; $[L]$, la concentration en ligand libre exprimée en mol.L^{-1} ; $[R]$, la concentration en récepteur exprimée en mol.L^{-1} ; $[LR]$ la concentration en complexe ligand-récepteur exprimée en mol.L^{-1} .

Le K_d est la constante de dissociation à l'équilibre et exprime la concentration de ligand nécessaire pour avoir la moitié des récepteurs occupés. Le K_d s'exprime selon l'équation suivante :

$$K_d = \frac{[L][R]}{[LR]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

La constante d'association du complexe ligand-récepteur à l'équilibre K_a est l'inverse du K_d et est exprimée selon l'équation suivante :

$$K_a = \frac{1}{K_d}$$

Le B_{\max} est la quantité totale de récepteurs :

$$B_{\max} = [R] + [LR]$$

1. Méthodes de saturation

A partir d'une préparation cellulaire, tissulaire ou membranaire contenant le récepteur à étudier et d'une concentration connue d'un ligand marqué à I^{135} , C^{14} ou H^1 , il est possible de déterminer la liaison totale du ligand. La liaison totale correspond à la somme de la liaison du ligand avec son récepteur et de la liaison non spécifique (avec d'autres sites de liaison de faible affinité).

La mesure de liaison non spécifique est effectuée en présence d'un excès de ligand froid pour saturer tous les sites spécifiques et empêcher la fixation du ligand radioactif. La liaison spécifique est la différence entre liaison totale et liaison non spécifique et permet de déterminer l'affinité du ligand radioactif pour son récepteur. Une courbe de saturation peut alors être tracée en représentant la concentration en ligand [L] en fonction de la concentration de ligand lié [LR]. Cette courbe suit l'équation de Langmuir et permet de déterminer la constante d'association à l'équilibre (K_d) qui détermine l'affinité du ligand pour son récepteur et le B_{\max} qui représente le nombre maximal de récepteurs à la surface.

$$[LR] = \frac{B_{\max} \times [L]}{K_d + [L]}$$

La linéarisation des données de la courbe de saturation par un tracé semi-logarithmique est la représentation de Scatchard qui représente la relation entre le log [L] et le rapport $[LR]/[L]$. Plus la pente est forte, plus la valeur de K_d est faible (pente = $-1/K_d$), plus l'affinité du ligand pour son récepteur est forte.

2. Méthode de déplacement (ou de compétition)

Pour déterminer ou étudier la fixation de molécules non radioactives sur le récepteur étudié, les expériences de déplacement ou de compétition permettent de déterminer l' IC_{50} qui est la concentration de ligand non radioactif nécessaire pour déplacer 50% de la fixation totale du ligand radioactif et le K_i qui est la constante d'inhibition. On part d'une concentration fixe de

ligand radioactif et on rajoute une concentration croissante de ligand non radioactif à tester. L'équation de Cheng-Prusoff permet de déterminer la constante d'inhibition K_i :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[L]}{K_d}\right)}$$

avec $[L]$ la concentration en radioligand et K_d sa constante de dissociation.

II. Principe des tests fonctionnels

L'effet de l'interaction d'un ligand avec son récepteur peut être mesuré à différents niveaux de la signalisation cellulaire. Pour déterminer l'effet d'une molécule, l'effet pharmacologique est mesuré pour des doses croissantes de la molécule à étudier. Au cours de ce projet les essais fonctionnels ont été effectués par mesure du messenger secondaire : mesure du signal calcique.

L'activation des protéines G_q conduit à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (par la production de $InsP_3$ qui est rapidement converti en $InsP_2$ puis $InsP_1$). Après activation des récepteurs V_{1a} et OT, la production de calcium ou de $InsP_1$ peut être quantifiée. Des kits commerciaux permettent une quantification des messagers secondaires. L'effet agoniste est mesuré en incubant les cellules en présence du ligand seul. La concentration en ligand nécessaire pour avoir 50% de l'effet maximal est appelée K_{act} ou EC_{50} . Ce paramètre donne une idée de la puissance de l'agoniste. Le pourcentage de la réponse induite par rapport à celle obtenue avec le ligand endogène est appelée E_{max} et traduit l'efficacité du ligand.

Pour évaluer l'effet d'un antagoniste il faut réaliser des courbes de dose-réponse du ligand endogène avec des concentrations croissantes en antagoniste. La concentration de ligand nécessaire pour inhiber 50% de la réponse induite par le ligand endogène est appelée IC_{50} . On peut déduire la constante d'inactivation K_{inact} en utilisant l'équation de Cheng et Prusoff :

$$K_{inact} = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[agoniste]}{EC_{50}(agoniste)}\right)}$$

III. Protocoles

1. Caractérisation des ligands non peptidiques du récepteur de l'ocytocine : tests de liaisons par TR-FRET sur les lignées V_{1a}, V₂ et OT.

Les composés sont testés en liaison en utilisant des cellules HEK293 surexprimant les récepteurs de la vasopressine V_{1a} (V_{1a}-SnapTag), de la vasopressine V₂ (V₂-SnapTag) et de l'ocytocine (OT-SnapTag) marqués au Lumi4Tb. La courbe dose-réponse des composés est réalisée en mesurant la liaison spécifique en présence du ligand fluorescent à une concentration déterminée. Pour cela, les cellules sont décongelées au bain-marie à 37 °C et sont rapidement transférées dans un tube contenant le tampon Tag-Lite (Tag-Lite Buffer, TLB). Le tube est centrifugé 5 min à 1200 rpm à TA. Le surnageant est éliminé par aspiration. Les cellules sont resuspendues dans du TLB pour avoir une concentration de 1.10^6 C/mL et distribuées dans les plaques 384 puits à raison de 10000 cellules par puits. Les composés à tester sont alors ajoutés sur les cellules ainsi que le ligand fluorescent. La plaque est incubée à TA et le signal fluorescent est mesuré avec le lecteur EnVision (Perkin Elmer) après 1 h ou 3 h par mesure du ratio HTRF 665/620.

2. Caractérisation des ligands non peptidiques du récepteur de l'ocytocine : mesure de la réponse fonctionnelle

Les composés sont testés sur des cellules HEK293 surexprimant le récepteur de l'ocytocine (OT sauvage) et le récepteur de la vasopressine V_{1a} (V_{1a}-SnapTag). La réponse fonctionnelle est mesurée par dosage du flux calcique intracellulaire.

Pour cela, les cellules sont incubées pendant 45min à 37°C en présence de 5µM de sonde fluorescente Indo-1 AM dans du tampon HEPES-BSA. Après une étape de lavage, les cellules sont mises en suspension dans le tampon et distribuées en plaque 384 puits à raison de 50000 cellules par puits. Le flux calcique intracellulaire est mesuré en suivant la fluorescence de la sonde Indo-1 (excitation à 338nm, émission à 401 et 475nm) pendant 3 minutes sur le lecteur FlexStation® 3 (Molecular Devices).

L'effet agoniste est mesuré en ajoutant le composé seul sur les cellules. L'effet antagoniste est mesuré en ajoutant le composé mélangé au ligand endogène (AVP ou OT) à une concentration déterminée proche de son EC80.

Indo-1 est un outil fluorescent excitable par UV qui permet de quantifier le calcium intracellulaire. En présence de calcium, après excitation à 338 nm, le pic d'émission se déplace de 475 nm à 401 nm. La concentration en calcium peut être déterminée en mesurant le ratio des intensités de fluorescence aux deux longueurs d'onde. L'Indo-1 est présent sous la forme d'un ester (indo-1 AM ester) qui est perméable et rentre dans la cellule où il est hydrolysé en indo-1 par des estérases endogènes.

Partie expérimentale

Indications générales

Solvants et réactifs

La verrerie pour les manipulations anhydres est préalablement séchée. Les solvants anhydres utilisés sont commerciaux et conservés sur tamis moléculaire (Aldrich, Acros, Fluka). Les réactifs sont achetés auprès des fournisseurs suivants : Acros, Sigma-Aldrich, Alfa-Aesar, Fluka, Invitrogène, Polypeptide, NovaBioChem.

Réactions au four à micro-ondes (MW)

Les irradiations micro-ondes ont été effectuées avec un appareil *Biotage Initiator 2.0*.

Points de fusion (Pf)

Les points de fusions ont été mesurés avec un appareil *Büchi B-540*.

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été enregistrés sur des spectromètres *Brucker Advance* à 300, 400 et 500 MHz pour la RMN ^1H et à 101 MHz pour la RMN ^{13}C . Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) et les constantes de couplages en Hertz (Hz) par rapport aux solvants deutérés standards. Les abbréviations suivantes sont utilisées :

sl : singulet large

s : singulet

d : doublet

t : triplet

dd : doublet de doublet

dt : doublet de triplet

q : quadruplet

m : multiplet

Spectrométrie de masse

Les spectres de masse de basse résolution (LC-MS) ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre *Agilent Technologies MSD 1200 SL* simple quadripôle à source multimode ESI/APCI équipé d'une colonne *Thermo Hypersil GOLD 1.9 μm , 1 \times 30mm*.

Les spectres de masse de haute résolution ont été réalisés à l'aide de l'appareil *Agilent Q.Tof* équipé d'une source d'ionisation en electrospray et d'un analyseur à temps de vol (ESI-TOF).

Chromatographie

Les chromatographies sur couches minces ont été effectuées sur des plaques de gel de silice *Merck 60 F254* sur feuille d'aluminium.

Les chromatographies liquides à haute pression (HPLC) analytiques et semi-préparatives sont effectuées sur trois appareils :

Appareil *Agilent Technologies 1200 Series* :

Colonne analytique *Supelco Analytic, Ascentis Express C18* (2.7 μM , 4.6 mm \times 75 mm)

Appareil *Gilson Liquid Handler GX271* et *Gilson Personal Purification system PLC2020*:

Colonne semi-préparative 1 *Waters, SymmetryShield RP18* (7 μM , 19 \times 300 mm)

Colonne semi-préparative 2 *Sunfire C18* (5 μM , 19 \times 150 mm)

Les éluants utilisés sont les suivants :

A : H_2O /TFA 0.1%

B : ACN/TFA 0.1%

Les gradients utilisés sont les suivants:

Colonne analytique : 5% à 95% de solvant B dans le solvant A en 7 min, débit 1.6 mL.min⁻¹.

Colonnes semi-préparative 1 ou 2 : 5% à 95% de solvant B dans le solvant A en 30 min à 1 h, débit 20 mL.min⁻¹.

Détection à 220/254 nM

Les temps de rétention (t_R) sont exprimés en minutes.

Les purifications par chromatographie flash ont été effectuées sur un appareil *Armen Spot II* et sur un appareil *Gilson Personal Purification system PLC2020*.

Les éluants utilisés sont les suivants :

C : H₂O

D : ACN

E : AcOEt

F : Heptane

Les gradients utilisés sont les suivants :

Colonne de gel de silice (30 µm, Interchim): 5% à 95% de solvant E dans le solvant F en 30 à 60 min, débit 15-20 mL.min⁻¹

Colonne RP18 (30 µm, Interchim) : 5% à 95% de solvant D dans le solvant C en 7 min, débit 15-20 mL.min⁻¹

Synthèse sur support solide

Les réactions sur support solide ont été effectuées dans des tubes de polypropylène équipés de frittés et de bouchons en polypropylène, sous agitation avec un agitateur orbitalaire à température ambiante ou dans une étuve tournante *Chemflex (Robbins scientific)* pour les réactions à 70 °C. Les résines sont en général lavées avec les solvants suivants : DMF (3×), CH₂Cl₂ (3×) et MeOH (3×). Chaque réaction est contrôlée à l'aide de tests colorimétriques qui détectent les fonctions présentes sur la résine¹⁹⁰²²⁰.

Protocoles généraux de synthèse en solution

(A) Amination réductrice

Une solution du chlorure d'ester méthylique d'acide aminé, de triéthylamine (1 eq) et de MgSO₄ anhydre (1.5 eq) dans le MeOH anhydre est agitée 10 min à TA puis l'aldéhyde (1 eq) est rajouté. Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA. Le NaBH₄ (2 eq) est ajouté par portions sur 5 min. Le mélange réactionnel est agité 1 h à TA puis une solution de NaOH 1N ou NaHSO₄ 10% est rajoutée. La phase aqueuse est extraite trois fois à l'éther. Les phases organiques sont combinées, lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Une purification sur colonne de gel de silice a lieu dans certain cas.

(B) Couplage triphosgène

À une solution de triphosgène (0.3 eq) dissous dans du THF ou du CH₂Cl₂ anhydre est ajoutée une solution du composé alkyl carbazate de *tert*-butyle (2.25 eq) et de DIEA (2.25 eq) dissous dans du THF ou du CH₂Cl₂ anhydre à 0 °C sous argon. Le mélange réactionnel est agité 10 min à TA puis les composés amines secondaires (2.5 eq) et la DIEA (2.5 eq) dissous dans le THF ou CH₂Cl₂ anhydre sont ajoutés au goutte à goutte à TA. Le mélange réactionnel est agité à TA ou à 70 °C. Le milieu

réactionnel est évaporé sous pression réduite et est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice.

(C) Hydrolyse

Une solution du composé semicarbazide (1 eq) et d'hydroxide de lithium (3 eq) dans un mélange MeOH/H₂O (3/1, v/v) est agité 30 min à 0 °C et 3 h à TA. Le MeOH est évaporé sous pression réduite. Une solution de HCl 1N est ajoutée au brut. La phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite.

(D) Couplage EDCI/HoBt

Une solution du composé acide carboxylique (1 eq), de triéthylamine (2 eq), d'EDCI (1.2 eq) et de HOBT (1.2 eq) dans le CH₂Cl₂ est agitée 20 min à TA puis le chlorohydrate de diméthylamine (1 eq) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité 20 h à TA puis repris dans du CH₂Cl₂ et lavé avec une solution 0.3 M de sulfate de potassium, une solution saturée de bicarbonate de sodium et de la saumure. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Après purification, le composé attendu est obtenu.

(E) Formation du thioamide

À une solution contenant le composé amide (1 eq) dans le toluène anhydre est ajouté sous argon le réactif de Lawesson (0.6-1.2 eq). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant une nuit puis est évaporé sous pression réduite. Après purification, le composé attendu est obtenu.

(F) Déprotection de l'OTBDMS

À une solution du composé comportant un groupement hydroxyle protégé par un groupement TBDMS (1 eq) dans le THF anhydre à 0 °C et sous argon est ajoutée une solution de TBAF 1M dans le THF (1.1 eq). Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA et concentré. Le résidu est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après purification, le composé attendu est obtenu.

(G) Déprotection de l'amine

Une solution du composé amine protégé par un Boc (1 eq) dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v) est agitée 30 min à TA puis évaporée sous pression réduite et lyophilisée pour obtenir le produit attendu.

Protocoles généraux de synthèse sur support

Protocole standard de loading de la résine

À une solution de l'acide aminé protégé par un groupement Fmoc (10 eq) dissous dans le CH₂Cl₂ anhydre (5 mL) et quelques gouttes de DMF et refroidi à 0 °C est ajouté le *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (5 eq). Le milieu réactionnel est agité 20 min à 0 °C puis évaporé sous pression réduite. La résine HMBA/Wang (1 eq) est gonflée 30 min dans le DMF (5 mL) et est filtrée. Le résidu et la DMAP (0.1 eq) dissous dans 4 mL de DMF anhydre sont rajoutés à la résine. La résine est agitée la nuit à TA puis est filtrée, lavée (3×DMF, 3×CH₂Cl₂, 3×MeOH) et séchée sous pression réduite. Le loading de la résine est déterminé par dosage du Fmoc.

Protocole standard de dosage du Fmoc de la résine

Une solution de 2% de DBU dans le DMF est préparée dans une fiole jaugée de 50 mL. Environ 5 µmol de résine est pesé dans 3 fioles jaugées de 10 mL. 2 mL de la solution de 2% DBU dans le DMF sont ajoutés à chaque fiole de 10 mL contenant la résine puis sont agités pendant 30 min. Le niveau

est complété avec de l'acétonitrile qualité HPLC. 2 mL de chacune de ces solutions sont transférés dans des fioles de 25 mL et ajustés avec de l'acétonitrile qualité HPLC. Un dosage UV à 304 nM est effectué. Le loading se calcule avec l'équation suivante :

$$\text{loading} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \frac{(\text{Abs échantillon} - \text{Absorbance référence}) * 16.4}{\text{mg résine}}$$

(H) Protocole standard 1 de déprotection du Fmoc

La résine de Wang ou HMBA loadée avec les acides aminés protégés par un groupement Fmoc est gonflée dans le DMF pendant 1 h. La solution est filtrée et une solution de 20% de pipéridine dans le DMF (1.5 mL) est ajoutée. Le mélange est agité 15 min à TA. La solution est filtrée et l'étape de déprotection est répétée une seconde fois. La solution est filtrée et la résine est lavée successivement avec DMF et du CH₂Cl₂. La fin de la réaction est contrôlée avec les tests de Kaiser et TNBS.

(I) Protocole standard 2 de déprotection du Fmoc

La résine de Wang ou HMBA loadée avec les acides aminés protégés par un groupement Fmoc est gonflée dans le DMF pendant 1 h. La solution est filtrée et une solution de 2% de DBU dans le DMF (1.5 mL) est ajoutée. Le mélange est agité 3 min à TA. La solution est filtrée et l'étape de déprotection est répétée une seconde fois (5 min). La solution est filtrée et la résine est lavée successivement avec du DMF et du CH₂Cl₂. La fin de la réaction est contrôlée avec les tests de Kaiser et TNBS.

(J) Protocole standard de couplage d'aldéhyde

La résine est gonflée dans le TMOF anhydre (1.5 mL) et l'aldéhyde (10 eq) est ajouté. La solution est agitée à TA pendant 90 min. La solution est filtrée et la résine est lavée avec du TMOF anhydre. Un test TNBS négatif confirme la fin du couplage.

(K) Protocole standard de réduction de l'imine

La résine est gonflée dans le TMOF anhydre (1.5 mL) et le cyanoborohydrure de sodium (10 eq) est ajouté. La solution est agitée 15 min à TA et de l'acide acétique (10 eq) est ajouté. La solution est agitée 1 h à TA. La solution est filtrée et la résine est lavée avec du MeOH, du CH₂Cl₂ et du THF. La fin de la réaction est contrôlée avec les tests TNBS et chloranil.

(L) Protocole standard de formation du lien urée par activation sur support

La résine est gonflée dans du THF anhydre (1.5 mL) et la 2,4,6-collidine (10 eq) et le triphosgène (10 eq) sont ajoutés. La solution est agitée 30 min à TA. La solution est filtrée et la résine est lavée successivement avec du THF anhydre, du CH₂Cl₂ anhydre, du THF anhydre et de l'éther. La résine est transférée dans un tube microonde et une solution du dérivé *N'*-alkyl/aryl carbazate de *tert*-butyle (10 eq) et de DIEA (10 eq) dans le THF anhydre est ajoutée. Le tube est scellé et la solution est agitée à 70 °C pendant une nuit. La solution est filtrée et la résine est lavée successivement avec du CH₂Cl₂, du MeOH et de l'éther.

(M) Protocole standard du couplage d'un acide aminé protégé par un groupement Fmoc

La résine est gonflée dans le DMF. L'acide aminé protégé par un groupement Fmoc (4 eq), le HBTU (3.8 eq), le HOBT (4 eq) et la DIEA (12 eq) sont dissous dans le DMF anhydre (1.5 mL), agités pendant 1 min puis ajoutés à la résine. La solution est agitée 1 h à TA. La solution est filtrée et la résine lavée successivement avec du DMF, du CH₂Cl₂, du MeOH et du DMF. La fin du couplage est contrôlée avec les tests de Kaiser et TNBS.

(N) Protocole déprotection de l'ester allylique

La résine est séchée sous vide. Sous argon le palladium(0)tétrakis(triphénylphosphine) (2 eq) est dissous dans 1.5 mL d'un mélange $\text{CHCl}_3/\text{ACOH}/\text{NMM}$ (37/2/1, v/v/v) et transféré sur la résine. La résine est agitée 2 h à TA. La solution est filtrée et lavée successivement avec une solution de 0.5% de DIEA dans du DMF, du DMF, du CH_2Cl_2 et du MeOH. La fin de l'hydrolyse est contrôlée par un test au malachite green.

(O) Protocole standard de cyclisation sur support

La résine est gonflée dans le DMF. Le PyBOP (4 eq) et la DIEA (4 eq) sont dissous dans le DMF anh (1.5 mL) et sont ajoutés à la résine. La résine est agitée 6 h à TA. La solution est filtrée et la résine est lavée successivement avec du DMF, du CH_2Cl_2 et du MeOH. La fin du couplage est contrôlée avec les tests de Kaiser et TNBS.

(P) Protocole standard de click sur support

La résine est séchée sous vide. Une solution de TBTA (0.2 eq), d'ascorbate de sodium (3 eq), de sulfate de cuivre hexahydraté (0.1 eq) dans un mélange NMP/ H_2O (1.5 mL, 10/1, v/v) est ajoutée à la résine sous argon. La résine est agitée une nuit à TA. La solution est filtrée et lavée successivement avec une solution de NMP/ H_2O (10/1, v/v), du CH_2Cl_2 et du MeOH. La fin de la réaction est contrôlée par mini clivage de quelques billes de résine.

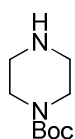
(Q) Protocole standard de formation du lien urée par activation en solution

A une solution du dérivé *N'*-alkyl/aryl carbazate de *tert*-butyle (10 eq), la DIEA (10 eq) dans le CH_2Cl_2 anhydre et à 0°C est ajoutée la solution de phosgène 20% dans le toluène (10 eq). Le mélange réactionnel est agité 15 min à 0°C puis est évaporé sous pression réduite (coévaporation avec CH_2Cl_2 trois fois). Le résidu est séché sous la pompe.

La résine est gonflée dans du THF anhydre (1.5 mL) et la 2,4,6-collidine (10 eq) et le triphosgène (10 eq) sont ajoutés. La solution est agité 30 min à TA. La solution est filtrée et la résine est lavée successivement avec du THF anhydre, du CH_2Cl_2 anhydre, du THF anhydre et de l'éther. La résine est transférée dans un tube microonde. Le résidu et la DIEA (10 eq) dissous dans le THF anhydre (1.5 mL) sont ajoutés à la résine. Le tube est scellé et la solution est agitée à 70 °C pendant une nuit. La solution est filtrée et la résine est lavée successivement avec du CH_2Cl_2 , du MeOH et de l'éther.

Modes opératoires Partie 1 Chapitre 1

2 pipérazine-1-carboxylate de *tert*-butyle



$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$
MM 186,25
EP-I-18

À une solution de pipérazine (4 g, 46.5 mmol, 5 eq) dans le CH_2Cl_2 (50 mL) à 0 °C sous argon est ajoutée sur 1 h une solution de di-*tert*-butyldicarbonate (2.18 g, 10 mmol, 1 eq) dans le CH_2Cl_2 . Le mélange réactionnel est agité 12 h à TA. Le précipité blanc est filtré. Le filtrat est concentré, dilué avec de l'eau et le précipité blanc est à nouveau filtré. Le filtrat est saturé avec du carbonate de potassium et extrait avec de l'éther. Les phases organiques sont assemblées, séchées sur Na_2SO_4 et évaporées sous pression réduite pour obtenir un solide blanc (1.51 g, 73%).

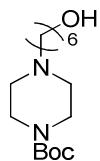
Rf = 0.33 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9/1, v/v)

Pf = 66 °C

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.22-3.19 (m, 4 H), 2.61-2.57 (m, 4 H), 1.38 (s, 9 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 153.9, 78.4, 50.8, 45.5, 45.4, 38.0.

3 4-(6-hydroxyhexyl)pipérazine-1-carboxylate de *tert*-butyle



C₁₅H₃₀N₂O₃
MM 286,41
EP-I-24

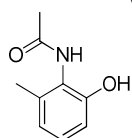
À une solution de pipérazine-1-carboxylate de *tert*-butyle (239 mg, 1.22 mmol, 1.2 eq) dans l'acétonitrile anhydre (2 mL) sont ajoutés le carbonate de potassium (307 mg, 2.22 mmol, 2 eq) et le 6-bromo-1-héxanol (150 µL, 1.11 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 2 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur Na₂SO₄ et concentrée sous pression réduite pour obtenir une huile incolore (210 mg, 66%)

Rf = 0.17 (Heptane/AcOEt, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.59 (td, 2 H, J = 6.6, 4.0 Hz), 3.41 (m, 4 H), 2.36 (m, 6 H), 1.52 (m, 6 H), 1.43 (s, 9 H), 1.32 (m, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 154.9, 79.8, 62.9, 58.7, 53.2, 51.4, 44.3, 43.4, 34.0, 28.6, 27.3, 26.7, 25.7.

4 N-(2hydroxy-6-méthylphényl)acétamide



C₉H₁₁NO₂
MM 165,19
EP-I-51

À une solution de 2-amino-3-méthylphénol (800 mg, 6.49 mmol, 1 eq) dans l'AcOEt à 0 °C est ajouté l'anhydride acétique (1.4 mL, 14.93 mmol, 2.3 eq). Le mélange réactionnel est agité 3 h à TA. Après filtration, un solide orange est obtenu (700 mg, 65%).

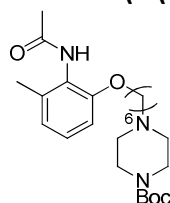
Rf = 0.60 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

Pf = 89.5 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.04 (d, 2 H, J = 5.3 Hz), 6.95 (t, 1 H, J = 7.8 Hz), 6.67 (ddd, 2 H, J = 14.5, 7.8, 1.4 Hz), 2.09 (s, 3 H), 2.02 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.4, 144.5, 128.1, 119.3, 114.9, 112.8, 105.4, 13.1, 8.7.

5 4-(6-(2-acétamido-3-méthylphénoxy)hexyl)pipérazine-1-carboxylate de *tert*-butyle



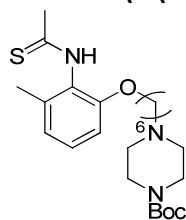
C₂₄H₃₉N₃O₄
MM 433,58
EP-I-77

À une solution de 1,1'-(azodicarbonyl)dipipéridine (560 mg, 2.22 mmol, 3 eq) dans le THF anhydre (17 mL) sous une atmosphère d'argon à 0 °C est ajoutée la tributylphosphine (555 µL, 2.22 mmol, 3 eq). Le mélange réactionnel est agité 20 min à 0 °C et le 4-(6-hydroxyhexyl)pipérazine-1-carboxylate de *tert*-butyle (530 mg, 1.85 mmol, 2.5 eq) dissous dans le THF anhydre (4 mL) est ajouté au mélange réactionnel. Après 10 min, le *N*-(2hydroxy-6-méthylphényl)acétamide (122 mg, 0.740 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (3 mL) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité 1 h à 0 °C et une nuit à TA. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur phase inverse, une huile jaune est obtenue (256 mg, 79%).

t_R = 3.59 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.07 (dd, 1 H, J = 8.7, 7.4 Hz), 6.81 (s, 1 H), 6.69 (d, 1 H, J = 8.1 Hz), 3.92 (dd, 2 H, J = 8.1, 5.3 Hz), 3.45-3.39 (m, 4 H), 2.39-2.31 (m, 6 H), 2.21 (s, 3 H), 2.16 (s, 3 H), 1.75 (q, 4 H, J = 6.9 Hz), 1.53-1.47 (m, 2 H), 1.43 (s, 9 H), 1.37-1.33 (m, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.0, 154.7, 152.9, 136.9, 127.2, 124.4, 122.7, 109.4, 79.6, 68.4, 58.6, 53.0, 44.1, 29.1, 28.4, 27.2, 26.0, 23.8, 18.5, 13.6.

6 4-(6-(2-éthanethioamido-3-méthylphénoxy)héxyl)pipérazine-1-carboxylate de *tert*-butyle

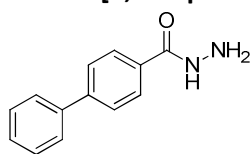
C₂₄H₃₉N₃O₃S
MM 449,65
EP-I-86

À une solution de 4-(6-(2-acétamido-3-méthylphénoxy)héxyl)pipérazine-1-carboxylate de *tert*-butyle (450 mg, 1.038 mmol, 1 eq) dans le toluène anhydre (14 mL) et sous argon est ajouté le réactif de Lawesson (335 mg, 0.830 mmol, 0.8 eq). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 1 h 15 min. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie flash en phase inverse pour obtenir une poudre blanche (385 mg, 83%).

t_R = 4.06 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.16 (dt, 1 H, *J* = 14.4, 7.1 Hz), 6.81 (t, 1 H, *J* = 7.3 Hz), 6.72 (t, 1 H, *J* = 6.7 Hz), 3.87 (s, 2 H), 3.79-3.70 (m, 4 H), 3.56-2.90 (m, 6 H), 2.67 (s, 2 H), 2.21 (d, 3 H, *J* = 5.3 Hz), 2.16 (s, 2 H), 1.86-1.55 (m, 4 H), 1.43 (s, 9 H), 1.27 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 202.3, 153.9, 153.8, 128.6, 126.4, 122.5, 113.0, 110.3, 80.9, 68.5, 57.1, 55.2, 51.5, 33.7, 29.5, 28.3, 26.2, 25.5, 18.0.

8 [1,1'-biphényl]-4-carbohydrazide

C₁₃H₁₂N₂O
MM 212,25
EP-I-14

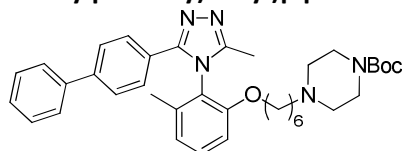
À une solution de méthylbiphényl-4-carboxylate (1g, 4.734 mmol, 1 eq) dans l'EtOH (25 mL) est ajoutée l'hydrazine (1.5 mL, 47.34 mmol, 10 eq). Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant deux jours. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'EtOH. Le solide blanc est filtré. Le filtrat est concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'EtOH et le solide blanc est à nouveau filtré. Le solide blanc est combiné et séché sous vide pour obtenir le composé **8** (720 mg, 72%).

Rf = 0.15 (Heptane/EtOAc, 1/1, v/v)

Pf = 195 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.82 (s, 1 H), 7.93 (d, 2 H, *J* = 8.3 Hz), 7.74 (dd, 4 H, *J* = 12.5, 7.0 Hz), 7.48 (t, 2 H, *J* = 7.4 Hz), 7.40 (t, 1 H, *J* = 7.4 Hz), 4.52 (s, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.5, 142.6, 139.2, 132.1, 129.0, 128.0, 127.6, 126.8, 126.5.

9 4-(6-(2-(3-([1,1'-biphényl]-4-yl)-5-méthyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-3-méthylphénoxy)héxyl)pipérazine-1-carboxylate de *tert*-butyle

C₃₇H₄₇N₅O₃
MM 609,80
EP-I-101

À une solution de [1,1'-biphényl]-4-carbohydrazide (141.61 mg, 0.667 mmol, 2 eq) et de 4-(6-(2-éthanethioamido-3-méthylphénoxy)héxyl)pipérazine-1-carboxylate de *tert*-butyle (150 mg, 0.33 mmol, 1 eq) dans le DMF anhydre est ajouté l'acétate de mercure (II) (117 mg, 0.37 mmol, 1.1 eq). Le mélange réactionnel est agité deux jours à TA. Le mélange réactionnel est filtré sur célite (CH₂Cl₂ et CH₂Cl₂/MeOH, 1/1, v/v) et concentré sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash en phase inverse, une huile incolore est obtenue (60 mg, 37%).

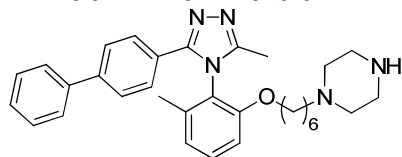
t_R = 4.88 min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.64-7.56 (m, 3 H) 7.52-7.39 (m, 4 H) 7.38-7.31 (m, 1 H), 7.13-7.07 (m, 1 H), 7.03-6.97 (m, 1 H), 4.12-3.92 (m, 2 H), 3.45-3.40 (m, 1 H), 3.37-3.35 (m, 3 H), 3.32-3.29 (m, 3 H),

2.48-2.35 (m, 2 H), 2.27 (t, 3 H, $J = 5.4$ Hz), 2.22 (s, 2 H), 2.2-2.11 (m, 3 H), 1.94 (s, 2 H), 1.67-1.59 (m, 2 H), 1.45 (d, 9 H, $J = 2.6$ Hz), 1.39-1.33 (m, 2 H), 1.31-1.27 (m, 1 H), 1.27-1.14 (m, 3 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 156.4, 156.1, 155.0, 144.4, 141.1, 138.3, 132.9, 130.2, 129.2, 128.9, 128.4, 128.1, 124.2, 123.3, 112.1, 81.4, 69.7, 59.5, 54.1, 54.0, 48.5, 30.0, 28.1, 27.5, 27.0, 17.5.

10 1-(6-(2-(3-([1,1'-biphényl]-4-yl)-5-méthyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-3-méthylphénoxy)héxyl)pipérazine



$\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}$
MM 509,68
EP-I-102

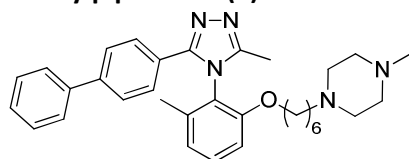
Une solution de 4-(6-(2-(3-([1,1'-biphényl]-4-yl)-5-méthyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-3-méthylphénoxy)héxyl)pipérazine-1-carboxylate de *tert*-butyle dans un mélange TFA/ CH_2Cl_2 (1/1, v/v, 6 mL) est agitée pendant 2h30 à TA, concentrée et lyophilisée pour obtenir une poudre blanche (quant, 95%).

$t_R = 3.90$ min

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.61-7.30 (m, 11 H), 6.96 (t, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 4.02-3.87 (m, 2 H), 3.63 (s, 8 H), 2.99 (s, 2 H), 2.39 (s, 3 H), 1.97 (s, 3 H), 1.70-1.50 (m, 4 H), 1.27-1.1 (m, 4 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 154.2, 144.8, 139.3, 136.8, 133.0, 129.2, 128.6, 128.0, 128.0, 127.2, 123.7, 111.1, 69.0, 57.1, 48.4, 41.0, 28.5, 25.9, 25.4, 23.3, 17.5.

11 1-(6-(2-(3-([1,1'-biphényl]-4-yl)-5-méthyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-3-méthylphénoxy)héxyl)-4-méthylpipérazine (1)



$\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}$
MM 523,71
EW80

À une solution de 1-(6-(2-(3-([1,1'-biphényl]-4-yl)-5-méthyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-3-méthylphénoxy)héxyl)pipérazine (44 mg, 0.06 mmol, 1 eq) dans le CH_2Cl_2 anhydre (14 mL) et sous une atmosphère d'argon sont ajoutés la triéthylamine (16.7 μL , 0.12 mmol, 2 eq), le formaldéhyde 37% aq. (9 μL , 0.12 mmol, 2 eq) et le triacétoxyborohydride de sodium (19 mg, 0.09 mmol, 1.5 eq). Le mélange réactionnel est agité 2 h, dilué avec CH_2Cl_2 , lavé avec une solution de NaHCO_3 10%. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite. Après HPLC semi-préparative, une huile incolore est obtenue (11 mg, 35%).

$t_R = 3.96$ min

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.62-7.39 (m, 10 H), 7.04-6.98 (m, 2 H), 3.07-3.03 (m, 2 H), 2.93 (s, 3 H), 2.46 (s, 3 H), 2.03 (s, 3 H), 1.69-1.60 (m, 4 H), 1.27-1.19 (m, 4 H).

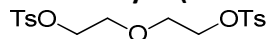
^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 154.1, 144.5, 139.0, 136.7, 132.7, 129.0, 128.5, 127.8, 127.0, 123.5, 110.8, 68.8, 56.7, 50.2, 48.5, 43.2, 28.3, 25.7, 25.4, 23.3, 17.3, 9.7.

HRMS pour $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}^+$) : calc 524.3383, trouvé 524.3403.

Protocole général pour les synthèses des espacesurs :

À une solution de diéthylène glycol, tétraéthylène glycol ou 1,4-pentandiol (1 eq) dans le CH_2Cl_2 à 0 °C est ajouté le chlorure de 4-toluènesulfonyl (2.5 eq) et de triéthylamine (3 eq). Le mélange réactionnel est agité 1 h à 0 °C, 2 h à TA et évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash, les composés **11-12** sont obtenus.

11 oxybis(éthane-2,1-diyl) bis(4-méthylbenzènesulfonate)



$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{S}_2$
MM 414,49
EP-I-50

Solide (**11**, 62%)

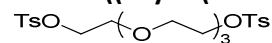
Pf = 165 °C

Rf = 0.32 (Heptane/EtOAc, 4/6, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, 4 H, J = 8 Hz), 7.32 (d, 4 H, J = 8 Hz), 4.08-4.05 (m, 4 H), 3.59-3.56 (m, 4 H), 2.42 (s, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 145.0, 132.9, 129.9, 128.0, 69.0, 68.8, 21.7.

12 ((oxybis(éthane-2,1-diyl) bis(éthane-2,1-diyl) bis(4-méthylbenzènesulfonate)



C₂₂H₃₀O₉S₂

MM 502,60

EP-I-63

Huile (**12**, 67%)

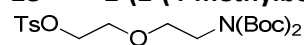
Rf = 0.18 (Heptane/EtOAc, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, 4 H, J = 8 Hz), 7.31 (d, 4 H, J = 8 Hz), 4.12 (t, 4 H, J = 4.9 Hz), 3.65 (t, 4 H, J = 4.6 Hz), 3.57-3.50 (m, 8 H), 2.41 (s, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 145.0, 133.2, 130.0, 128.1, 70.9, 70.7, 69.4, 68.9, 21.8.

À une solution des composés **11-12** (1 eq) dans le DMF anhydre est ajouté le chlorure de césium (6 eq). Le mélange réactionnel est refroidi à 0 °C et l'iminocarboxylate de di-*tert*-butyle (1 eq) dissous dans le DMF anhydre est ajouté au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité 1 h à 0 °C, 1 h à TA et concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'AcOEt et lavé à l'eau et à la saumure. Les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Après chromatographie flash les composés **13-14** sont obtenus.

13 2-(2-(4-méthylbenzène oxosulfonyl)éthoxy)éthyl iminocarboxylate di-*tert*-butyle



C₂₁H₃₃NO₈S

MM 459,55

EP-I-61

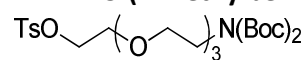
Huile (**13**, 53%)

Rf = 0.40 (Heptane/EtOAc, 3/7, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (d, 2 H, J = 8.2 Hz), 7.27 (d, 2 H, J = 8.7 Hz), 4.05 (t, 2 H, J = 4.8 Hz), 3.66 (t, 2 H, J = 6.1 Hz), 3.56 (t, 2 H, J = 5 Hz), 3.47 (t, 2 H, J = 6.3 Hz), 2.37 (s, 3 H), 1.41 (s, 18 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 152.6, 144.8, 133.1, 129.8, 128.0, 82.4, 69.4, 69.1, 68.2, 45.0, 28.0, 21.0.

14 5-(4-méthylbenzène oxosulfonyl)pentyl iminocarboxylate de di-*tert*-butyle



C₂₅H₄₁NO₁₀S

MM 547,66

EP-I-68

Huile (**14**, 67%)

Rf = 0.52 (Heptane/EtOAc, 3/7, v/v)

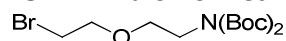
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, 2 H, J = 8.3 Hz), 7.32 (d, 2 H, J = 8.3 Hz), 3.99 (t, 2 H, J = 6.5 Hz), 3.49 (t, 2 H, J = 6.5 Hz), 2.43 (s, 3 H), 1.68-1.61 (m, 2 H), 1.54-1.49 (m, 2 H), 1.46 (s, 9 H), 1.33-1.27 (m, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 152.9, 144.9, 133.4, 130.0, 128.1, 82.4, 70.6, 46.1, 28.8, 28.6, 28.3, 22.91, 21.8.

À une solution des composés **13-14** (1 eq) dans le DMF anhydre est ajouté le bromure de lithium (1.5 eq) sous une atmosphère d'argon. Le mélange réactionnel est agité à 60 °C pendant 2h30 et concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans de l'heptane (15 mL), lavé à la saumure. La

phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite pour obtenir les composés **15-16**.

15 1-bromo-2-éthoxy-éthyl iminocarboxylate di-*tert*-butyle



C₁₄H₂₆BrNO₅

MM 368,26

EW67

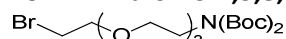
Huile (**15**, 83%)

R_f = 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.73 (t, 2 H, J = 5.9 Hz), 3.69 (t, 2 H, J = 5.9 Hz), 3.57 (t, 2 H), 3.36 (t, 2 H, J = 5.9 Hz), 1.43 (s, 18 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 152.7, 82.4, 70.8, 69.3, 45.2, 30.2, 28.1.

16 1-bromo-2,5,8,11-tétraoxatridecan-13-yl iminocarboxylate di-*tert*-butyle



C₁₈H₃₄BrNO₇

MM 456,37

EW68

Huile (**16**, 71%)

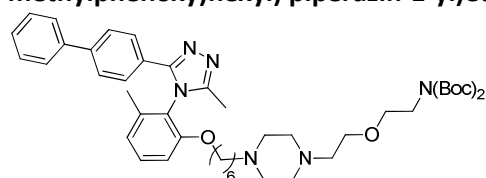
R_f = 0.80 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.73 (dd, 4 H, J = 14.1, 6.7 Hz), 3.63-3.51 (m, 10 H), 3.40 (t, 2 H, J = 6 Hz), 1.43 (s, 18 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 152.2, 82.5, 70.1, 69.4, 44.4, 31.2, 28.1.

À une solution de 1-(6-(2-(3-([1,1'-biphényl]-4-yl)-5-méthyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-3-méthylphénoxy)héxyl)pipérazine (1 eq) dans l'acétonitrile anhydre sont ajoutés la triéthylamine (5 eq) et les composés **15-16** (3 eq). Le mélange réactionnel est agité 48 h à TA et concentré sous pression réduite. Après purification par HPLC semi-préparative, les composés **17-18** sont obtenus.

17 (2-(2-(4-(6-(2-(3-([1,1'-biphényl]-4-yl)-5-méthyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-3-méthylphénoxy)héxyl) pipérazin-1-yl)éthoxy)éthyl)carbamate de di-*tert*-butyle



C₄₆H₆₄N₆O₆

MM 797,04

EW69

Huile jaune (14 mg, 31%).

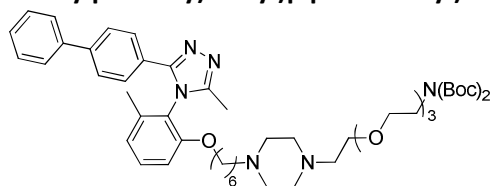
t_R = 5.02 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.55-7.50 (m, 4 H), 7.41-7.36 (m, 3 H), 7.34-7.32 (m, 2 H), 7.28-7.25 (m, 1 H), 7.01 (d, 1 H, J = 8.8 Hz), 6.92 (d, 1 H, J = 8.8 Hz), 4.01-3.91 (m, 2 H), 3.70 (t, 2 H, J = 6 Hz), 3.61 (t, 2 H, J = 5.2 Hz), 3.51 (t, 2 H, J = 5.7 Hz), 3.17-3.09 (m, 3 H), 3.02 (s, 3 H), 2.88 (t, 2 H, J = 5.1 Hz), 2.78 (t, 2 H), 2.16 (s, 3 H), 1.87 (s, 3 H), 1.59-1.53 (m, 2 H), 1.40 (s, 18 H), 1.22-1.19 (m, 4 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 154.3, 144.6, 138.1, 132.9, 130.2, 129.2, 128.9, 128.4, 128.0, 124.2, 123.0, 112.0, 83.9, 70.2, 69.9, 68.0, 57.9, 51.6, 46.3, 29.7, 28.5, 27.2, 26.9, 25.3, 17.3, 10.4.

MS (ES⁺) m/z 797.4 ([M+H]⁺)

18 (2-(2-(2-(2-(4-(6-(2-(3-([1,1'-biphényl]-4-yl)-5-méthyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-3-méthylphénoxy) héxyl)pipérazin-1-yl)éthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl)carbamate de di-*tert*-butyl



C₅₀H₇₂N₆O₈

MM 885,14

EW70

Huile incolore (16 mg, 46%)

t_R = 5.16 min

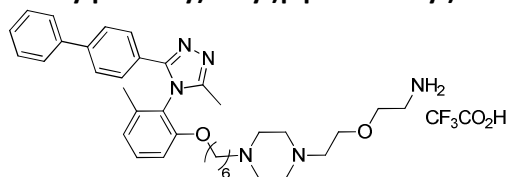
¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7.57-7.50 (m, 4 H), 7.43-7.33 (m, 5 H), 7.29-7.25 (m, 1 H), 7.03 (d, 1 H, *J* = 8.5 Hz), 6.94 (d, 1 H, *J* = 8.5 Hz), 4.00-3.92 (m, 2 H), 3.76-3.74 (m, 2 H), 3.72-3.69 (m, 2 H), 3.58-3.53 (m, 8 H), 3.49-3.47 (m, 4 H), 3.34-3.32 (m, 2 H), 3.00-2.96 (m, 2 H), 2.89 (s, 3 H), 2.76 (s, 3 H), 2.22 (s, 4 H), 1.90 (s, 4 H), 1.57-1.52 (m, 2 H), 1.40 (s, 18 H), 1.21-1.16 (m, 4 H).

¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD) δ 161.7, 151.2, 138.2, 133.3, 130.2, 129.0, 128.5, 128.0, 125.5, 124.3, 112.1, 84.0, 79.0, 71.5, 71.3, 69.9, 66.0, 61.1, 57.7, 57.4, 55.3, 50.5, 49.4, 38.1, 31.7, 29.6, 28.8, 28.4, 27.1, 26.6, 24.9, 17.4, 10.3.

MS (ES⁺) *m/z* 885.4 ([M+H]⁺)

Les composés **17** et **18** sont dissous dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v) et sont agités 3 h à TA. Le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite et lyophilisé.

19 (2-((4-(6-(2-(3-([1,1'-biphényl]-4-yl)-5-méthyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-3-méthylphénoxy)héxyl)pipérazin-1-yl)méthoxy)éthanamine (19).



C₃₆H₄₈N₆O₂.CF₃CO₂H

MM 596,81

EP-I-109

Huile incolore (8.0 mg, 76%)

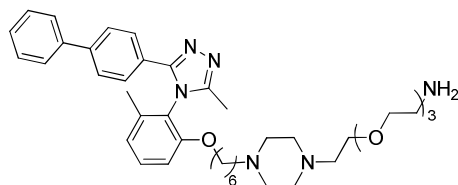
t_R = 4.13 min

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.66-7.58 (m, 4 H), 7.52-7.47 (m, 3 H), 7.43 (t, 2 H, *J* = 7.5 Hz), 7.36 (t, 1 H, *J* = 7.5 Hz), 7.11 (d, 1 H, *J* = 8.2 Hz), 7.02 (d, 1 H, *J* = 8.2 Hz), 4.11-3.98 (m, 2 H), 3.81 (t, 2 H, *J* = 4.9 Hz), 3.73 (t, 2 H, *J* = 4.9 Hz), 3.58-3.37 (m, 5 H), 3.28-3.14 (m, 4 H), 3.28-2.99 (m, 1 H), 2.28 (s, 3 H), 1.97 (s, 4 H), 1.77-1.54 (m, 5 H), 1.42-1.19 (m, 6 H).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 155.9, 144.8, 140.9, 138.3, 133.2, 130.2, 129.3, 129.0, 128.5, 128.1, 126.2, 124.3, 112.2, 69.9, 68.1, 66.7, 57.8, 57.4, 54.9, 50.8, 50.7, 40.5, 29.7, 27.2, 26.7, 25.0, 17.5, 10.5.

HRMS pour C₃₆H₄₈N₆O₂ (M+H⁺) : calc 597.39115, trouvé 597.39038.

20 2-(2-(2-((4-(6-(2-(3-([1,1'-biphényl]-4-yl)-5-méthyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)-3-méthylphénoxy)héxyl)pipérazin-1-yl)méthoxy)éthoxy)éthoxy)éthylamine (20).



C₄₀H₅₆N₆O₄.CF₃CO₂H

MM 684,91

EP-I-108

Clear oil (11 mg, 88%)

t_R = 4.52 min

HRMS pour C₄₀H₅₆N₆O₄ (M+H⁺): calc 685.44358, trouvé 685.44394.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.64 (dd, 4 H, *J* = 18, 8.2 Hz), 7.54-7.42 (m, 5 H), 7.40-7.34 (m, 1 H), 7.13 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.04 (d, 1 H, *J* = 7.7 Hz), 4.11-4.00 (m, 2 H), 3.87-3.83 (m, 2 H), 3.72-3.53 (m, 18 H), 3.42-3.37 (m, 2 H), 3.13 (t, 2 H, *J* = 5 Hz), 3.10-3.04 (m, 2 H), 2.32 (s, 3 H), 2.00 (s, 3 H), 1.69-1.57 (m, 4 H), 1.32-1.22 (m, 4 H).

¹³C NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 162.3, 156.1, 145.1, 140.6, 138.2, 135.8, 133.4, 130.1, 129.4, 129.1, 128.5, 128.1, 124.3, 112.1, 71.6, 71.5, 71.4, 70.0, 68.0, 66.4, 57.8, 57.4, 50.6, 50.1, 40.7, 29.7, 29.7, 27.2, 26.7, 24.9, 17.5, 10.4.

Procédure générale pour le marquage des composés 19 et 20 avec le DY647.

À une solution d'ester de DY647-N-hydrosuccinimidyl (3.8 μmol) dans le DMSO anhydre (325 μL) sont ajoutés en une portion le composé **19** ou **20** (3.5 μmol) et la DIEA (5 μL, 26.6 μmol). Le mélange réactionnel est agité 2 h à TA. Le brut est purifié par HPLC semi-préparative (Waters XBridge RP-C₁₈ column, 5 μm, 19 × 100 mm ; 5 à 60% de solvant B dans solvant A, solvant A : eau/TFA 0.1% ; solvant B : acétonitrile/0.1% TFA ; débit de 20 mL.min⁻¹ ; détection à 280 nm) pour obtenir les ligands fluorescents **21** et **22**.

Composé 21 marqué avec DY647.

Poudre bleue (725 nmol, 21%).

UV (water): λ_{max} 650 nm.

t_R = 16.41 min.

HR-MS pour C₆₈H₈₄N₈O₉S₂ : calc 1220.5803, trouvé 1220.5783.

Composé 22 marqué avec DY647.

Poudre bleue (1008 nmol, 31%).

UV (eau) : λ_{max} 650 nm.

t_R = 16.18 min.

HR-MS pour C₇₂H₉₂N₈O₁₁S₂ : calc 1308.6327, trouvé 1308.6320.

Procédure générale pour le marquage des composés 19 et 20 avec le Lumi-4-Tb.

À une solution d'ester de Lumi4-Tb N-hydrosuccinimidyl (3.8 μmol) dans le DMSO anhydre (362 μL) sont ajoutés en une portion le composé **19** ou **20** (3.5 μmol) et la DIEA (8 μL, 26.6 μmol). Le mélange réactionnel est agité 1 h à TA. Le brut est purifié par HPLC semi-préparative (Waters XBridge RP-C₁₈ column, 5 μm, 19 × 100 mm; 5 à 60% of solvant B dans solvant A, solvant A : 25 mM tampon acétate de triéthylammonium (pH 6); solvant B : acétonitrile ; débit de 20 mL.min⁻¹ ; détection à 280 nm) pour obtenir les ligands fluorescents **23** et **24**.

Composé 23 marqué avec Lumi-4-Tb.

Poudre blanche (770 nmol, 22%).

UV (eau): λ_{max} 339 nm.

t_R = 14.89 min.

HR-MS pour C₁₀₀H₁₂₈N₁₉O₁₆Tb : calc. 2009.9040, trouvée 2009.9027.

Composé 24 marqué avec Lumi-4-Tb.

Poudre blanche (708 nmol, 20%).

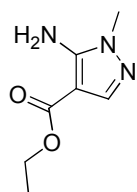
UV (eau): λ_{max} 339 nm.

t_R = 15.02 min.

HR-MS pour C₁₀₄H₁₃₆N₁₉O₁₈Tb : calc. 2097.9564, trouvée 2097.9538.

Mode opératoire Partie 2 Chapitre 2

27 5-amino-1-méthyl-1H-pyrazole-4-carboxylate d'éthyle



$C_7H_{11}N_3O_2$
MM 169,18
EP-II-75

À une solution d'éthoxyméthylène cyanoacétate d'éthyle (5 g, 29.55 mmol, 1 eq) dans de l'EtOH (49 mL) est ajoutée la méthylhydrazine (1.73 mL, 32.51 mmol, 1.1 eq). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 17 h puis évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice ($CH_2Cl_2/MeOH$, 97/3, v/v puis $CH_2Cl_2/MeOH$, 95/5, v/v) pour obtenir un solide jaune (4.5 g, 91%).

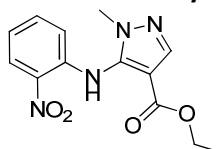
Pf = 102-103 °C

Rf = 0.4 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 95/5, v/v)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 (s, 1 H), 4.22 (q, 2 H, $J = 7.4$ Hz), 3.58 (s, 3 H), 1.29 (t, 3 H, $J = 7.4$ Hz).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.7, 149.4, 139.2, 96.4, 59.7, 34.2, 14.7.

28 1-méthyl-5-((2-nitrophényl)amino)-1H-pyrazole-4-carboxylate d'éthyle



$C_{13}H_{14}N_4O_4$
MM 290,27
EP-II-76

À une solution de 5-amino-1-méthyl-1H-pyrazole-4-carboxylate d'éthyle (4 g, 23.6 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (37 mL) sous argon et à 0 °C, est ajouté par portion du NaH 60% (1.88 g, 47.2 mmol, 2 eq). Le mélange réactionnel beige opaque est agité 2 h à TA, refroidi à 0 °C et le 2-fluoronitrobenzène (2.48 mL, 23.6 mmol, 1 eq) est ajouté à la solution. Le mélange réactionnel est agité 2 jours à TA et neutralisé jusqu'à pH=7 avec une solution de $KHSO_4$ 1M. Le THF est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'AcOEt et lavé avec une solution de $KHSO_4$ 0.3M, une solution de $NaHCO_3$ saturée et de la saumure. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice, un solide brun orangé est obtenu (5.27 g, 77%).

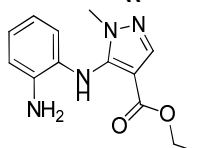
Pf = 62-63 °C

Rf = 0.4 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.22 (dd, 1 H, $J = 8.5, 1.6$ Hz), 7.96 (s, 1 H), 7.43 (ddd, 1 H, $J = 8.5, 7.2, 1.6$ Hz), 6.93 (dd, 1 H, $J = 8.5, 7.1$ Hz), 6.49 (d, 1 H, $J = 8.5$ Hz), 4.15 (q, 2 H, $J = 7.1$ Hz), 2.98 (s, 3 H), 1.14 (t, 3 H, $J = 7.2$ Hz).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 162.4, 141.5, 141.4, 140.3, 136.1, 135.0, 126.8, 119.9, 116.4, 107.9, 60.4, 36.2, 14.2.

29 5-((2-aminophényl)amino)-1-méthyl-1H-pyrazole-4-carboxylate d'éthyle



$C_{13}H_{16}N_4O_2$
MM 260,29
EP-II-85

À une solution de 1-méthyl-5-((2-nitrophényl)amino)-1H-pyrazole-4-carboxylate d'éthyle (4.7 g, 16.19 mmol, 1 eq) dans l'EtOH (160 mL) sont ajoutés une solution de HCl 0.2N (32 mL) et de la poudre de fer (4.52 g, 80.95 mmol, 5 eq). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant une nuit, filtré sur célite, rincé avec CH_2Cl_2 et le filtrat est évaporé sous pression réduite.

Le résidu est repris dans du CH_2Cl_2 et lavé avec une solution de $NaHCO_3$ saturée et de l'eau. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et concentrée. Un solide rose foncé est obtenu (4.24 g, quant).

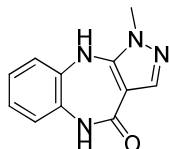
Pf = 107-108 °C

Rf = 0.5 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.65 (s, 1 H), 6.53 (t, 1 H, *J* = 7.4 Hz), 6.34-6.18 (m, 3 H), 3.80 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz), 2.84 (s, 3 H), 0.86 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 164.8, 148.8, 141.7, 139.5, 127.2, 126.7, 124.4, 119.0, 116.2, 100.2, 60.0, 36.8, 14.7.

30 1-méthyl-3a,5,10,10a-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépin-4(1H)-one



C₁₁H₁₀N₄O

MM 214,22

Une solution de 5-((2-aminophényl)amino)-1-méthyl-1H-pyrazole-4-carboxylate d'éthyle (3 g, 11.53 mmol, 1 eq) dans un mélange *i*PrOH/AcOH (54 mL, 9/1, v/v) est portée à 160 °C en tubes scellés sous argon. Après 48h, le contenu des tubes est transféré dans un ballon et laissé à TA pendant 2 jours. Les cristaux formés sont filtrés et lavés à l'éther froid. Le filtrat est concentré et refroidi à 0 °C. Les cristaux formés sont filtrés. L'opération est répétée plusieurs fois pour obtenir des cristaux clairs (1.67 g, 68%).

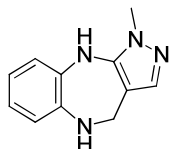
Pf = 262-264 °C

Rf = 0.4 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.96 (sl, 1H), 8.35 (sl, 1 H), 7.45 (s, 1 H), 7.03 (d, 1 H, *J* = 7.5 Hz), 6.95-6.75 (m, 3 H), 3.66 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 163.8, 146.0, 139.9, 133.8, 129.4, 123.9, 123.4, 121.8, 120.3, 100.5, 35.0.

31 1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine



C₁₁H₁₂N₄

MM 200,24

EP-II-78

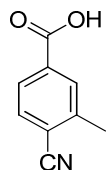
À une solution de 1-méthyl-3a,5,10,10a-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépin-4(1H)-one (275 mg, 1.28 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre sous une atmosphère d'argon et à 0 °C est ajoutée au goutte à goutte pendant 15 min une solution de LiAlH₄ 1M dans le THF (8 mL, 8 mmol, 6 eq). La solution est agitée 30 min à 0 °C puis est ramenée à TA et chauffée à reflux pour la nuit. Une solution de LiAlH₄ 1M dans le THF (3.84 mL, 3.84 mmol, 3 eq) est rajoutée au milieu réactionnel refroidi à 0 °C. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 5 h puis refroidi à 0 °C. De l'eau (0.8 mL) est ajoutée au mélange réactionnel puis une solution de NaOH 10 N (1.52 mL) est ajoutée au goutte à goutte. La solution est diluée avec du THF (5 mL). L'agitation est poursuivie 1 h à TA. La solution est filtrée sur célite et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Après purification sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 92/8, v/v), un solide brun est obtenu (167 mg, 65%).

Pf = 195-196 °C

Rf = 0.5 (CH₂Cl₂/ MeOH, 9/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.10 (s, 1 H), 6.92-6.86 (m, 1 H), 6.85-6.80 (m, 3 H), 4.08 (s, 2 H), 3.72 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 140.4, 138.6, 136.0, 133.5, 123.1, 122.3, 119.3, 101.8, 44.8, 34.7.

32 Acide 4-cyano-3-méthylbenzoïque

C₉H₇NO₂
MM 161,16
EP-II-64

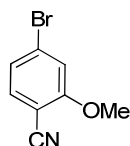
À une solution de 4-bromo-2-méthylbenzonitrile (500 mg, 2.55 mmol, 1 eq) dissous le THF anhydre (25 mL) sous argon et refroidi à -78 °C, est ajouté au goutte à goutte une solution 2.5 M de nBuLi dans l'hexane (1.5 mL, 3.82 mmol, 1.5 eq). Le mélange réactionnel est agité 2 h à -78 °C puis transféré à l'aide d'une canule dans 2 g de carbone dissous dans du THF anhydre (12 mL). Le mélange réactionnel est agité 3 h à TA puis évaporé à sec, repris dans de l'eau et lavé à l'éther. La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH = 1 avec de l'acide chlorhydrique 37% et extraite avec du CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Un solide blanc est obtenu (288 mg, 70%).

Pf = 204 °C

Rf = 0.30 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 7.92 (s, 1 H), 7.86 (dd, 1 H, J = 8.2, 1.8 Hz), 7.6 (d, 1 H, J = 8 Hz), 2.52 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 167.4, 142.3, 134.5, 132.6, 131.4, 127.5, 117.5, 20.4.

33 4-bromo-2-méthoxybenzonitrile

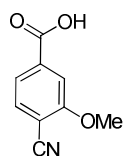
C₈H₆BrNO
MM 212,04
AS-I-95

À une solution de 4-bromo-2-fluorobenzonitrile (1 eq, 15 mmol, 3 g) dans le méthanol (6 mL) et dans le DMF (30 mL) est ajouté du carbonate de potassium (3 eq, 45 mmol, 6.2 g). Le mélange réactionnel est chauffé à 55 °C pendant 1 nuit et est évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans l'éther. La phase étherée est lavée avec de l'eau, de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et est évaporée sous pression réduite pour obtenir une poudre blanche (3.3 g, quant).

Rf = 0.83 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.42 (d, 1 H, J = 8.1 Hz), 7.16 (d, 1 H, J = 8.1 Hz), 7.12 (s, 1 H), 3.91 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 135.0, 129.4, 116.8, 56.9.

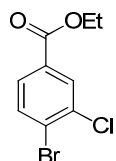
34 Acide 4-cyano-3-méthoxybenzoïque

C₉H₇NO₃
MM 177,16
AS-I-112

À une solution de 4-bromo-2-méthoxybenzonitrile (2 g, 9.13 mmol, 1 eq) dissous le THF anhydre (83 mL) sous argon et refroidi à -78 °C, est ajouté au goutte à goutte une solution 1.5 M de nBuLi dans l'hexane (7.07 mL, 14.14 mmol, 1.5 eq). Le mélange réactionnel est agité 2 h à -78 °C puis transféré à l'aide d'une canule dans 7.3 g de carbone dissous dans du THF anhydre (37 mL). Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA puis évaporé à sec, repris dans de l'eau et extrait à l'éther. La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH = 1 avec de l'acide chlorhydrique 37% et extraite avec du CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite pour obtenir un solide orangé (505 mg, 30%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.63 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.35 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.30 (s, 1 H), 3.99 (s, 3 H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 162.1, 138.6, 134.9, 124.5, 120.0, 112.4, 108.4, 99.4, 55.9.

35 4-bromo-3-chlorobenzoate d'éthyle

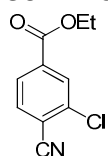
C₉H₈BrClO₂
MM 263,52
AS-I-100

À une solution de d'acide 4-bromo-3-chlorobenzoïque (3g, 12.74 mmol, 1 eq) dans l'éthanol (38 mL) refroidi à 0 °C est ajouté le chlorure de thionyle (1.39 mL, 19.11 mmol, 1.5 eq). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant une nuit puis est évaporé sous pression réduite et repris dans du CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice une huile est obtenue (3.06 g, 92%).

Rf = 0.72 (AcOEt/Heptane, 3/7, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (d, 1 H, J = 2.0 Hz), 7.34 (dd, 1 H, J = 8.5 Hz; 2.0 Hz), 7.25 (d, 1 H, J = 8.5 Hz), 3.98 (q, 2 H, J = 7.5 Hz), 1.0 (t, 3 H, J = 7.5 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 164.7, 134.9, 133.8, 131.2, 131.1, 128.6, 127.8, 61.6, 14.3.

36 3-chloro-4-cyanobenzoate d'éthyle

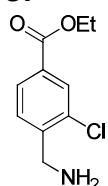
C₁₀H₈ClNO₂
MM 209,63
AS-I-102

À une solution de 4-bromo-3-chlorobenzoate d'éthyle (3g, 11.3 mmol, 1 eq) dans le DMF anhydre est ajouté le cyanure de cuivre (2.01 g, 22.5 mmol, 2 eq). Le mélange réactionnel est agité 8 h à 60 °C et évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans l'eau et filtré. Le solide est récupéré et dissous dans de l'AcOEt. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite pour obtenir un solide brun clair (1.6 g, 68%).

Rf = 0.22 (AcOEt/Heptane, 3/7, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (s, 1 H), 7.72 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.65 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 4.37-4.27 (m, 2 H), 1.37 (t, 3 H, J = 7.5 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 165.3, 136.0, 134.3, 131.7, 129.1, 128.4, 117.5, 115.7, 62.1, 14.7.

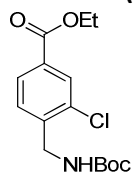
37 4-(aminométhyl)-3-chlorobenzoate d'éthyle

C₁₀H₁₂ClNO₂
MM 213,66
AS-I-103

À une solution de 3-chloro-4-cyanobenzoate d'éthyle (1.6 g, 7.63 mmol, 1 eq) dans le méthanol anhydre (120 mL) à 0 °C et sous argon sont ajoutés le chlorure de cobalt hexahydraté (3.6 g, 15.26 mmol, 2 eq) et le borohydrure de sodium (2.88 g, 76.3 mmol, 10 eq) par portion sur 10 min. Le mélange est agité 30 min à 0 °C puis 1 h à TA. Le mélange est neutralisé jusqu'à pH=7/8 avec une solution de KHSO₄ 1M. Le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le milieu réactionnel est filtré sur célite (rincé avec une solution de KHSO₄ 0.3 M et de l'éther). La phase aqueuse est extraite avec de l'éther. La phase aqueuse est basifiée jusqu'à pH>10 avec une solution de NaOH 10%. La phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂. Les phases organiques sont assemblées, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir une huile jaune (250 mg, 15%).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.83 (s, 1 H), 7.4 (d, 1 H, J = 7.5 Hz), 7.29 (d, 1 H, J = 7.5 Hz), 4.35 (s, 2H), 3.94 (q, 2 H, J = 7.5 Hz), 1.31 (t, 3 H, J = 7.5 Hz).

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 168.4, 142.2, 137.2, 136.4, 129.4, 128.7, 128.6, 60.8, 50.0, 14.3.

38 4-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)-3-chlorobenzoate d'éthyle

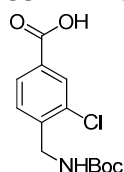
C₁₅H₂₀ClNO₄
MM 313,78
AS-I-108

À une solution de 4-(aminométhyl)-3-chlorobenzoate d'éthyle (100 mg, 0.46 mmol, 1 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre (7 mL) est ajouté le dicarbonate de di-*tert*-butyle (113 mg, 0.51 mmol, 1.1 eq). Le mélange réactionnel est agité 1 h à TA et est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée avec une solution de KHSO₄ 1M, de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite pour obtenir une huile jaune (130 mg, 93%).

Rf = 0.43 (AcOEt/Heptane, 3/7, v/v)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.83 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.38 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.27 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 4.3 (dd, 2 H, J = 8.0, 3.1 Hz), 4.04 (q, 2 H, J = 7.5 Hz), 1.96 (t, 3 H, J = 7.5 Hz), 1.45 (s, 9 H).

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 165.3, 155.9, 146.9, 131.1, 130.5, 129.9, 128.1, 127.2, 85.2, 61.0, 42.4, 29.8, 28.4, 27.5, 14.3.

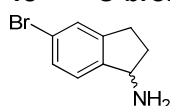
39 Acide 4-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)-3-chlorobenzoïque

C₁₃H₁₆ClNO₄
MM 285,72
AS-I-109

À une solution de 4-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)-3-chlorobenzoate d'éthyle (120 mg, 0.39 mmol, 1 eq) dans le THF (1 mL) est ajoutée une solution de soude (31.6 mg, 0.79 mmol, 2 eq) dans l'eau (2.5 mL). Le mélange réactionnel est agité 1h à TA, chauffé une nuit à 50 °C et le THF est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est acidifiée avec une solution de HCl 2N jusqu'à pH = 1, est saturée avec du NaCl et est extraite avec du CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir une poudre blanche (22.37 mg, 21%).

Rf = 0.07 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (sl, 2 H), 7.41 (sl, 1 H), 4.43 (s, 2 H), 1.43 (s, 9 H).

40 5-bromo-2,3-dihydro-1H-inden-1-amine

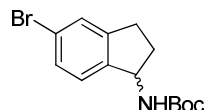
C₉H₁₀BrN
MM 212,09
EP-II-87

Une solution de 5-bromo-2,5 dihydro-1H-indanone (300 mg, 1.41 mmol, 1 eq), de cyanoborohydrure de sodium (444 mg, 7.07 mmol, 5 eq), d'acétate d'ammonium (3.27 g, 42.43 mmol, 30 eq) dans le méthanol anhydre (14 mL) est irradiée au micro-onde à 100 °C pendant 15 min. Le mélange réactionnel est basifié jusqu'à pH>10 avec une solution de NaOH 1N. La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir une huile brune (304 mg, quant).

Rf = 0.15 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.32 (d, 2 H, J = 8.4 Hz), 7.17 (d, 1 H, J = 7.9 Hz), 4.28 (t, 1 H, J = 7.5 Hz), 2.95-2.86 (m, 1 H), 2.82-2.72 (m, 1 H), 2.52-2.43 (m, 1 H), 1.73-1.62 (m, 1 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.7, 145.7, 129.8, 128.0, 125.1, 121.2, 57.1, 37.8, 30.1.

41 (5-bromo-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)carbamate de tert-butyle

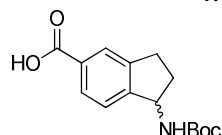
C₁₄H₁₈BrNO₂
MM 312,20
EP-II-107

Une solution de 5-bromo-2,3-dihydro-1H-inden-1-amine (383 mg, 1.8 mmol, 1 eq), de triéthylamine (302 µL, 2.17 mmol, 1.2 eq) et de dicarbonate de di-*tert*-butyle (472 mg, 2.17 mmol, 1.2 eq) dans le THF anhydre (14 mL) est agitée 16 h à TA et concentrée sous pression réduite. Le résidu par chromatographie flash sur colonne de gel de silice pour obtenir une huile incolore (421 mg, 75%).

Rf = 0.83 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.26 (t, 2 H, J = 8.1 Hz), 7.11 (d, 2 H, J = 8.1 Hz), 5.12-4.98 (m, 1 H), 4.72-4.56 (m, 1 H), 2.90-2.82 (m, 1 H), 2.80-2.68 (m, 1 H), 2.55-1.73 (m, 1 H), 1.78-1.65 (m, 1 H), 1.4 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 155.8, 145.7, 142.9, 130.0, 128.1, 125.8, 121.9, 79.8, 55.7, 34.6, 30.1, 28.6.

42 Acide 1-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2,3-dihydro-1H-indene-5-carboxylique

C₁₅H₁₉NO₄
MM 277,32
EP-II-123

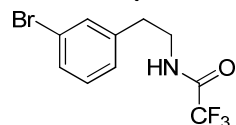
À une solution de (5-bromo-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)carbamate de *tert*-butyle (409 mg, 1.31 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (10 mL) sous une atmosphère d'argon et à -78 °C, est ajoutée au goutte à goutte une solution de *n*-BuLi 2.5 M dans l'hexane (1.17 mL, 1.96 mmol, 1.5 eq). Le mélange réactionnel est agité 2 h à -70 °C puis est transféré à l'aide d'une canule dans un ballon contenant du CO₂ (3 g) dans le THF anhydre (5 mL). Le mélange réactionnel est agité 3 h à TA puis est concentré. Le résidu est repris dans de l'eau. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther puis est acidifiée jusqu'à pH=1 avec une solution de HCl 37%. Un précipité se forme. La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Un solide beige est obtenu (207 mg, 57%).

Rf = 0.12 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

Pf = 181-182 °C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.97-7.91 (m, 2 H), 7.38 (d, 1 H, J = 7.8 Hz), 3.03-2.81 (m, 2 H), 2.67-2.53 (m, 1 H), 1.91-1.73 (m, 1 H), 1.67-1.57 (m, 1 H), 1.48 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.6, 159.8, 143.7, 129.3, 129.2, 126.8, 56.1, 34.6, 30.0, 28.6.

43 N-(3-bromophénéthyl)-2,2,2-trifluoroacétamide

C₁₀H₉BrF₃NO
MM 296,08
EP-II-129

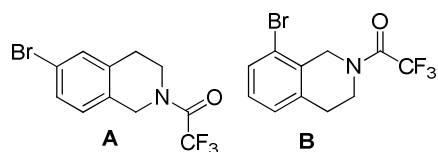
À une solution de 2-(3-bromoiphényl)éthanamine (355 µL, 2.49 mmol, 1 eq) et de 2,6 lutidine (318 µL, 2.75 mmol, 1.1 eq) dissous dans du CH₂Cl₂ (9 mL) et refroidi à 0 °C est ajouté l'anhydride trifluoroacétique (352 µL, 2.49 mmol, 1 eq) au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est laissé revenir à TA et agité pendant une nuit. 20 mL d'H₂O sont rajoutés. La phase organique et la phase aqueuse sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec une solution de HCl 1N, une solution de NaHCO₃ saturée, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir une huile incolore (710 mg, 96%).

Rf = 0.67 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.33 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 7.28 (s, 1H), 7.13 (t, 1 H, J = 7.6 Hz), 7.05 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 6.29 (sl, 1 H), 3.54 (q, 2 H, J = 6.8 Hz), 2.80 (t, 2 H, J = 7.1 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 157.7, 140.0, 132.0, 130.6, 130.4, 127.5, 123.1, 41.0, 34.8.

44 1-(6-bromo-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)-2,2,2-trifluoroéthanone A et 1-(8-bromo-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)-2,2,2-trifluoroéthanone B

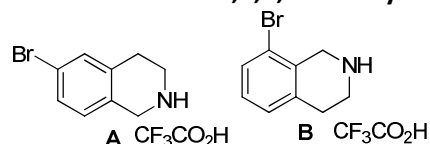


C₁₁H₉BrF₃NO
MM 308,09
EP-II-158

Une solution de N-(3-bromophénéthyl)-2,2,2-trifluoroacétamide (710 mg, 2.39 mmol, 1 eq) et de paraformaldéhyde (115 mg, 0.62 mmol, 1.6 eq) dans l'acide acétique (4 mL) et l'acide sulfurique (2.6 mL) est agitée une nuit à TA puis versée dans 80 mL de glace. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées avec une solution de NaHCO₃ saturée, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice une huile incolore est obtenue (610 mg, 83%). Le mélange des deux régioisomères est directement utilisé pour la suite.

Rf = 0.81 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

45 6-bromo-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline A et 8-bromo-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline B



C₉H₁₀BrN
MM 326.11
EP-II-159

À une solution de 1-(6-bromo-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)-2,2,2-trifluoroéthanone A et 1-(8-bromo-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)-2,2,2-trifluoroéthanone B (1.34 g, 4.36 mmol, 1 eq) et de carbonate de potassium (2.4 g, 17.45 mmol, 4 eq) dans un mélange MeOH/H₂O (36 mL, 3/1, v/v). Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA. Le méthanol est évaporé sous pression réduite et le brut est dilué avec l'AcOEt. La phase organique et la phase aqueuse sont séparées. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite pour obtenir une huile (854 mg, 92%). Les deux régioisomères A (t_R = 2.32 min) et B (t_R = 2.52 min) sont séparés par HPLC semi-préparative.

Le 6-bromoisomère A est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (846 mg, 60%)

t_R = 2.52 min

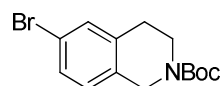
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.45 (d, 2 H, J = 8.4 Hz), 6.91 (s, 1 H, J = 8.4 Hz), 4.11 (s, 2 H, CH₂), 3.29 (t, 2 H, J = 6.4 Hz), 2.95 (t, 2 H, J = 6.4 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 133.9, 132.3, 131.0, 128.9, 127.2, 122.4, 44.6, 41.6, 25.3.

Le 8-bromoisomère B est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (265 mg, 18%)

t_R = 2.32 min

46 6-bromo-3,4-dihydroisoquinoline-2(1H)-carboxylate de tert-butyle



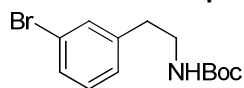
C₁₄H₁₈BrNO₂
MM 312,20
EP-II-150

À une solution 6-bromo-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline (152 mg, 0.46 mmol, 1 eq), de pyridine anhydre (112 µL, 1.40 mmol, 1 eq) et de DMAP (2 mg, 0.01 mmol, 0.03 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre (2.5 mL) est ajouté le dicarboxylate de di-tert-butyle (203 mg, 0.93 mmol, 2 eq) dissous le CH₂Cl₂ anhydre (1 mL). Le mélange réactionnel est agité 10 min à 0 °C puis 4 h à TA. La phase organique est lavée avec de l'eau, avec une solution de NaHCO₃ saturée, avec de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice une poudre blanche est obtenue (114 mg, 78%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.25-7.30 (m, 2 H), 6.95 (d, 1 H, J = 8.2 Hz), 4.48 (s, 2 H), 3.60 (t, 2 H, J = 5.8 Hz), 2.78 (t, 2 H, J = 5.8 Hz), 1.47 (s, 9 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 155.0, 137.2, 131.7, 129.5, 129.2, 120.1, 80.2, 45.4, 41.6, 29.0, 28.7.

48 3-bromophénéthylcarbamate de *tert*-butyle



$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{BrNO}_2$

MM 300,19

EP-V-35

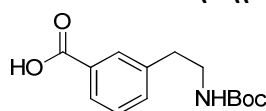
À une solution de 2-3(bromophényl)éthanamine (1.34 mL, 9.4 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (30 mL) et refroidi à 0 °C sont ajoutés la triéthylamine (1.57 mL, 11.28 mmol, 1.2 eq) et le dicarbonate de di-*tert*-butyle (2.46 g, 11.28 mmol, 1.2 eq). Le mélange réactionnel est agité 10 min à 0 °C, 3 h30 à TA puis est évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice, une huile incolore est obtenue (2.75 g, quant).

Rf = 0.78 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.30-7.35 (m, 2 H), 7.07-7.17 (m, 2 H), 4.56 (sl, NH), 3.33 (q, 2 H, J = 6.5 Hz), 2.74 (t, 2 H, J = 7.0 Hz), 1.41 (s, 9 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 156.0, 141.6, 132.0, 130.3, 129.7, 127.6, 122.8, 79.5, 41.8, 36.1, 28.6.

49 Acide 3-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)éthyl)benzoïque



$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_4$

MM 265,30

EP-IV-110

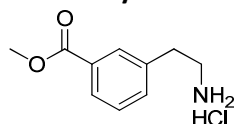
À une solution de 3-bromophénéthylcarbamate de *tert*-butyle (2.74 g, 9.12 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (80 mL) sous une atmosphère d'argon et à -78 °C, est ajoutée au goutte à goutte une solution de *n*-BuLi 2.5 M dans l'hexane (10 mL, 20 mmol, 2.2 eq). Le mélange réactionnel est agité 4 h30 à -78 °C puis un flux de CO_2 anhydre (passé dans du desséchant CaCl_2) est bullé dans le milieu réactionnel pendant 20 min. Le mélange réactionnel est agité 15 min à TA puis concentré sous pression réduite. Le brut est repris dans l'eau. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther puis est acidifiée jusqu'à pH = 1 avec une solution de HCl 37%. Un précipité se forme. La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na_2SO_4 et évaporées sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash en phase inverse un solide blanc est obtenu (1.05 g, 43%).

Rf = 0.41 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9/1, v/v)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.95 (s, 1 H), 7.47-6.96 (m, 3 H), 3.48-3.30 (m, 2 H), 2.94-2.71 (m, 2 H), 1.44 (s, 3 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171.3, 156.2, 139.6, 134.1, 130.8, 130.2, 128.8, 128.4, 79.7, 41.8, 36.2, 28.6.

50 Hydrochlorure de méthyl 3-(2-aminoéthyl)benzoperoxoate



$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{ClNO}_3$

MM 231,68

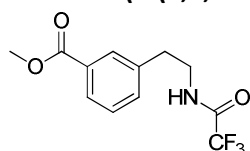
EP-IV-112

À une solution d'acide 3-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)éthyl)benzoïque (261 mg, 0.98 mmol, 1 eq) dans le MeOH anhydre et à 0 °C sous argon est ajouté le chlorure de thionyle (214 μL , 2.95 mmol, 3 eq). Le mélange réactionnel est agité 8 h à TA et évaporé sous pression réduite (azéotrope avec du toluène) pour obtenir une huile (200 mg, quant).

t_R = 2.26 min

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.52-7.26 (m, 3 H), 7.21-6.93 (m, 1 H), 3.88 (s, 3 H), 2.98 (d, 2 H, J = 7.3 Hz), 2.79 (t, 2 H, J = 6.4 Hz).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 168.0, 138.6, 138.3, 135.1, 131.8, 131.0, 130.5, 130.0, 129.7, 129.3, 129.0, 126.1, 53.4, 43.1, 34.8, 21.4.

51 3-(2-(2,2,2-trifluoroacétamido)éthyl)benzoperoxoate de méthyleC₁₂H₁₂F₃NO₄

MM 291,22

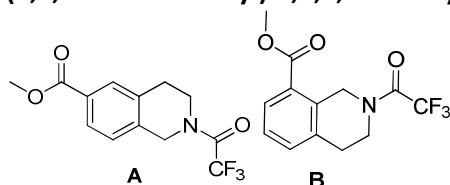
EP-IV-113

À une solution de hydrochlorure de 3-(2-aminoéthyl)benzoperoxoate de méthyle (200 mg, 0.98 mmol, 1 eq) et de 2,4-lutidine (125 µL, 1.08 mmol, 1.1 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre à 0 °C et sous argon est ajouté l'anhydride trifluoroacétique (208 µL, 1.49 mmol, 1.5 eq). Le mélange réactionnel est agité 10 min à 0 °C et une nuit à TA. De l'eau est ajoutée au mélange réactionnel. La phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec une solution de HCl 1N, une solution de NaHCO₃ saturée, de la saumure, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir une huile incolore (78%, 211 mg).

 $t_R = 4.46$ min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37 (dt, 1 H, J = 7.7, 1.0 Hz), 7.33 (t, 1 H, J = 1.8 Hz), 7.18 (t, 1 H, J = 7.7 Hz), 7.09 (dt, 1 H, J = 7.7, 1.0 Hz), 3.57 (q, 2 H, J = 7.1 Hz), 2.84 (t, 2 H, J = 7.1 Hz).

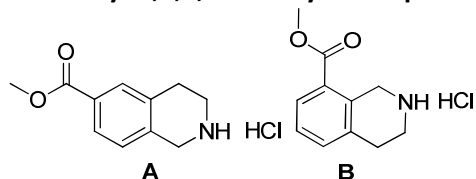
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 157.7, 157.3, 140.1, 131.9, 130.6, 130.4, 127.5, 123.1, 41.1, 34.8.

52 2-(2,2,2-trifluoroacétyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-6-carboxylate de méthyle A et 2-(2,2,2-trifluoroacétyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-8-carboxylate de méthyle BC₁₃H₁₂F₃NO₃

MM 287,23

EP-IV-114

Une solution de 3-(2-(2,2,2-trifluoroacétamido)éthyl)benzoperoxoate de méthyle (211 mg, 0.77 mmol, 1 eq) et de paraformaldéhyde (37 mg, 1.23 mmol, 1.6 eq) dans l'acide sulfurique concentré et l'acide acétique glacial est agité une nuit à TA. Le mélange réactionnel est versé dans l'eau glacée. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées avec une solution de NaHCO₃ saturée, de la saumure, séchées et évaporées sous pression réduite pour obtenir une huile incolore (mélange de A et B, 217 mg, 98%). Le brut est utilisé tel quel pour la suite.

 $t_R = 4.94/5.12$ min**53 Hydrochlorure de méthyl-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-6-carboxylate A et hydrochlorure de méthyl-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-8-carboxylate B**C₁₁H₁₃NO₂.HCl

MM 227,69

EP-IV-116

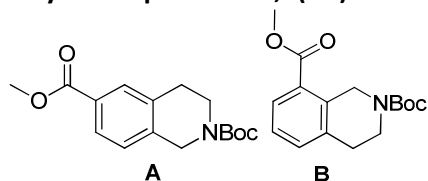
À une solution de 2-(2,2,2-trifluoroacétyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-6-carboxylate de méthyle A et 2-(2,2,2-trifluoroacétyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-8-carboxylate de méthyle B (476 mg, 1.66 mmol, 1 eq) dans le MeOH (15 mL) et l'eau (6 mL) est ajouté le carbonate de potassium (919 mg, 6.65 mmol, 4 eq). Le mélange réactionnel est agité 5 h à TA et le MeOH est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est diluée et extraite avec l'AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir une huile incolore (mélange de A et B, 295.9 mg, 81%).

 $t_R = 2.13/2.30$ min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.7 (d, 1.3 H, J = 7.1 Hz), 7.20-7.07 (m, 1.5 H), 6.97 (d, 0.3 H, J = 8 Hz), 4.26 (s, 1.4 H), 3.95 (s, 0.6 H), 3.81 (s, 1 H), 3.78 (s, 1 H), 3.07-2.99 (m, 2 H), 2.82-2.72 (m, 2 H), 2.32 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 167.5, 167.1, 141.2, 138.1, 136.0, 135.6, 133.7, 130.6, 128.6, 127.9, 127.7, 126.8, 126.3, 125.6, 51.9, 51.8, 48.3, 47.4, 43.6, 42.9, 29.8, 29.0.

54 6-méthyl 3,4-dihydroisoquinoline-2,6(1H)-dicarboxylate de *tert*-butyle A et 8-méthyl 3,4-dihydroisoquinoline-2,8(1H)-dicarboxylate de *tert*-butyle B



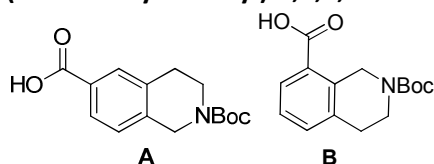
$\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_4$
MM 291,34
EP-IV-117

À une solution d'hydrochlorure de méthyl 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-6-carboxylate A et d'hydrochlorure de méthyl 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-8-carboxylate B (259 mg, 1.36 mmol, 1 eq), de pyridine (329 μL , 4.07 mmol, 3 eq) et de DMAP (5 mg, 0.04 mmol, 0.03 eq) dans le CH_2Cl_2 (12 mL) est ajouté le dicarbonate de di-*tert*-butyle (593 mg, 2.7 mmol, 2 eq) dissous dans le CH_2Cl_2 (3 mL). Le mélange réactionnel est agité 3 heures à TA. La phase organique est lavée à l'eau, avec une solution de NaHCO_3 saturée, à la saumure, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash, les deux régioisomères A et B sont obtenus sous la forme d'une huile incolore (374 mg, 95%).

$t_{\text{R}} = 5.64/5.76$ min

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.84 (d, 1 H, $J = 7.3$ Hz), 7.34-7.13 (m, 2 H), 4.94 (s, 1.5 H), 4.62 (s, 0.5 H), 3.89 (s, 3 H), 3.65 (t, 2 H, $J = 5.9$ Hz), 2.90 (t, 2 H, $J = 5.5$ Hz), 1.49 (s, 9 H).

47 Acide 2-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-6-carboxylique A et acide 2-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-8-carboxylique B



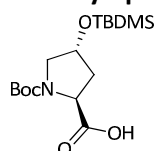
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_4$
MM 277,32
EP-IV-196

Une solution de 6-méthyl 3,4-dihydroisoquinoline-2,6(1H)-dicarboxylate de *tert*-butyle A et 8-méthyl 3,4-dihydroisoquinoline-2,8(1H)-dicarboxylate de *tert*-butyle B (39 mg, 0.133 mmol, 1 eq) dans un mélange THF/MeOH (2 mL, 1/1, v/v) en présence de soude 1N (200 μL) est agité à reflux pendant 3 h. De l'AcOEt et une solution de HCl 1N sont ajoutés au mélange réactionnel. La phase organique est séparée et la phase aqueuse est extraite 2 fois avec l'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na_2SO_4 et évaporées sous pression réduite pour obtenir une huile incolore (37 mg, quant).

$t_{\text{R}} = 4.64/4.70$ min

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.02-7.83 (m, 1.3 H), 7.39-7.26 (m, 1.2 H), 7.23-7.15 (m, 0.5 H), 4.99 (s, 1.4 H), 4.64 (s, 0.6 H), 3.64 (t, 2 H, $J = 6.1$ Hz), 2.89 (t, 2 H, $J = 6.1$ Hz), 1.40 (s, 9 H).

57 Acide carboxylique (2S,4R)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)pyrrolidine-2-



$\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{NO}_5\text{Si}$
MM 345,51
EP-II-105

À une solution de *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-proline (400 mg, 3.02 mmol, 1 eq) et d'imidazole (410 mg, 6.03 mmol, 4.4 eq) dans le DMF (4.5 mL) est ajouté le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyl (454 mg, 3.02 mmol, 2.2 eq). Le mélange réactionnel est agité 16 h à TA puis refroidi à 0 °C et acidifié avec une solution d'acide citrique 10%. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées avec de l'eau, de la saumure, séchées sur Na_2SO_4 et évaporées

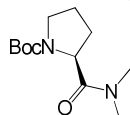
sous pression réduite. Après purification sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 92/8, v/v), une huile incolore est obtenue (400 mg, 84%).

R_f = 0.6 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.48-4.27 (m, 2 H), 3.60-3.27 (m, 2 H), 2.35-2.05 (m, 2 H), 1.46 (s, 6 H), 1.39 (s, 3 H), 0.85 (s, 9 H), 0.04 (s, 6 H).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 178.2, 157.3, 154.1, 82.0, 80.7, 70.1, 69.9, 58.3, 58.1, 55.1, 54.8, 40.0, 37.7, 28.6, 25.9, 18.2, 18.1, -3.4 (deux conformères).

58 2-(diméthylcarbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate de *tert*-butyle



C₁₂H₂₂N₂O₃
MM 242,31
EP-II-46

Protocole D

Purification sur colonne de gel de silice (AcOEt + 1% Et₃N)

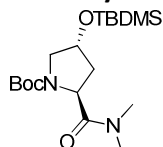
Huile incolore (75%)

R_f = 0.55 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.68-4.47 (m, 1 H), 3.63-3.34 (m, 2 H), 3.14-2.86 (m, 6H), 2.19-1.94 (m, 2 H), 1.89-1.74 (m, 2 H), 1.44-1.35 (m, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.0, 172.5, 154.7, 154.0, 79.6, 79.5, 56.6, 56.5, 47.0, 46.8, 37.1, 36.1, 30.5, 29.7, 28.7, 28.5, 24.3, 23.8 (deux conformères).

59 (2*S*,4*R*) 4-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-2-(diméthylcarbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate de *tert*-butyle



C₁₈H₃₆N₂O₄Si
MM 372,57
EP-II-117, EP-V-108

Protocole D

Purification sur colonne de gel de silice (AcOEt/Hept, 1/1, v/v)

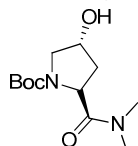
Huile incolore (82%)

R_f = 0.28 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.71 (dt, 1 H, *J* = 43.8, 7.2 Hz), 4.52-4.43 (m, 1 H), 3.71-3.60 (m, 1 H), 3.41-3.27 (m, 1 H), 3.07 (d, 1 H, *J* = 20.0 Hz), 2.95 (s, 3 H), 2.10-1.92 (m, 2 H), 1.40 (d, 9 H, *J* = 20.0 Hz), 0.85 (s, 9 H), 0.04 (s, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.1, 154.3, 79.8, 70.9, 70.2, 55.2, 55.0, 39.8, 39.0, 36.2, 28.7, 28.6, 26.0 (deux conformères).

60 (2*S*,4*R*) 2-(diméthylcarbamoyl)-4-hydroxypyrrrolidine-1-carboxylate de *tert*-butyle



C₁₂H₂₂N₂O₄
MM 258,31
EP-III-92

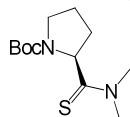
Protocole F

Purification sur colonne de gel de silice (AcOEt puis CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

Huile incolore (82%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.83-4.67 (m, 1 H), 4.56-4.45 (m, 1 H), 3.62-3.60 (m, 1 H), 3.08 (d, 3 H, *J* = 12.9 Hz), 2.94 (d, 3 H, *J* = 3 Hz), 2.24-1.92 (m, 4 H), 1.40 (d, 9 H, *J* = 15.5 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.7, 172.3, 79.8, 70.5, 69.8, 55.1, 54.9, 54.8, 38.8, 38.3, 37.1, 37.0, 36.1, 36.0, 28.5, 28.3 (deux conformères).

61 2-(diméthylcarbamothioyl)pyrrolidine-1-carboxylate de *tert*-butyle

C₁₂H₂₂N₂O₂S
MM 258,38
EP-II-50

Protocole E

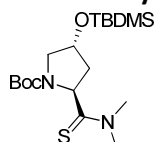
Purification sur colonne de gel de silice (AcOEt/Hept, 3/7, v/v puis 5/5, v/v + 1% Et₃N)

Huile incolore (52%)

R_f = 0.63 (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.89-4.72 (m, 1 H), 3.72-3.46 (m, 2 H), 3.46-3.26 (m, 6 H), 2.24-2.08 (m, 2 H), 1.86-1.70 (m, 2 H), 1.43-1.27 (m, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 206.4, 205.1, 154.7, 153.7, 79.8, 79.7, 62.8, 62.6, 47.2, 47.0, 45.4, 45.2, 41.4, 41.3, 32.7 31.7, 28.8, 28.6, 24.0, 23.5 (deux conformères).

62 (2S,4R) 4-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)-2-(diméthylcarbamothioyl)pyrrolidine-1-carboxylate de *tert*-butyle

C₁₈H₃₆N₂O₃SSi
MM 388,64
EP-II-113

Protocole E

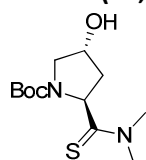
Purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (AcOEt/Hept, 3/7, v/v)

Huile incolore (79%)

R_f = 0.60 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.08-4.92 (m, 1 H), 4.62-4.55 (m, 1 H), 3.82-3.72 (m, 1 H), 3.48 (s, 3 H), 3.37 (d, 3 H, J = 19 Hz), 2.14-1.98 (m, 2 H), 1.40 (9 H, d, J = 25 Hz), 0.85 (s, 9 H), 0.04 (s, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 205.4, 164.4, 79.9, 71.0, 70.4, 55.8, 55.7, 55.4, 45.2, 42.4, 41.6, 41.4, 28.8, 28.6, 26.0, -4.5 (deux conformères).

63 (2S,4R) 2-(diméthylcarbamothioyl)-4-hydroxypyrrrolidine-1-carboxylate de *tert*-butyle

C₁₂H₂₂N₂O₃S
MM 274,38
EP-II-119

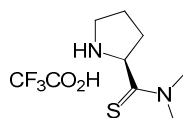
Protocole F

Purification sur colonne de gel de silice (AcOEt)

Huile incolore (57%)

R_f = 0.24 (AcOEt)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.12-4.98 (m, 1 H), 4.65-4.54 (m, 1 H), 3.91-3.76 (m, 2 H), 3.67-3.52 (m, 1 H), 3.48 (s, 3 H), 3.38 (d, 3 H, J = 17.3 Hz), 2.28-2.11 (m, 2 H), 1.40 (d, 9 H, J = 25 Hz).

64 trifluoroacétate de (S)-N,N-diméthylpyrrolidine-2-carbothioamide

C₇H₁₄N₂S.C₂HF₃O₂
MM 272.29
EP-II-53

Protocole G

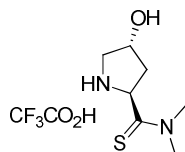
Huile (quant)

R_f = 0.15 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.09 (s, 1 H), 3.62-3.43 (m, 2 H), 3.50 (s, 3 H), 3.39 (m, 3 H), 2.63-2.49 (m, 1 H), 2.21-2.04 (m, 2 H), 1.85-1.73 (m, 1 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 197.1, 61.7, 46.9, 46.0, 41.8, 31.9, 25.5.

65 trifluoroacétate de (2S,4R)-4-hydroxy-N,N-diméthylpyrrolidine-2-carbothioamide



C₇H₁₄N₂OS.C₂HF₃O₂

MM 288,29

EP-II-124

Protocole G

Solide beige (quant)

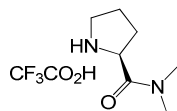
Pf = 200-201 °C

t_R = 1.70 min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.97 (dd, 1 H, J = 10.6, 7.3 Hz), 4.62 (s, 1 H), 3.50 (s, 3 H), 3.48 (d, 1 H, J = 4.0 Hz), 3.39 (s, 3 H), 3.38 (s, 1 H), 2.57 (dd, 1 H, J = 13.6, 7.0 Hz), 1.83 (ddd, 1 H, J = 13.6, 10.6, 4.0 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 196.7, 71.3, 62.2, 54.6, 45.9, 41.9, 40.9.

66 trifluoroacétate de N,N-diméthylpyrrolidine-2-carboxamide



C₇H₁₄N₂O.C₂HF₃O₂

MM 256,22

EP-II-56

Protocole G

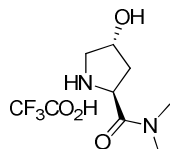
Huile (quant)

Rf = 0.15 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.82 (s, 1H), 3.36-3.52 (m, 2 H), 3.02 (s, 3 H), 2.98 (s, 3 H), 2.41-2.55 (m, 1 H), 2.06-2.16 (m, 1 H), 1.94-2.04 (m, 1 H), 1.82-1.93 (m, 1 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 162.3, 58.1, 46.7, 36.9, 37.4, 29.6, 25.0.

67 trifluoroacétate de (2S,4R)-4-hydroxy-N,N-diméthylpyrrolidine-2-carboxamide



C₇H₁₄N₂O₂.C₂HF₃O₂

MM 272,22

EP-III-96

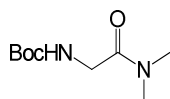
Protocole G

Huile (quant)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.84 (s, 1 H), 4.62 (s, 1 H), 3.45 (dd, 1 H, J = 11.9, 4.3 Hz), 3.36 (d, 1 H, J = 11.9 Hz), 3.08 (s, 3 H), 2.99 (s, 3 H), 2.55 (dd, 1 H, J = 13.6, 7.6 Hz), 1.99 (ddd, 1 H, J = 13.6, 10.4, 4.2 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 169.5, 71.5, 58.9, 55.0, 39.0, 37.2, 36.4.

68 (2-(diméthylamino)-2-oxoéthyl)carbamate de)-tert-butyle



C₉H₁₈N₂O₃

MM 202,25

EP-II-70

Protocole D

Purification sur colonne de gel de silice (AcOEt/Hept, 1/1, v/v + 1% Et₃N)

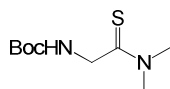
Huile incolore (46%)

Rf = 0.12 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.91 (s, 2 H), 2.94 (d, 6 H, J = 7.9 Hz), 1.41 (s, 9 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 168.5, 156.0, 79.7, 42.5, 36.0, 35.8, 28.6.

69 (2-(diméthylamino)-2-thioéthyl)carbamate de *tert*-butyle



$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

MM 218,32

EP-II-73

Protocole E

Purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (AcOEt/Hept, 5/95, v/v jusqu'à 60/40, v/v).

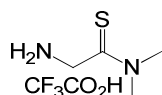
Huile incolore (63%)

Rf = 0.34 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.03 (s, 2 H), 3.48 (s, 3 H), 3.27 (s, 3 H), 1.43 (s, 9 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 198.2, 155.7, 79.9, 48.2, 45.0, 40.6, 28.6.

70 trifluoroacétate de 2-amino-N,N-diméthyléthanothioamide



$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2\text{S}\cdot\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$

MM 232,22

EP-II-131

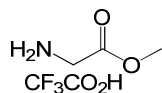
Protocole G

Solide blanc (quant)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 3.99 (s, 2 H), 3.49 (s, 3 H), 3.33 (s, 3 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 194.1, 45.7, 45.1, 41.0.

71 trifluoroacétate 2-amino-N,N-diméthylacétamide



$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$

MM 216,16

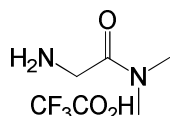
Protocole G

Solide Blanc (quant)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 4.85 (s, 3 H), 3.83 (s, 2 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 169.1, 53.6, 41.0.

72 trifluoroacétate de 2-amino-N,N-diméthylacétamide



$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}\cdot\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$

MM 216,16

EP-III-93

Protocole G

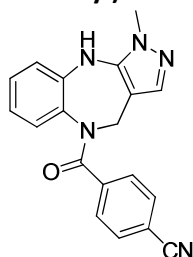
Solide blanc (quant)

Pf = 117-118 °C

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 3.85 (s, 2 H), 2.99 (d, 6 H, $J = 2.2$ Hz).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 166.8, 40.9, 36.4, 36.0.

74 4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzonitrile



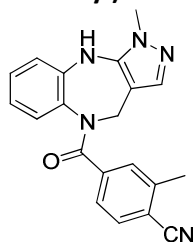
C₁₉H₁₅N₅O
MM 329,36
AS-I-116

À une solution de chlorure de 4-cyanobenzoyl (100 mg, 0.60 mmol, 2 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre (0.5 mL) est ajoutée au goutte à goutte et à 0 °C une solution de 1-méthyl-3a,5,10,10a-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépin-4(1H)-one (60 mg, 0.30 mmol, 1 eq) et de triéthylamine (84 µL, 0.60 mmol, 2 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre (1.2 mL). Le mélange est agité 30 min à 0 °C puis une nuit à TA. Le brut est repris dans le CH₂Cl₂, extrait avec une solution de KHSO₄ saturée. La phase aqueuse est extraite avec un mélange CHCl₃/*i*PrOH 80/20. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de NaHCO₃ saturée, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5, *v/v*) pour obtenir une poudre jaune (81 mg, 82%).

R_f = 0.35 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, *v/v*)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.40 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 7.32 (d, 2 H, *J* = 8.0 Hz), 7.25 (d, 1 H, *J* = 8.0 Hz), 7.11 (t, 1 H, *J* = 8.0 Hz), 6.94 (d, 1 H, *J* = 8.0 Hz), 6.67 (q, 2 H, *J* = 8.1 Hz), 6.08 (s, 1 H), 5.88 (A de AX, d, 1 H, *J* = 14.4 Hz), 4.01 (X de AX, d, 1H, *J* = 14.4 Hz), 3.81 (s, 3H).

75 2-méthyl-4-(1-méthyl-1,3a,4,5,10,10a-héxahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzonitrile



C₂₀H₁₇N₅O
MM 343,38
EP-II-82

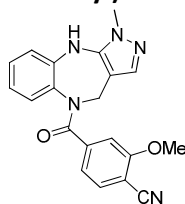
À une solution d'acide 4-cyano-3-méthylbenzoïque (296 mg, 1.84 mmol, 2 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre (2.5 mL) et dans le DMF (quelque gouttes) est ajouté le chlorure d'oxalyle (316 µL, 3.67 mmol, 4 eq) au goutte à goutte. Le mélange est agité 15 min à 0 °C, 2 h à TA, concentré sous pression réduite et séché sous la pompe pendant 1 h. Le résidu est repris dans le CH₂Cl₂ anhydre (1.8 mL) et est ajouté au goutte à goutte et à 0 °C à une solution de 1-méthyl-3a,5,10,10a-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépin-4(1H)-one (184 mg, 0.92 mmol, 1 eq) et de triéthylamine (256 µL, 1.84 mmol, 2 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre (3.6 mL). Le mélange est agité 30 min à 0 °C puis une nuit à TA. Le brut est repris dans le CH₂Cl₂ et la phase organique est lavée avec une solution de KHSO₄ saturée. La phase aqueuse est extraite avec un mélange CHCl₃/*i*PrOH (8/2, *v/v*). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de NaHCO₃ saturée, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Après purification sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5, *v/v*), un solide beige est obtenu (223 mg, 70%).

R_f = 0.3 (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5, *v/v*)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.31-7.25 (m, 3 H), 7.11 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz), 7.01 (dd, 2 H, *J* = 12.3, 7.6 Hz), 6.68 (dt, 2 H, *J* = 13.8, 6.8 Hz), 5.86 (A de AX, d, 1 H, *J* = 14.4 Hz), 3.99 (X de AX, d, 1 H, *J* = 14.4 Hz), 3.85 (s, 3 H), 2.39 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.0, 142.4, 140.4, 139.8, 138.3, 136.1, 132.0, 130.9, 129.9, 129.3, 125.5, 123.0, 119.5, 114.0, 101.6, 43.5, 35.2, 20.5.

76 2-méthoxy-4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzonitrile



C₂₀H₁₇N₅O₂
MM 359,38
AS-I-117

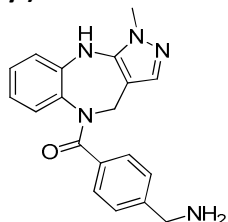
À une solution de l'acide 4-cyano-3-méthoxybenzoïque (150 mg, 0.84 mmol, 2 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre (1 mL) et dans le DMF (quelque gouttes) est ajouté le chlorure d'oxalyle (144 µL, 1.68 mmol, 2 eq) au goutte à goutte. Le mélange est agité 15 min à 0 °C, 2 h à TA et concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans le CH₂Cl₂ anhydre (1.8 mL) et est ajouté au goutte à goutte et à 0 °C à une solution de 1-méthyl-3a,5,10,10a-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-4(1H)-one (84 mg, 0.42 mmol, 1 eq) et de triéthylamine (117 µL, 0.84 mmol, 2 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre (1.6 mL). Le mélange est agité 30 min à 0 °C puis une nuit à TA. Le brut est repris dans le CH₂Cl₂ et la phase organique est lavée avec une solution de KHSO₄ saturée. La phase aqueuse est extraite avec un mélange CHCl₃/*i*PrOH 80/20. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de NaHCO₃ saturée, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir une poudre jaune (31.9 mg, 21%).

Rf = 0.54 (CH₂Cl₂/MeOH, 90/10, v/v)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.12 (m, 2 H, J = 8.0 Hz), 6.95 (s, 1 H), 6.92 (s, 2 H), 6.77 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 6.68 (s, 2 H), 3.75 (s, 3 H), 2.90 (d, 2 H), 1.23 (s, 3 H).

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 160.7, 133.0, 132.6, 130.8, 130.7, 129.1, 128.0, 127.0, 125.9, 123.8, 122.8, 120.1, 119.1, 115.8, 111.1, 110.9, 56.1, 43.9, 29.7.

77 (4-(aminométhyl)phényl)(1-méthylbenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5(1H,4H,10H-yl)méthanone



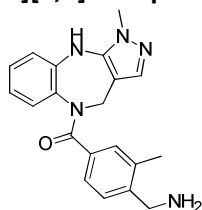
C₁₉H₁₉N₅O
MM 333,39
AS-I-118

À une solution de 4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzonitrile (81 mg, 0.25 mmol, 1 eq) dans le méthanol anhydre (4 mL) à 0 °C sont ajoutés le chlorure de cobalt hexahydraté (118 mg, 0.5 mmol, 2 eq) et le borohydrure de sodium (94.5 mg, 2.5 mmol, 10 eq) par portions sur 5 min. Le mélange de couleur noir est agité 10 min à 0 °C puis 1 h à TA. Le mélange est neutralisé jusqu'à pH=7/8 avec une solution de KHSO₄ 1M. Le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans une solution de KHSO₄ 1M (15 mL). Un précipité se forme. Le précipité est filtré et rincé avec de l'éther. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther puis basifiée jusqu'à pH>10 avec une solution de soude 10 N. La solution passe du rose au bleu. La phase aqueuse est extraite avec du CHCl₃. Les phases chloroformées sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄ puis évaporées sous pression réduite pour obtenir une poudre beige (44.9 mg, 54%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.39 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.30 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.19 (d, 2 H, J = 8.0 Hz), 7.03 (d, 2 H, J = 8.0 Hz), 6.92 (s, 1 H), 6.65 (d, 2 H, J = 7.5 Hz), 5.90 (d, 1 H, J = 7.0 Hz), 4.10 (d, 1 H, J = 7.0 Hz), 3.75 (s, 3 H), 1.64 (s, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 160.1, 144.8, 138.2, 136.4, 134.2, 131.5, 131.0, 130.8, 129.1, 128.4, 128.1, 126.3, 122.5, 122.4, 119.2, 119.1, 46.0, 43.4, 34.8.

78 (4-(aminométhyl)-3-méthylphényl)(1-méthyl-3a,4,10,10a-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépin-5(1H)-yl)méthanone



C₂₀H₂₁N₅O
MM 347,41
EP-II-83

À une solution de 2-méthyl-4-(1-méthyl-1,3a,4,5,10,10a-héxahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzonnitrile (223 mg, 0.64 mmol, 1 eq) dans le méthanol anhydre à 0 °C sont ajoutés le chlorure de cobalt hexahydraté (303 mg, 1.28 mmol, 2 eq) et le borohydrure de sodium (2.41 g, 6.38 mmol, 10 eq) par portions sur 5 min. Le mélange de couleur noir est agité 10 min à 0 °C puis 1 h à TA. Le mélange est neutralisé jusqu'à pH=7/8 avec une solution de KHSO₄ 1M. Le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans une solution de KHSO₄ 1M (15 mL). Un précipité se forme. Le précipité est filtré et rincé avec de l'éther. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther puis basifiée jusqu'à pH>10 avec une solution de soude 10 N. La solution passe du rose au bleu. La phase aqueuse est extraite avec du CHCl₃. Les phases chloroformées sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄ puis évaporées sous pression réduite pour obtenir une poudre verte (180 mg, 81%).

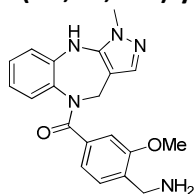
Pf = 247-249 °C

t_R = 2.41 min

¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 7.28 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.17 (s, 1 H), 7.15-7.06 (m, 2 H), 7.01 (s, 1 H), 6.86 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 6.75-6.60 (m, 2 H), 5.68 (A de AX, d, 1 H, J = 14.7 Hz), 3.88 (X de AX, d, 1 H, J = 14.7 Hz), 3.78 (s, 3 H), 3.57 (s, 2 H), 2.10 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, (CD₃)₂SO) δ 168.2, 143.4, 139.8, 138.9, 135.6, 134.6, 130.2, 129.0 (CH aro), 128.1, 125.5, 124.8, 121.2, 119.2, 100.3, 43.1, 42.0, 35.3, 18.3.

79 (4-(aminométhyl)-3-méthoxyphényl)(1-méthylbenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépin-5(1H,4H,10H)-yl)méthanone



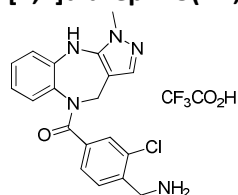
C₂₀H₂₁N₅O₂
MM 363,41
AS-I-119

À une solution de 2-méthoxy-4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzonnitrile (31.9 mg, 0.08 mmol, 1 eq) dans le méthanol anhydre (1.3 mL) à 0 °C sont ajoutés le chlorure de cobalt hexahydraté (38 mg, 0.16 mmol, 2 eq) et le borohydrure de sodium (30 mg, 0.8 mmol, 10 eq) par portions sur 5 min. Le mélange de couleur noir est agité 10 min à 0 °C puis 1 h à TA. Le mélange est neutralisé jusqu'à pH=7/8 avec une solution de KHSO₄ 1M. Le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans une solution de KHSO₄ 1M (15 mL). Un précipité se forme. Le précipité est filtré et rincé avec de l'éther. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther puis basifiée jusqu'à pH>10 avec une solution de soude 10 N. La solution passe du rose au bleu. La phase aqueuse est extraite avec du CHCl₃. Les phases chloroformées sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄ puis évaporées sous pression réduite pour obtenir une poudre jaune (12.5 mg, 43%).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.21 (s, 1 H), 7.04 (d, 1 H, J = 7.5 Hz), 6.96 (d, 1 H, J = 7.5 Hz), 6.88 (d, 1 H, J = 7.5 Hz), 6.83 (s, 1 H), 6.68 (s, 3 H), 5.89 (d, 1 H, J = 14.0 Hz), 3.96 (d, 1 H, J = 14.0 Hz), 3.82 (s, 2 H), 3.75 (s, 3 H), 3.63 (s, 3 H).

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 163.5, 153.2, 136.4, 136.3, 135.6, 134.0, 130.8, 130.4, 128.5, 128.1, 127.6, 122.5, 120.8, 119.1, 118.9, 110.6, 53.4, 43.4, 34.8, 29.7.

81 trifluoroacétate de (4-(aminométhyl)-3-chlorophényl)(1-méthylbenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépin-5(1H,4H,10H)-yl)méthanone



C₁₉H₁₈ClN₅O.C₂HF₃O₂

MM 481,86

EP-VI-87

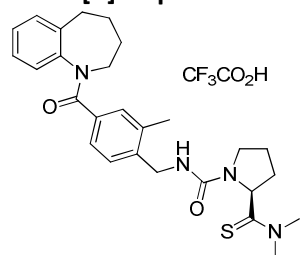
À une solution d'acide 4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl)-3-chlorobenzoinique (21.6 mg, 0.075 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (1 mL) est ajouté la 2,4,6-collidine (50 µL, 0.029 mmol, 4 eq) et le triphosgène (6.7 mg, 0.022 mmol, 0.3 eq) dissous dans le THF anhydre (0.5 mL). Le mélange réactionnel est agité 5 min à TA puis la 1-méthyl-3a,5,10,10a-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépin-4(1H)-one (15 mg, 0.075 mmol, 1 eq) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité 1 h à TA puis est évaporé sous pression réduite et repris dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v). Le mélange réactionnel est agité 30 min à TA puis évaporé sous pression réduite. Après purification par HPLC semi préparative, une huile est obtenue (7.6 mg, 21%).

$t_R = 2.53$ min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.53 (s, 1 H), 7.47 (s, 1 H), 7.39-7.36 (m, 1 H), 7.29 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz), 7.25 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz), 7.18 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz), 6.85 (d, 1 H, *J* = 7.8 Hz), 6.74 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz), 5.80 (A de AX, d, 1 H, *J* = 14.8 Hz), 4.16 (s, 2 H), 4.04 (X de AX, 1 H, *J* = 14.8 Hz), 3.87 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 156.0, 136.4, 131.6, 130.6, 130.2, 128.1, 123.9, 121.4, 44.9, 41.4, 35.3.

85 trifluoroacétate de (S)-2-(diméthylcarbamothioyl)-N-(2-méthyl-4-(2,3,4,5-tétrahydro-1H-benzo[b]azépine-1-carbonyl)benzyl)pyrrolidine-1-carboxamide



C₂₇H₃₄N₄O₂S.C₂HF₃O₂

MM 592.67

EP-III-94

Solide blanc (20.9 mg, 62%)

Pf = 70.7 °C

$t_R = 4.67$ min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.26 (d, 1 H, *J* = 7.5 Hz), 7.17 (d, 1 H, *J* = 8.0 Hz), 7.09 (t, 1 H, *J* = 7.5 Hz), 6.99 (d, 1 H, *J* = 4.4 Hz), 6.94-6.86 (m, 2 H), 6.66 (d, 1 H, *J* = 7.8 Hz), 5.07-5.00 (m, 1 H), 4.91 (s, 1 H), 4.29-4.18 (m, 2 H), 3.69-3.63 (m, 1 H), 3.44 (s, 1 H), 3.42 (s, 3 H), 3.37 (s, 3 H), 3.06 (t, 1 H, *J* = 13.1 Hz), 2.95-2.88 (m, 1 H), 2.81-2.72 (m, 1 H), 2.83-2.21 (m, 2 H), 2.15 (s, 3 H), 2.13-2.07 (m, 1 H), 2.05 - 1.90 (m, 3 H), 1.87-1.78 (m, 1 H), 1.56-1.44 (m, 1 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 206.1, 171.8, 158.8, 145.2, 141.3, 141.0, 136.0, 135.8, 131.2, 130.5, 129.4, 128.8, 127.5, 127.3, 126.6, 64.5, 49.2, 47.6, 45.5, 42.7, 41.8, 36.0, 32.5, 30.8, 27.7, 24.8, 19.1.

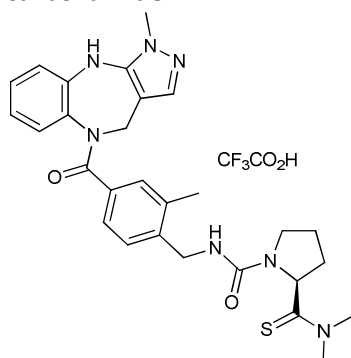
HRMS (EI) calc pour C₂₇H₃₄N₄O₂S : 479.2475, trouvé: 479.2467

Protocole général d'assemblage des chaînes par formation d'un lien urée:

Une solution d'un des composés amines **77**, **78**, **79** ou **81** (1 eq), de carbonyldiimidazole (1.2 eq) et de DIEA (1.5 eq) dans le DMF est agitée 3 h à TA. A ce mélange est ajoutée une solution d'un des composés aminés **64-67** ou **70-72** (1.3 eq) et de DIEA (2.5 eq) dans le DMF. Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA puis est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par HPLC semi-préparative pour obtenir le produit attendu.

86 ou SL-II-135

trifluoroacétate de (S)-2-(diméthylcarbamothioyl)-N-(2-méthyl-4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzyl)pyrrolidine-1-carboxamide



$C_{28}H_{33}N_7O_2S \cdot C_2HF_3O_2$

MM 645.70

EP-II-84

Solide blanc (46.7 mg, 41%)

Pf = 204 °C

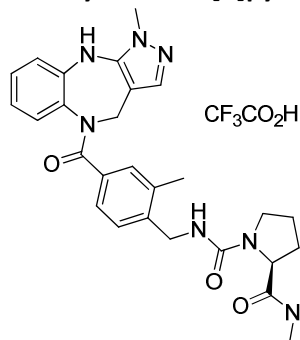
t_R = 3.32 min

1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.65 (s, 1 H), 7.30 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7.23-7.14 (m, 2 H), 7.06-6.93 (m, 2H), 6.82-6.72 (m, 2 H), 5.84 (A de AX, d, 1 H, J = 14.8 Hz), 5.05 (s, 1 H), 4.32-4.15 (m, 2H), 3.98 (X de AX, d, 1 H, J = 14.8 Hz), 3.91 (s, 3 H), 3.71 -3.63 (m, 1 H), 3.36 (s, 3 H), 3.25 (s, 3 H), 2.27-2.16 (m, 1 H), 2.09 (s, 3 H), 1.97-1.86 (m, 1 H), 1.84-1.72 (m, 1 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 206.1, 171.8, 158.7, 144.6, 141.7, 138.7, 136.4, 135.0, 124.8, 131.5, 130.4, 130.1, 127.4, 127.2, 126.5, 124.4, 121.5, 104.4, 64.4, 47.6, 45.4, 44.3, 42.6, 41.7, 35.1, 32.4, 24.7, 19.0.

HRMS (EI) calc pour $C_{28}H_{33}N_7O_2S$: 532.2489, trouvé: 532.2473

87 trifluoroacétate de (S)-N2,N2-diméthyl-N1-(2-méthyl-4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzyl)pyrrolidine-1,2-dicarboxamide



$C_{28}H_{33}N_7O_3 \cdot C_2HF_3O_2$

MM 629.23

EP-III-97

Solide blanc (24.1 mg, 66%)

Pf = 108.7 °C

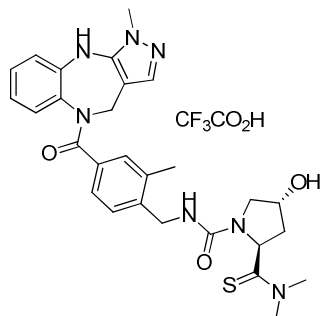
t_R = 2.99 min

1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.68 (s, 1 H), 7.29 (d, 1 H, J = 7.9 Hz), 7.17 (t, 1 H, J = 7.9 Hz), 7.11 (d, 1 H, J = 7.9 Hz), 7.06-6.96 (m, 2 H), 6.84-6.72 (m, 2 H), 5.84 (A de AX, d, 1 H, J = 14.8 Hz), 4.78 (dd, 1 H, J = 8.7, 3.8 Hz), 4.32-4.19 (m, 2 H), 3.98 (X de AX, d, 1 H, J = 14.8 Hz), 3.58-3.49 (m, 1 H), 3.44-3.37 (m, 1 H), 3.10 (s, 3 H), 2.91 (d, 3 H, J = 2.2 Hz), 2.30-2.15 (m, 1 H), 2.15 (s, 3 H), 2.09-1.93 (m, 2 H), 1.79-1.89 (m, 1 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 175.1, 171.8, 158.9, 144.9, 141.8, 138.8, 136.6, 135.2, 134.8, 134.7, 131.6, 130.6, 130.2, 127.3, 126.6, 124.5, 121.7, 104.8, 58.5, 47.5, 44.3, 42.7, 37.5, 36.4, 35.1, 30.5, 25.5, 19.0.

HRMS (EI) calc pour $C_{28}H_{33}N_7O_3$: 516.2717, trouvé: 516.2704

88 trifluoroacétate de (2S,4R)-2-(diméthylcarbamothioyl)-4-hydroxy-N-(2-méthyl-4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzyl)pyrrolidine-1-carboxamide



C₂₈H₃₃N₇O₃S·C₂HF₃O₂
MM 661.70
EP-III-81

Solide blanc (16.7 mg, 56%)

Pf = 184.2 °C

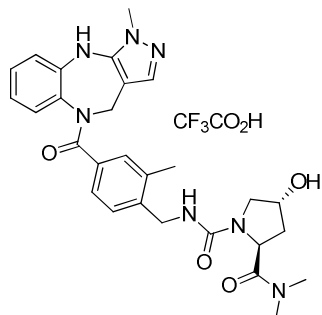
t_R = 2.85 min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.55 (s, 1 H), 7.27 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7.20-7.12 (m, 2 H), 7.03 (d, 1H, J = 11.1 Hz), 7.00-6.92 (m, 1 H), 6.81-6.69 (m, 2 H), 5.83 (A de AX, d, 1 H, J = 14.8 Hz), 5.19 (s, 1 H), 4.57 (s, 1 H), 4.30-4.16 (m, 2 H), 3.97 (X de AX, d, 1 H, J = 14.8 Hz), 3.88 (s, 3 H), 3.83-3.77 (m, 1 H), 3.41 (d, 3 H, J = 3Hz), 3.39 (s, 3 H), 2.30-2.22 (m, 1 H), 2.15 (s, 3 H), 2.10-2.00 (m, 1 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 206.3, 171.8, 159.0, 144.1, 141.7, 139.1, 136.5, 135.5, 135.2, 134.8, 131.6, 130.5, 130.1, 127.5, 127.4, 126.6, 126.5, 124.2, 121.4, 104.0, 71.3, 62.9, 56.1, 45.5, 44.5, 42.7, 41.9, 41.4, 35.2, 19.1.

HRMS (EI) calc pour C₂₈H₃₃N₇O₃S : 548.2438, trouvé: 548.2426

89 2,2,2-trifluoroacétate de (2S,4R)-4-hydroxy-N2,N2-diméthyl-N1-(2-méthyl-4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzyl)pyrrolidine-1,2-dicarboxamide



C₂₈H₃₃N₇O₄·C₂HF₃O₂
MM 645.63
EP-III-98

Solide blanc (21.1 mg, 58%)

Pf = 175.4 °C

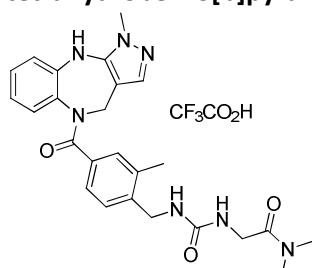
t_R = 2.68 min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.71 (s, 1 H), 7.28 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7.16 (t, 1 H, J = 7.7 Hz), 7.11 (q, 1 H, J = 3.9 Hz), 7.03 (d, 1 H, J = 8.8 Hz), 6.99 (t, 1 H, J = 7.7 Hz), 6.80-6.61 (m, 2 H), 5.83 (A de AX, d, 1 H, J = 14.6 Hz), 4.48 (s, 1 H), 4.28 (A de AB, t, 1 H, J = 14.6 Hz), 4.17 (B de AB, 1 H, J = 14.6 Hz), 3.98 (X de AX, d, 1 H, J = 14.6 Hz), 3.90 (s, 3 H, CH₃), 3.68-3.61 (m, 1 H), 3.37 (d, 1 H, J = 9.9 Hz), 3.12 (s, 3 H, CH₃), 2.92 (s, 3 H), 2.27-2.19 (m, 1 H), 2.16 (s, 3 H), 1.98-1.90 (m, 1 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 175.1, 171.8, 159.1, 144.4, 141.6, 139.0, 136.7, 135.3, 134.8, 131.6, 130.6, 130.1, 127.4, 127.3, 126.6, 124.3, 121.5, 104.2, 71.3, 57.1, 55.7, 44.5, 42.7, 38.8, 37.6, 36.6, 35.2.

HRMS (EI) calc pour C₂₈H₃₃N₇O₄ : 532.2666, trouvé: 532.2662

90 trifluoroacétate de **N,N**-diméthyl-2-(3-(2-méthyl-4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzyl)ureido)acétamide



$C_{25}H_{29}N_7O_3 \cdot C_2HF_3O_2$

MM 589.57

EP-III-99

Solide blanc (20.1 mg, 65%)

Pf = 112.7 °C

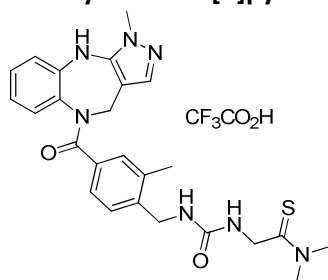
t_R = 2.88 min

1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.72 (s, 1 H), 7.30 (d, 1 H, J = 8.1 Hz), 7.18 (t, 1 H, J = 7.6 Hz), 7.07 (d, 1 H, J = 7.9 Hz), 7.05 (s, 1 H), 6.99 (d, 1 H, J = 7.6 Hz), 6.82-6.74 (m, 2 H), 5.05 (d, 1 H, J = 14.7 Hz), 4.21 (s, 2 H), 4.00 (s, 1 H), 3.97 (s, 2 H), 3.93 (s, 3 H), 3.00 (s, 3 H), 2.93 (s, 3 H), 2.16 (s, 3 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 171.7, 171.6, 160.9, 141.4, 138.6, 137.0, 135.5, 134.8, 134.5, 131.6, 130.7, 130.2, 127.8, 126.7, 124.6, 121.7, 104.9, 44.3, 42.8, 42.5, 36.5, 36.1, 35.1, 19.0.

HRMS (EI) calc pour $C_{25}H_{29}N_7O_3$: 476.2404, trouvé : 476.2406

91 trifluoroacétate de **N,N**-diméthyl-2-(3-(2-méthyl-4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzyl)ureido)éthanethioamide



$C_{25}H_{29}N_7O_2S \cdot C_2HF_3O_2$

MM 605.63

EP-III-78

Solide blanc (20.6 mg, 67%)

Pf = 139 °C

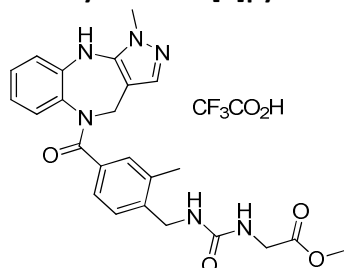
t_R = 3.12 min

1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.45 (s, 1 H), 7.27 (d, 1 H, J = 8 Hz), 7.15 (t, 1 H, J = 8 Hz), 7.11 (d, 1 H, J = 7.8 Hz), 7.05 (s, 1 H), 6.98 (d, 1 H, J = 8 Hz), 6.80-6.69 (m, 2 H), 5.82 (A de AX, d, 1 H, J = 14.8 Hz), 4.22 (s, 2 H), 4.09 (s, 2 H), 3.98 (X de AX, d, 1 H, J = 14.8 Hz), 3.89 (s, 3 H), 3.47 (s, 3 H), 3.13 (t, 1 H, J = 5.7 Hz), 2.16 (s, 3 H), 1.83-1.65 (m, 2 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 200.8, 171.8, 160.7, 143.9, 141.3, 139.2, 137.0, 125.7, 134.6, 131.6, 130.7, 130.1, 127.8, 126.6, 124.4, 121.4, 103.9, 45.8, 45.2, 44.5, 42.5, 40.8, 35.3, 23.9, 23.2, 19.0.

HRMS (EI) calc pour $C_{25}H_{29}N_7O_2S$: 492.2176, trouvé : 492.2163

92 trifluoroacétate de méthyl 2-(3-(2-méthyl-4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzyl)ureido)acétate



$C_{24}H_{26}N_6O_4 \cdot C_2HF_3O_2$

MM 576.52

EP-III-82

Solide blanc (20.5 mg, 66%)

Pf = 126.8 °C

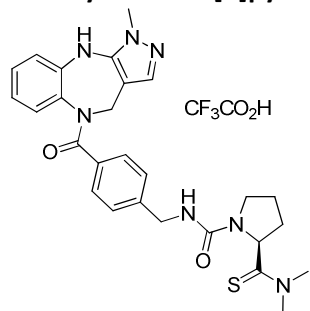
t_R = 2.99 min

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7.68 (s, 1 H), 7.33-6.96 (m, 6 H), 6.84-6.73 (m, 1 H), 5.85 (A de AX, d, 1 H, J = 14.9 Hz), 4.21 (s, 2 H), 3.99 (X de AX, d, 1 H, J = 14.9 Hz), 3.92 (s, 3 H), 3.86 (s, 2 H), 3.72-3.67 (m, 3 H), 2.16 (s, 3 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ 173.3, 171.7, 160.9, 141.3, 138.8, 137.0, 135.6, 134.9, 131.6, 130.7, 130.2, 127.8, 126.7, 124.5, 121.6, 104.5, 52.6, 44.4, 42.8, 42.5, 35.1, 18.9.

HRMS (EI) calc pour $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_4$: 463.2088, trouvé 463.2078

93 trifluoroacétate de (S)-2-(diméthylcarbamothioyl)-N-(4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzyl)pyrrolidine-1-carboxamide



$\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_2\text{S} \cdot \text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$

MM 631.67

AS-I-121

Solide blanc (6.9 mg, 11%)

Pf = 177-178 °C

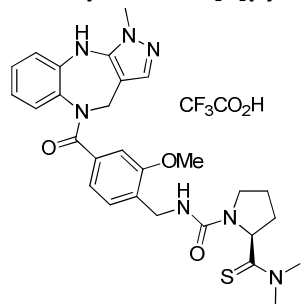
t_R = 3.25 min

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.19 (d, 2 H, J = 7.5 Hz), 7.06 (s, 3 H), 6.91 (d, 1 H, J = 7.5 Hz), 6.68 (s, 2 H), 6.16 (s, 1 H), 5.91 (d, 1 H, J = 15.0 Hz), 5.10 (s, 1 H), 4.31 (s, 2 H), 3.96 (d, 1 H, J = 15 Hz), 3.78 (s, 3 H), 3.61 (s, 2 H), 3.45 (s, 2 H), 3.36 (s, 3 H), 2.41-2.28 (m, 2 H), 2.26-2.12 (m, 2 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 204.4, 171.6, 156.6, 141.0, 140.2, 137.4, 136.8, 133.7, 130.9, 130.2, 128.7, 128.6, 128.4, 126.7, 126.0, 125.7, 63.1, 54.1, 46.1, 45.3, 44.2, 43.1, 41.4, 34.7, 29.6.

HRMS (EI) calc pour $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}$: 517.2250, trouvé 517.2323.

94 trifluoroacétate de (S)-2-(diméthylcarbamothioyl)-N-(2-méthoxy-4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzyl)pyrrolidine-1-carboxamide



$\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_3\text{S} \cdot \text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$

MM 661.70

AS-I-122

Solide blanc (4 mg, 22%)

Pf = 172-173 °C

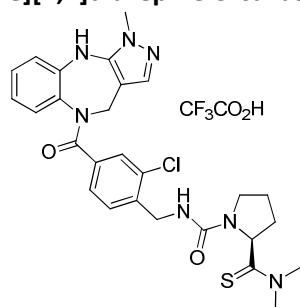
t_R = 3.41 min

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7.31 (sl, 1 H), 7.24 (d, 1 H, J = 8.2 Hz), 7.19 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.14 (t, 1 H, J = 7.6 Hz), 6.84 (t, 1 H, J = 8.0 Hz), 6.74 (d, 1 H, J = 7.6 Hz), 6.70 (d, 1 H, J = 6.9 Hz), 5.81 (d, 1 H, J = 15.4 Hz), 5.03 (sl, 1 H), 4.29-4.16 (m, 2H), 3.96 (d, 1 H, J = 14.7 Hz), 3.81 (s, 3 H), 3.70-3.59 (m, 4 H), 3.41 (s, 3 H), 3.36 (s, 3 H), 2.36-2.17 (m, 2 H), 2.03-1.75 (m, 2 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ 205.8, 171.6, 159.0, 157.5, 140.1, 137.0, 136.4, 134.5, 131.8, 131.5, 130.0, 128.2, 128.1, 123.6, 121.3, 121.0, 110.6, 64.4, 55.9, 47.6, 45.5, 44.9, 41.8, 39.9, 35.4, 32.5, 24.8.

HRMS (EI) calc pour $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}$: 548.2438, trouvé 548.2436.

95 trifluoroacétate de (S)-N-(2-chloro-4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzyl)-2-(diméthylcarbamothioyl)pyrrolidine-1-carboxamide



C₂₇H₃₀ClN₇O₂S.C₂HF₃O₂

MM 666,11

EP-VI-88

Poudre blanche (2.8 mg, 27%)

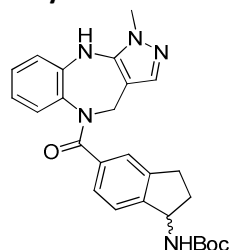
t_R = 3.51 min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.62 (s, 1 H), 7.37 (dd, 1 H, *J* = 7.9, 2.2 Hz), 7.30 (d, 1 H, *J* = 7.9 Hz), 7.25-7.16 (m, 2 H), 7.09 (dd, 1 H, *J* = 13.3, 8.1 Hz), 5.82 (d, 1 H, *J* = 14.9 Hz), 5.04 (sl, 1 H), 4.44-4.16 (m, 3 H), 4.01 (d, 1 H, *J* = 14.9 Hz), 3.90 (s, 3 H), 3.74-3.65 (m, 1 H), 3.51-3.44 (m, 1 H), 3.42 (d, 3 H, *J* = 3.7 Hz), 3.37 (s, 3 H), 2.37-2.16 (m, 2 H), 2.05-1.77 (m, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 170.1, 158.7, 144.1, 141.1, 139.2, 137.0, 135.4, 134.3, 133.1, 131.6, 130.5, 129.5, 129.2, 129.1, 127.5, 127.4, 124.4, 121.6, 104.0, 64.5, 47.7, 45.5, 44.6, 42.7, 42.6, 41.8, 35.2.

HRMS (EI) calc pour C₂₉H₃₃N₇O₂S : 552.1942, trouvé 552.1948.

96a (5-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)carbamate de *tert*-butyle



C₂₆H₂₉N₅O₃

MM 459,54

EP-III-129

À une solution d'acide 1-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2,3-dihydro-1H-indène-5-carboxylique (25 mg, 0.09 mmol, 1.1 eq) dans le THF anhydre sont ajoutés la 2,4,6-collidine (43 µL, 0.33 mmol, 4 eq) et le triphosgène (9.7 mg, 0.033 mmol, 0.4 eq). Après 5 min d'agitation à TA, la 1-méthyl-3a,5,10,10a-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépin-4(1H)-one (16.4 mg, 0.082 mmol, 1 eq) est ajouté à la solution. Le mélange réactionnel est agité 1 h à TA puis repris dans de l'AcOEt. La phase organique est lavée avec de la saumure, une solution saturée de NaHCO₃, une solution d'acide citrique 10%, de la saumure et séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par HPLC semi-préparative et lyophilisé. Un solide blanc est obtenu (24.6 mg, 65%).

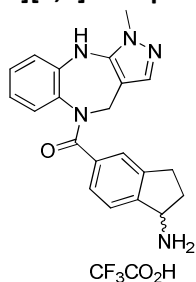
Pf = 124-125 °C

t_R = 4.17 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.32 (s, 1 H), 7.21-6.56 (m, 7 H), 5.85 (d, 1 H, *J* = 14.7 Hz), 5.07-4.76 (m, 2 H), 3.92 (s, 3 H), 3.88 (s, 1 H), 2.78-2.85 (m, 3 H), 1.71-1.55 (m, 1 H), 1.41 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.9, 155.9, 146.1, 143.1, 143.0, 137.0, 135.0, 133.2, 130.4, 128.9, 126.8, 126.6, 124.8, 124.5, 123.4, 123.2, 120.6, 103.3, 79.8, 55.8, 53.6, 43.1, 34.7, 34.3, 29.9, 20.6.

96b Trifluoroacétate de (1-amino-2,3-dihydro-1H-inden-5-yl)(1-méthylbenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépin-5(1H,4H,10H)-yl)méthanone)



C₂₁H₂₁N₅O. C₂HF₃O₂

MM 473,45

EP-III-134

Une solution du composé (5-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)carbamate de *tert*-butyle (47.2 mg, 0.103 mmol, 1 eq) dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v, 10 mL) est agitée 30 min à TA puis évaporée sous pression réduite et lyophilisée. Une poudre blanche est obtenue (34.5 mg, quant).

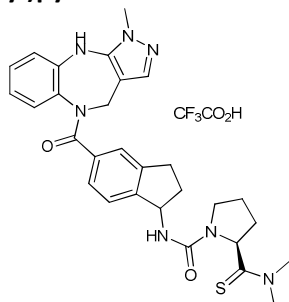
Pf = 122-123 °C

t_R = 2.52 min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.60 (s, 1 H), 7.31 (t, 2 H, *J* = 8.8 Hz), 7.24 (A de AX, d, 1 H, *J* = 4.9 Hz), 7.19-7.11 (m, 2 H), 6.84-6.78 (m, 1 H), 6.76-6.68 (m, 1 H), 5.83 (d, 1 H, *J* = 14.8 Hz), 4.68 (t, 1 H, *J* = 6.5 Hz), 4.01 (X de AX, d, 1 H, *J* = 14.8 Hz), 3.91 (s, 3 H), 3.11-2.75 (m, 2H), 2.61-2.46 (m, 1 H), 2.01-1.95 (m, 1 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 171.4, 145.6, 144.1, 141.7, 139.2, 138.7, 135.3, 134.3, 131.6, 130.3, 127.9, 125.8, 125.7, 125.3, 124.2, 121.6, 104.1, 56.4, 44.5, 35.2, 31.6, 30.9.

97 trifluoroacétate de (2S)-2-(diméthylcarbamothioyl)-N-(5-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)pyrrolidine-1-carboxamide



C₂₉H₃₃N₇O₂S. C₂HF₃O₂

MM 657.71

EP-III-142

Solide blanc (50 mg, 74%)

Pf = décomposition

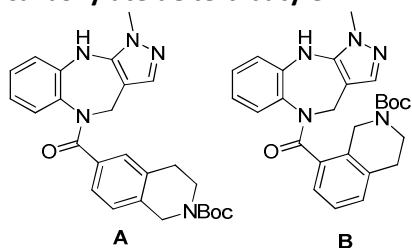
t_R = 3.42 min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.74-7.63 (m, 1 H), 7.29 (d, 1 H, *J* = 7.7 Hz), 7.23-6.93 (m, 4 H), 6.84-6.72 (m, 2 H), 5.84 (d, 1 H, *J* = 14.8 Hz), 5.19 (q, 1 H, *J* = 9.1 Hz), 5.12-5.01 (m, 1 H), 3.99 (d, 1 H, *J* = 14.8 Hz), 3.92 (s, 3 H), 3.68-3.54 (m, 1 H), 3.45 (s, 2 H), 3.46-3.36 (m, 6 H), 2.85-2.55 (m, 2 H), 2.48-2.13 (m, 3 H), 2.00-1.74 (m, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 206.0, 172.2, 172.0, 158.8, 148.7, 148.5, 144.2, 144.0, 138.0, 136.2, 136.1, 134.9, 134.8, 131.6, 130.1, 127.2, 125.2, 125.0, 124.5, 121.7, 104.2, 64.6, 64.5, 56.9, 56.8, 47.5, 45.5, 44.4, 41.8, 35.2, 35.1, 34.6, 32.2, 30.7, 24.9.

HRMS (EI) calc pour C₂₉H₃₃N₇O₂S : 544.2489, trouvé 544.2494.

98a 6-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)-3,4-dihydroisoquinoline-2(1H)-carboxylate de *tert*-butyle A et 8-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)-3,4-dihydroisoquinoline-2(1H)-carboxylate de *tert*-butyle B



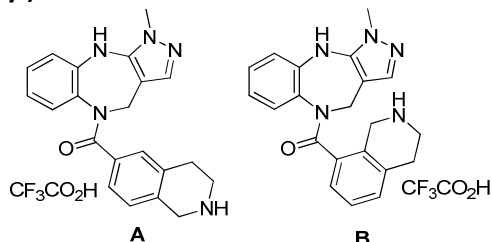
C₂₆H₂₉N₅O₃
MM 459,54
EP-IV-197

À une solution d'acide 2-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-6-carboxylique A et acide 2-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-8-carboxylique B (37.5 mg, 0.135 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (4 mL) sont ajoutés la 2,4,6-collidine (71 µL, 0.54 mmol, 4 eq) et le triphosgène (14 mg, 0.13 mmol, 0.35 eq). Le mélange réactionnel est agité 5 min à TA et la 1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine (27 mg, 0.135 mmol, 1 eq) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité 1 h à TA puis dilué avec l'AcOEt. La phase organique est lavée à la saumure, avec une solution de NaHCO₃ saturée, une solution d'acide citrique 10%, de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite pour obtenir les deux régioisomères A et B sous forme d'une huile incolore (61.2 mg, quant).

R_f = 0.7 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.40 (m, 1 H), 7.32-6.51 (m, 8 H), 5.70-5.61 (m, 2 H), 4.65-4.46 (m, 1.6 H), 4.38 (sl, 0.4 H), 3.95 (d, 0.7 H, *J* = 14.7 Hz), 3.89 (d, 0.3 H, *J* = 14.7 Hz), 3.77 (s, 2.6 H), 3.72 (s, 0.4 H), 3.66-3.39 (m, 4 H), 2.76-2.65 (m, 2 H), 2.54 (s, 1 H), 1.49-1.37 (m, 9 H).

98b Trifluoroacétate de (1-méthylbenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépin-5(1H,4H,10H)-yl)(1,2,3,4-tétrahydroisoquinolin-6-yl)méthanone A et trifluoroacétate de (1-méthylbenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépin-5(1H,4H,10H)-yl)(1,2,3,4-tétrahydroisoquinolin-8-yl)méthanone B



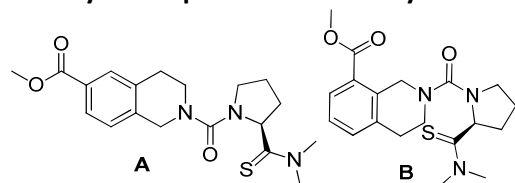
C₂₁H₂₁N₅O
MM 473,45
EP-V-14

Une solution de 6-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)-3,4-dihydroisoquinoline-2(1H)-carboxylate de *tert*-butyle A et 8-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)-3,4-dihydroisoquinoline-2(1H)-carboxylate de *tert*-butyle B (61 mg, 0.133 mmol, 1 eq) dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (5 mL) est agitée 30 min à TA, évaporée sous pression réduite (azéotrope avec toluène) et lyophilisée pour obtenir les deux régioisomères A et B comme une huile incolore (86 mg, quant).

*t*_R = 2.51 min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.41 (s, 1 H), 7.29-7.21 (m, 1 H), 7.18-6.95 (m, 3 H), 6.91-6.76 (m, 2 H), 6.75-6.66 (m, 1 H), 5.85-5.73 (m, 1 H), 4.57 (d, 0.8 H, *J* = 16.4 Hz), 4.41 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 4.26 (s, 0.5 H), 4.05 (d, 1.2 H, *J* = 15.2 Hz), 3.86 (s, 3 H), 3.61-3.35 (m, 3 H), 3.26-3.28 (m, 3 H).

100 (S) 2-(2-(diméthylcarbamothioyl)pyrrolidine-1-carbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-6-carboxylate de méthyle A et (S) 2-(2-(diméthylcarbamothioyl)pyrrolidine-1-carbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-8-carboxylate de méthyle



C₁₉H₂₅N₃O₃S
MM 375,49
EP-V-144

À une solution d'hydrochlorure de méthyl-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-6-carboxylate A, d'hydrochlorure de méthyl-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-8-carboxylate B (120 mg, 0.53 mmol, 1 eq) et de DIEA (130 µL, 0.79 mmol, 1.5 eq) dans le THF anhydre (4 mL) est ajouté le triphosgène (47 mg, 0.16 mmol, 0.3 eq). Le mélange réactionnel est agité 5 min à TA puis une solution de trifluoroacétate de (S)-N,N-diméthylpyrrolidine-2-carbothioamide (108 mg, 0.55 mmol, 1.05 eq) et de DIEA dans le THF anhydre (2 mL) est ajoutée au mélange réactionnel. La solution est irradiée 20 min à 100 °C au micro-onde et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash en phase inverse, une huile incolore est obtenue (mélange de A et B, 49%, 96 mg).

$t_R = 4.31/4.42$ min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (d, 1 H, J = 7.4 Hz), 7.16 (d, 1 H, J = 7.2 Hz), 7.12-7.04 (m, 1 H), 5.20-5.13 (m, 1 H), 4.76 (sl, 1 H), 4.40 (s, 0.6 H), 3.83-3.76 (m, 3 H), 3.73-3.58 (m, 2 H), 3.54-3.40 (m, 1 H), 3.39-3.30 (m, 6.3 H), 2.95-2.74 (m, 2 H), 2.21-2.11 (m, 2 H), 2.02-1.65 (m, 3 H)

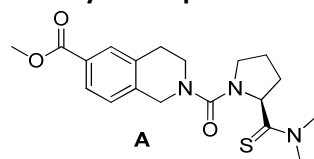
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 206.3, 206.2, 167.6, 167.2, 161.8, 161.7, 139.6, 136.4, 136.3, 135.3, 133.4, 130.2, 129.0, 128.3, 128.1, 127.3, 126.7, 126.0, 62.9, 62.7, 52.1, 50.6, 50.6, 50.5, 48.1, 47.5, 45.4, 45.3, 44.1, 43.2, 41.6, 41.5.

Hydrolyse et séparation des dérivés 101a et 101b

À une solution de (S)-2-(2-(diméthylcarbamothioyl)pyrrolidine-1-carbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-6-carboxylate de méthyle A et (S)-2-(2-(diméthylcarbamothioyl)pyrrolidine-1-carbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-8-carboxylate de méthyle (10 mg, 0.026 mmol, 1 eq) dissous dans un mélange THF/H₂O (2/1, v/v, 1.5 mL) est ajouté le LiOH (3 mg, 0.106 mmol, 4 eq). Le mélange réactionnel est agité 1 nuit à TA et neutralisé avec quelques gouttes de HCl 1N. Le THF est évaporé sous pression réduite. Les deux régioisomères sont séparés par HPLC semi-préparative.

101a Acide

(S)-2-(2-(diméthylcarbamothioyl)pyrrolidine-1-carbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-6-carboxylique A



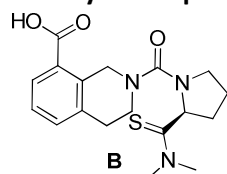
C₁₈H₂₃N₃O₃S
MM 361,46
EP-V-146

(1.3 mg, 14%)

$t_R = 3.51$ min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.92 (d, 2 H, J = 8.1 Hz), 7.35 (d, 1 H, J = 8.1 Hz), 4.66 (dd, 1H, J = 8.6, 7.2 Hz), 4.45 (s, 2 H), 3.55 (t, 2 H, J = 6.4 Hz), 3.35-3.31 (m, 5 H), 3.20 (t, 2 H, J = 6.4 Hz), 3.09 (s, 3 H), 3.02 (s, 3 H), 2.60-2.49 (m, 1 H), 2.15-1.90 (m, 1 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 202.7, 169.2, 134.4, 133.3, 131.6, 129.3, 128.3, 60.0, 47.6, 45.9, 42.8, 37.2, 36.3, 30.0, 26.2, 25.3.

101b Acide**(S)-2-(2-(diméthylcarbamothioyl)pyrrolidine-1-carbonyl)-1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-8-carboxylique B**C₁₈H₂₃N₃O₃S

MM 361,46

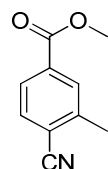
EP-V-146

(5.4 mg, 56%)

 $t_R = 3.75$ min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.02 (d, 1 H, *J* = 7.4 Hz), 7.43 (1 H, *J* = 7.4 Hz), 7.05 (t, 1 H, *J* = 7.4 Hz), 4.76 (s, 2 H), 4.68 (t, 1 H, *J* = 7.8 Hz), 3.51 (t, 2 H, *J* = 6.3 Hz), 3.34-3.31 (m, 2 H), 3.21 (t, 2 H, *J* = 6.3 Hz), 3.09 (s, 3 H), 3.02 (s, 3 H), 2.61-2.48 (m, 1 H), 2.16-1.89 (m, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 169.5, 134.9, 134.3, 131.4, 131.3, 130.1, 128.9, 60.0, 47.6, 45.8, 41.8, 37.2, 36.1, 30.0, 26.8, 25.3.

102 4-cyano-3-méthylbenzoate de méthyleC₁₀H₉NO₂

MM 175,18

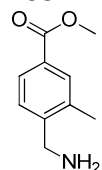
EP-II-141

À une solution d'acide 4-cyano-3-méthylbenzoïque (100 mg, 0.62 mmol, 1 eq) dans le CH₂Cl₂ (2 mL) est ajouté du chlorure de thionyle (350 µL, 4.34 mmol, 7 eq) au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à reflux pendant 2 h puis est évaporé sous pression réduite (azéotrope avec du toluène). Le résidu est repris dans un mélange méthanol/CH₂Cl₂ (1/1, v/v). Le mélange réactionnel est agité 2 h à TA et est concentré. Le brut est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaHCO₃, de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite pour obtenir une huile incolore (122 mg, quant).

Rf = 0.66 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD/CDCl₃) δ 7.98 (s, 1 H), 7.91 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz), 7.69 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz), 3.92 (s, 3 H), 2.58 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD/CDCl₃) δ 166.6, 143.0, 133.3, 131.7, 127.8, 53.1, 20.7.

103 4-(aminométhyl)-3-méthylbenzoate de méthyleC₁₀H₁₃NO₂

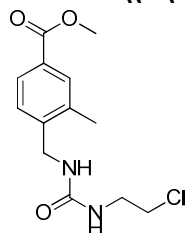
MM 179,22

EP-III-76

À une solution de 4-cyano-3-méthylbenzoate de méthyle (580 mg, 3.31 mmol, 1 eq) dans le méthanol anhydre (41 mL) à 0 °C et sous argon sont ajoutés le chlorure de cobalt hexahydraté (1.57 g, 6.62 mmol, 2 eq) et le borohydrure de sodium (1.25 g, 33.1 mmol, 10 eq) par portion sur 10 min. Le mélange est agité 30 min à 0 °C puis 1 h à TA. Le mélange est neutralisé jusqu'à pH=7/8 avec une solution de KHSO₄ 1M. Le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le milieu réactionnel est filtré sur célite (rincé avec une solution de KHSO₄ 0.3 M et du CH₂Cl₂). La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂. Les phases organiques sont assemblées, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir une huile (452 mg, 76%).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD/CDCl₃): δ 7.84 (d, 1 H, *J* = 8 Hz), 7.81 (s, 1 H), 7.39 (d, 1 H, *J* = 8 Hz), 3.88 (s, 3 H), 2.33 (s, 3 H), 1.53 (s, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD/CDCl₃): δ 167.4, 146.4, 135.9, 131.4, 128.7, 127.7, 126.9, 52.2, 44.4, 19.0.

104 4-((3-(2-chloroéthyl)ureido)méthyl)-3-méthylbenzoate de méthyle

C₁₃H₁₇ClN₂O₃
MM 284,74
EP-IV-37

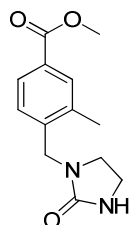
À une solution de 4-(aminométhyl)-3-méthylbenzoate de méthyle (119 mg, 0.66 mmol, 1 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre (5 mL) et sous argon est ajouté au goutte à goutte du 2-chloroéthyl isocyanate (60 µL, 0.70 mmol, 1.06 eq). Le mélange réactionnel est agité 30 min à TA puis évaporé sous pression réduite. Le brut est précipité dans l'heptane et filtré. Un solide blanc est obtenu (159 mg, 83%).

Pf = 118-119 °C

t_R = 3.75 min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD/CDCl₃) δ 7.82-7.78 (m, 2 H), 7.35 (d, 1 H, J = 8.6 Hz), 4.36 (s, 2 H), 3.88 (s, 3 H), 3.59 (t, 2 H, J = 6.1 Hz), 3.46 (t, 2 H, J = 6.1 Hz), 2.64 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD/CDCl₃) δ 168.8, 160.8, 144.7, 137.8, 132.2, 128.4, 128.3, 52.7, 54.0, 43.3, 42.7, 19.0.

105 3-méthyl-4-((2-oxoimidazolidin-1-yl)méthyl)benzoate de méthyle

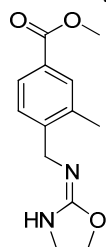
C₁₃H₁₆N₂O₃
MM 248,28
EP-IV-35

À une solution de 4-((3-(2-chloroéthyl)ureido)méthyl)-3-méthylbenzoate de méthyle (300 mg, 1.05 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (1 mL) et à 0 °C est ajouté le NaH 60% (84 mg, 2.1 mmol, 2 eq). Le mélange réactionnel est agité 5 min à 0 °C, 5 h à TA et est quenché avec quelques gouttes de HCl 37% et évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash en phase inverse, un solide blanc est obtenu (173 mg, 66%).

t_R = 3.38 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.84-7.79 (m, 2 H), 7.27-7.24 (m, 1H), 4.41 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.49 (dd, 2 H, J = 9.1, 7.5 Hz), 3.34 (dd, 2 H, J = 9.2, 6.7 Hz), 2.38 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.2, 163.5, 139.6, 137.1, 131.9, 129.8, 128.5, 127.6, 52.3, 45.8, 45.0, 38.8, 19.2.

106 (E) 3-méthyl-4-((oxazolidin-2-ylideneamino)méthyl)benzoate de méthyle

C₁₃H₁₆N₂O₃
MM248,28
EP-VI-21

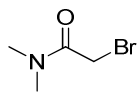
À une solution 4-((3-(2-chloroéthyl)ureido)méthyl)-3-méthylbenzoate de méthyle (789 mg, 2.7 mmol, 1 eq) dans l'acétonitrile (455 mL) est ajouté le DBU (834 µL, 5.58 mmol, 2 eq). Le mélange réactionnel est agité une nuit à 65 °C puis concentré à 1 mL. Après purification par chromatographie flash en phase inverse, un solide est obtenu (239 mg, 34%).

t_R = 2.77 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (t, 2 H, J = 6.1 Hz), 7.30 (dd, 1 H, J = 8.1, 4.7 Hz), 4.33 (d, 2 H, J = 7.5 Hz), 4.22 (q, 2 H, J = 8.3 Hz), 3.84 (d, 2H, J = 4.4 Hz), 3.69 (q, 2 H, J = 9.0 Hz), 2.29 (d, 3 H, J = 5.9 Hz).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 167.2, 161.4, 142.0, 141.9, 131.4, 129.2, 129.1, 127.5, 127.4, 68.3, 52.42, 52.2, 45.0, 19.0.

108 2-bromo-N,N-diméthylacétamide



$\text{C}_4\text{H}_8\text{BrNO}$
MM 166,02
EP-IV-55

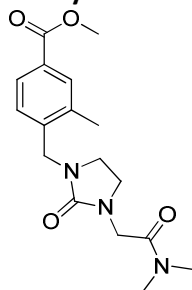
À une solution de bromure de bromoacétyle (500 μL , 5.74 mmol, 1 eq) dans le CH_2Cl_2 anhydre sous argon à -10°C est ajoutée au goutte à goutte une solution de 40% de diméthylamine dans l'eau (1.44 mL, 11.48 mmol, 2 eq). Le mélange réactionnel est agité 30 min à -10°C , 3 h à TA puis lavé avec une solution de HCl 1N, une solution saturée de NaHCO_3 et de la saumure. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite pour obtenir une huile orangée (683 mg, 73%).

Rf = 0.27 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.83 (s, 2 H), 3.07 (s, 3 H), 2.95 (s, 3 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 166.9, 38.3, 36.2, 26.3.

109 4-((3-(2-(diméthylamino)-2-oxoéthyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl)méthyl)-3-méthylbenzoate de méthyle



$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$
MM 333,38
EP-VI-56

À une solution de NaH 60% (33 mg, 0.83 mmol, 1.2 eq) dans le THF anhydre (6 mL) est ajouté le 3-méthyl-4-((2-oxoimidazolidin-1-yl)méthyl)benzoate de méthyle (173 mg, 0.69 mmol, 1 eq) dissous dans le THF anhydre (3 mL). Le mélange réactionnel est agité 45 min à TA puis le 2-bromo-N,N-diméthylacétamide (138 mg, 0.83 mmol, 1.2 eq) dissous dans le THF anhydre (2 mL) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité une nuit à 70°C . De l'eau est rajoutée à la solution. La phase aqueuse est extraite à l'éther. Les phases organiques sont séchées sur Na_2SO_4 et sont évaporées sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur phase inverse, une huile est obtenue (68 mg, 30%). La RMN révèle 40% de produit de départ et 60% de produit attendu.

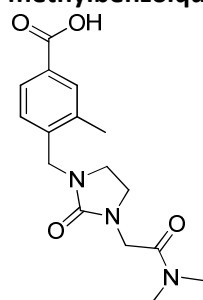
t_R = 3.42 min

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.86 (t, 2 H, J = 7.9 Hz), 7.29-7.24 (m, 1 H), 4.45 (d, 2 H, J = 4.7 Hz), 4.15 (s, 1.2 H), 3.92 (s, 3 H), 3.56 (t, 2 H, J = 7.9 Hz), 3.43-3.29 (m, 2 H), 3.04 (d, 3.5 H, J = 25 Hz), 2.37 (d, 3H, J = 6.4 Hz). (Présence de produit de départ)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.2, 167.4, 167.3, 164.0, 161.9, 161.9, 159.7, 159.3, 139.5, 129.1, 137.1, 132.0, 131.8, 129.9, 129.6, 128.5, 128.3, 127.7, 127.6, 52.4, 52.3, 46.4, 45.9, 45.6, 44.9, 43.9, 42.9, 38.7, 36.8, 36.4, 19.1, 19.0.

MS (ES⁺) m/z 334.2 ([M+H]⁺)

110 Acide méthylbenzoïque



4-((3-(2-(diméthylamino)-2-oxoéthyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl)méthyl)-3-

$C_{16}H_{21}N_3O_4$
MM 319,36
EP-VI-57

À une solution du composé 4-((3-(2-(diméthylamino)-2-oxoéthyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl)méthyl)-3-méthylbenzoate de méthyle (75 mg, 0.22 mmol, 1 eq) dans un mélange THF/H₂O (6 mL, 1/1, v/v) est ajouté l'hydroxyde de lithium (54 mg, 2.27 mmol, 10 eq). Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA. Le brut est acidifié avec une solution de HCl 1N puis concentré jusqu'à 1 mL. Après purification par HPLC semi-préparative, un solide blanc est obtenu (10 mg, 10%).

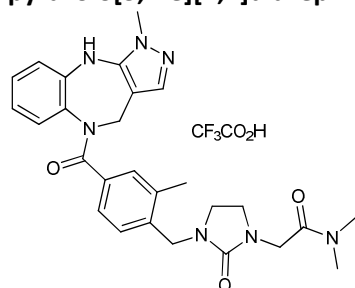
$t_R = 2.72$ min

1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.85-7.79 (m, 2 H), 7.29 (d, 1 H, $J = 8$ Hz), 4.41 (s, 2 H),

4.04 (s, 2 H), 3.51-3.44 (m, 2 H), 3.28-3.24 (m, 2 H), 3.03 (s, 3H), 2.94 (s, 3 H), 2.34 (s, 3 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.5, 140.7, 137.5, 132.4, 128.7, 128.3, 46.8, 46.2, 44.1, 43.3, 36.8, 36.1, 19.3.

111 trifluoroacetate de N,N-diméthyl-2-(3-(2-méthyl-4-(1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine-5-carbonyl)benzyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl)acétamide



$C_{27}H_{31}N_7O_3 \cdot C_2HF_3O_2$
MM 615,60
EP-VI-58

À une solution de l'acide 4-((3-(2-(diméthylamino)-2-oxoéthyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl)méthyl)-3-méthylbenzoïque (8.2 mg, 0.025 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre et sous argon sont ajoutés la 2,4,6-collidine (11 μ L, 0.08 mmol, 3 eq) et le triphosgène (2.2 mg, 0.008 mmol, 0.3 eq). Le mélange réactionnel est agité 10 min à TA puis la 1-méthyl-1,4,5,10-tétrahydrobenzo[b]pyrazolo[3,4-e][1,4]diazépine est rajoutée (5.7 mg, 0.028 mmol, 1.1 eq). Le mélange réactionnel est agité 16 h à TA puis évaporé sous pression réduite. Après purification par HPLC semi-préparative, un solide blanc est obtenu (3 mg, 23%).

$t_R = 3.17$ min

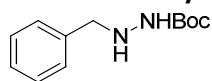
1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.77 (s, 1 H), 7.31 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz), 7.24-7.17 (m, 1 H), 7.07 (d, 2 H, $J = 5.6$ Hz), 7.02 (d, 1 H, $J = 8$ Hz), 6.84-6.76 (m, 2 H), 5.86 (A de AX, d, 1 H, $J = 14.5$ Hz), 4.33-4.22 (m, 2 H), 4.06 (s, 2 H), 4.02 (X de AX, d, 1 H, $J = 14.5$ Hz), 3.95 (s, 3 H), 3.42 (t, 2 H, $J = 8.0$ Hz), 3.16 (t, 2 H, $J = 8.0$ Hz), 3.02 (s, 3 H), 2.94 (s, 3 H), 2.17 (s, 3 H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 170.6, 155.30 138.7, 136.1, 134.5, 131.7, 130.9, 130.3, 128.8, 126.6, 124.6, 121.7, 104.9, 46.9, 46.4, 44.6, 44.2, 43.7, 36.7, 36.0, 35.1, 19.1.

HRMS (EI) calc 502.2561 pour $C_{27}H_{31}N_7O_3$; trouvé: 502.2546.

Mode Opérateur Partie 2 Chapitre 3

117 2-benzylhydrazinecarboxylate de *tert*-butyle



C₁₂H₁₈N₂O₂
MM 222,28
EP-II-26

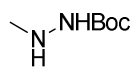
À une solution de carbazate de *tert*-butyle (3 g, 22.6 mmol, 1 eq) dissous dans le THF anhydre (30 mL) est ajouté le benzaldéhyde (2.3 mL, 22.6 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel est agité une nuit puis est évaporé à sec sous pression réduite. Le brut est dissous dans le THF anhydre (5 mL) et refroidi à 0 °C et le NaBH₃CN (3.6 g, 58 mmol, 2.5 eq) est ajouté en petites quantités suivi de l'acide acétique (33 mL) au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est laissé revenir à TA, agité toute la nuit puis est évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée. La phase aqueuse est basifiée avec NaHCO₃ solide puis est extraite avec 2×180 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont regroupées et lavées avec une solution de NaHCO₃ sat, de la saumure, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Le brut est repris dans un mélange MeOH/NaOH 1N (100 mL, 1/1, v/v). Le mélange réactionnel est agité 4 h à TA puis est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est extraite avec l'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées avec de la saumure, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (AcOEt/Heptane 2/8 jusqu'à 1/1), un solide est obtenu (4,8 g, 97%).

Rf = 0.625 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.32-7.24 (m, 3 H), 7.23-7.11 (m, 2 H), 3.91 (s, 2H), 1.37 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 156.8, 137.7, 129.2, 128.7, 127.7, 80.8, 56.1, 28.6.

118 2-méthylhydrazinecarboxylate de *tert*-butyle



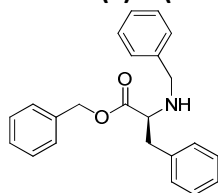
C₆H₁₄N₂O₂
MM 146,19
EP-III-84

À une solution de carbazate de *tert*-butyle (500 mg, 3.8 mmol, 1 eq) dissous dans le THF anhydre (5 mL) est ajouté le paraformaldéhyde (113 mg, 3.8 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel est agité une nuit puis est évaporé à sec sous pression réduite. Le brut est dissous dans le THF anhydre (9 mL) et refroidi à 0 °C et le NaBH₃CN (594 mg, 9.45 mmol, 2.5 eq) est ajouté en petites quantités suivi de l'acide acétique (5 mL) au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est laissé revenir à TA, agité toute la nuit puis est évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée. La phase aqueuse est basifiée avec NaHCO₃ solide puis est extraite avec 2×180 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont regroupées et lavées avec une solution de NaHCO₃ sat, de la saumure, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Le brut est repris dans un mélange MeOH/NaOH 1N (16 mL, 1/1, v/v). Le mélange réactionnel est agité 4 h à TA puis est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est extraite avec l'AcOEt. Les phases organiques sont combinées, lavées avec de la saumure, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir une huile incolore (426 mg, 77%).

Rf = 0.38 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.34 (sl, 2 H), 2.57 (d, 3 H, J = 16.5 Hz), 1.42 (s, 9 H).

MS (ES⁺) m/z 147.2 ([M+H]⁺)

119 (S) 2-(benzylamino)-3-phénylpropanoate de benzyle

C₂₃H₂₃NO₂
MM 345,43
EP-III-16

Protocole A

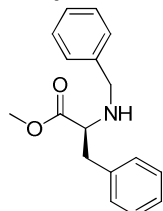
Huile incolore (445 mg, 94%)

R_f = 0.09 (AcOEt/Heptane, 1/9, v/v)

t_R = 4.34 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43-7.12 (m, 15 H), 5.11 (s, 2 H), 8.83 (d, 1 H, J = 13.6 Hz), 3.71-3.59 (m, 2 H), 3.01 (d, 2 H, J = 6.9 Hz), 1.96 (sl, 1 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 174.6, 139.7, 137.4, 135.8, 129.5, 128.7, 128.6, 128.4, 127.2, 126.9, 66.7, 62.3, 52.1, 39.9.

120/198 (S) 2-(benzylamino)-3-phénylpropanoate de méthyle

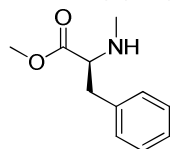
C₁₇H₁₉NO₂
MM 269,34
EP-II-190

Protocole A

Huile incolore (170 mg, 68%)

R_f = 0.59 (AcOEt/Heptane, 3/7, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.39-7.09 (m, 10 H), 3.84 (d, 1 H, J = 12.7 Hz), 3.74-6.62 (m, 4 H), 3.57 (t, 1 H, J = 6.9 Hz), 2.99 (d, 2 H, J = 6.7 Hz).

121 (S) 2-(méthylamino)-3-phénylpropanoate de méthyle

C₁₁H₁₅NO₂
MM 193,24
EP-III-116

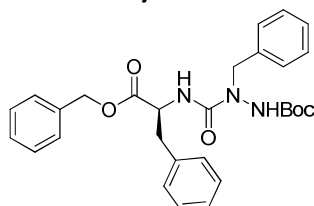
Protocole A

Huile incolore (285 mg, 60%)

R_f = 0.28 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.32-7.15 (m, 15 H), 3.66 (s, 3 H), 3.46 (t, 1 H, J = 6.8 Hz), 2.96 (d, 2 H, J = 6.8 Hz), 2.36 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 174.9, 137.3, 129.2, 128.6, 126.6, 64.8, 51.7, 39.6, 34.8.

122 (S) 2-benzyl-2-((1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)carbamoyl)hydrazine carboxylate de tert-butyle

C₂₉H₃₃N₃O₅
MM 503,59
EP-III-43

Protocole B

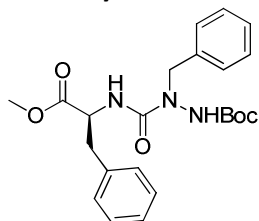
Huile incolore (61 mg, 71%)

R_f = 0.66 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37-7.25 (m, 10 H), 7.22-7.13 (m, 6 H), 7.02-6.95 (m, 3 H), 5.89-5.82 (m, 2 H), 5.17-5.04 (m, 3 H), 4.90-4.75 (m, 2H), 3.12 (d, 2H J = 5.3 Hz), 3.04 (d, 1 H, J = 5.5 Hz), 1.40 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.7, 156.8, 150.3, 136.0, 135.3, 129.4, 128.9, 128.6, 128.5, 127.9, 126.9, 99.4, 82.3, 67.1, 54.2, 54.1, 38.4, 28.1.

123 (S) 2-benzyl-2-((1-méthoxy-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)carbamoyl)hydrazinecarboxylate de tert-butyle



C₂₃H₂₉N₃O₅
MM 427,49
EP-III-41

Protocole B

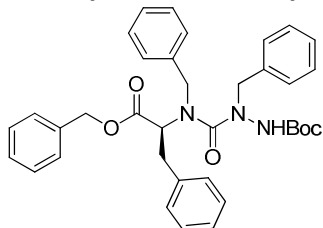
Huile incolore (77 mg, 67%)

R_f = 0.54 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.34-7.25 (m, 3 H), 7.23-7.17 (m, 4 H), 7.12-7.07 (m, 2 H), 5.86 (d, 2 H, J = 7.3 Hz), 4.82 (dd, 1 H, J = 13.4, 5.5 Hz), 3.69 (s, 3 H), 3.12 (d, 2 H, J = 5.5 Hz), 1.41 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.5, 156.8, 136.1, 129.4, 128.9, 128.5, 127.9, 127.0, 54.2, 52.2, 38.5, 28.7.

124 (S) 2-benzyl-2-(benzyl(1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)carbamoyl)hydrazine carboxylate de tert-butyle



C₃₆H₃₉N₃O₅
MM 593,71
EP-III-20

Protocole B

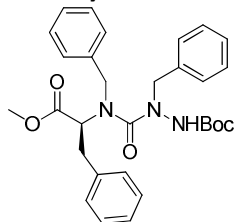
Huile incolore (250 mg, 74%)

R_f = 0.36 (AcOEt/Heptane, 3/7, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43-7.22 (m, 23 H), 7.17-7.12 (m, 2H), 6.64-6.46 (m, 1H), 5.09 (s, 2 H), 4.76 (d, 1 H, J = 29.9 Hz), 3.85 (d, 1 H, J = 12.6 Hz), 3.71 (d, 1 H, J = 12.6 Hz), 3.65 (t, 1 H, J = 7.3 Hz), 3.09-3.01 (m, 2 H), 1.49 (s, 9 H), 1.45-1.40 (m, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 153.3, 152.8, 152.4, 136.8, 135.5, 129.3, 128.9, 128.5, 126.4, 127.3, 126.8, 66.6, 61.9, 51.8, 39.4, 26.1.

125/201 (S) 2-benzyl-2-(benzyl(1-méthoxy-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)carbamoyl)hydrazine carboxylate de tert-butyle



C₃₀H₃₅N₃O₅
MM 517,62
EP-III-34

Protocole B

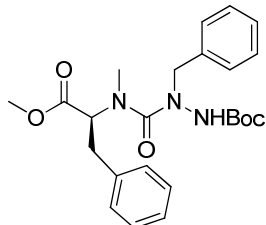
Huile incolore (248 mg, 30%)

t_R = 6.77 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42-6.90 (m, 10 H), 5.86 (sl, 1 H), 4.87 (sl, 1 H), 4.54 (d, 1 H, J = 16.8 Hz), 4.44-4.30 (m, 1 H), 3.98 (sl, 1 H), 3.74 (s, 3 H), 3.46-3.27 (m, 2 H), 1.25 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.5, 153.3, 152.4, 136.5, 134.4, 129.3, 128.9, 128.7, 128.5, 127.7, 126.9, 61.6, 54.7, 51.9, 51.6, 38.9, 28.0.

126 (S) 2-benzyl-2-((1-méthoxy-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)(méthyl)carbamoyl)hydrazine carboxylate de tert-butyle



C₂₄H₃₁N₃O₅
MM 441,52
EP-III-168

Protocole B

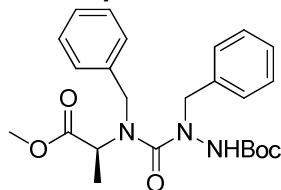
Huile incolore (32 mg, 47%)

R_f = 0.60 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.27-7.20 (m, 3 H), 7.17-7.06 (m, 7 H), 5.66 (sl, 1H), 5.22 (sl, 1H), 4.77 (sl, 2 H), 3.65 (s, 3 H), 3.26 (dd, 1 H, J = 14.6, 6.0 Hz), 2.96 (dd, 1 H, J = 14.6, 10.5 Hz), 2.80 (s, 3 H), 1.32 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.1, 162.5, 154.4, 137.6, 136.0, 129.4, 129.0, 128.7, 127.9, 126.9, 61.53, 54.3, 54.3, 52.4, 35.5, 34.0, 28.3.

127 (S) 2-benzyl-2-(benzyl(1-méthoxy-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl)hydrazinecarboxylate de tert-butyle



C₂₄H₃₁N₃O₅
MM 441,52
EP-III-157

Synthèse sur support à partir de la résine Fmoc-L-Ala Wang

Protocole **H, J, K, L**

La résine est agitée 1 nuit à 70 °C en présence de 1.2 eq de NaOMe dans un mélange MeOH/THF (1.5 mL, 3/1, v/v). La solution est filtrée, la résine est lavée (MeOH, CH₂Cl₂) et le filtrat est évaporé. Après purification par HPLC semi-préparative, une huile est obtenue (14.8 mg, 48%).

n = 0.07 mmol

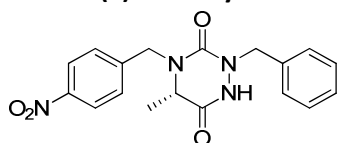
t_R = 5.87 min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.39-7.17 (m, 10 H), 4.72-4.48 (m, 2 H), 3.71 (s, 1H), 3.69 (s, 1H), 3.35 (s, 3 H), 1.45-1.22 (m, 12 H)

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 172.9, 166.0, 154.2, 143.9, 138.2, 135.9, 129.2, 128.6, 128.5, 127.7, 126.9, 126.7, 56.6, 53.8, 52.2, 29.7, 28.0, 15.3.

MS (ES⁺) m/z 465.2 ([M+Na]⁺)

133 (S)-2-benzyl-5-méthyl-4-(4-nitrobenzyl)-1,2,4-triazinane-3,6-dione



C₁₈H₁₈N₄O₄
MM 354,36
EP-II-14

Synthèse sur support à partir de la résine Fmoc-L-Ala Wang

Dérivé benzaldéhyde : 4-nitrobenzaldéhyde, dérivé 2-benzylhydrazinecarboxylate de tert-butyle **117**.

Protocoles **H, J, K, L**

Un mélange TFA/H₂O (95/5, v/v) est ajouté à la résine et la solution est agitée 1 h à TA. La solution est filtrée et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Après purification par HPLC semi-préparative, un solide blanc est obtenu (7 mg, 30%).

n = 0.068 mmol

Pf = 171.2 °C

[α]_D 72° (c = 1, chloroforme, 20 °C).

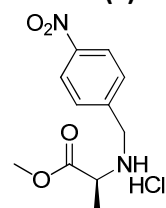
t_R = 4.00 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.10 (d, 2 H, *J* = 8.6 Hz), 7.37 (d, 2 H, *J* = 8.6 Hz), 7.26-7.22 (m, 4 H), 7.15 (s, 1 H), 4.89 (A de AX, d, 1 H, *J*AX = 15.9 Hz), 4.65 (ABq, 2 H, ΔδAB = 0.11, *J*AB = 15.2 Hz), 4.17 (X de AX, d, 1 H, *J*AX = 15.9 Hz), 3.64 (q, 1 H, *J* = 7.0 Hz), 1.07 (d, 3 H, *J* = 7.0 Hz)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 166.0, 154.1, 147.9, 144.5, 134.8, 129.2, 128.9, 128.8, 124.3, 55.9, 51.7, 48.7, 15.1.

MS (ES⁺) *m/z* 355.0 ([M+H⁺])

134 (S) 2-((4-nitrobenzyl)amino)propanoate de méthyle



C₁₁H₁₄N₂O₄

MM 274,70

SR-10-24

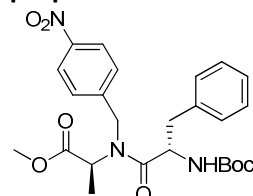
À une solution de chlorhydrate d'ester méthylique d'alanine (1 g, 7.16 mmol, 1 eq) dans le MeOH anhydre (12 mL) sont ajoutés la triéthylamine (995 μL, 7.16 mmol, 1 eq) et le 4-nitrobenzaldéhyde (1.19 g, 7.88 mmol, 1.1 eq). Le mélange réactionnel est agité 1 h 30 à TA puis refroidi à 0 °C. Le NaBH₄ (542 mg, 14.33 mmol, 2 eq) est ajouté par portions sur 30 min. Le mélange réactionnel est laissé revenir à TA ; agité 10 min puis évaporé sous pression réduite. Le brut est dilué dans l'AcOEt. La phase organique est lavée à l'eau, à la saumure, séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice, le résidu est dissous dans l'éther et 10 mL d'une solution de HCl 2N dans l'éther est ajouté au goutte à goutte à 0 °C. Le mélange réactionnel est agité 5 min à 0 °C puis 10 min à TA. Le précipité formé est filtré. Le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc (1.17 g, 60%).

Rf = 0.34 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.21 (sl, 2 H), 7.88 (sl, 2 H), 4.33 (sl, 2 H), 3.80-3.52 (m, 5 H), 1.65 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 169.0, 148.7, 136.7, 132.3, 130.5, 124.3, 124.2, 54.2, 53.8, 48.5, 15.2.

135 (S) 2-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-N-(4-nitrobenzyl)-3-phénylpropanamido)propanoate de méthyle



C₂₅H₃₁N₃O₇

MM 485,53

SR-10-27

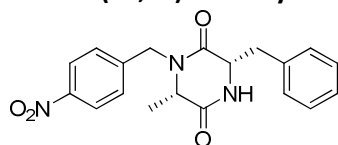
À une solution de Boc-L-Phe-OH (579 mg, 2.18 mmol, 1.5 eq) dans le THF anhydre (50 mL) sont ajoutés la 2,4,6-collidine (1.16 mL, 8.7 mmol, 6 eq) puis le triphosgène (255 mg, 0.87 mmol, 0.6 eq). Le mélange réactionnel est agité 5 min à TA puis le (S) 2-((4-nitrobenzyl)amino)propanoate de méthyle (400 mg, 1.45 mmol, 1 eq) dissous dans le THF anhydre (5 mL) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité 1 nuit à TA et évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice, une huile jaune est obtenue (422 mg, 60%).

t_R = 5.99 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.25-6.62 (m, 9 H), 5.34-4.47 (m, 2 H), 4.36 (s, 1 H), 4.29-3.73 (m, 2 H), 3.72-3.59 (m, 3 H), 3.43-2.83 (m, 2 H), 1.46-1.17 (m, 1 H)

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 173.0, 171.4, 171.3, 155.0, 147.7, 144.2, 136.5, 136.4, 129.8, 128.9, 127.8, 127.3, 124.1, 123.7, 80.3, 60.6, 55.8, 52.8, 52.5, 51.5, 50.1, 47.1, 40.5, 40.1, 28.5, 21.3.

136 (3S,6S)-3-benzyl-6-méthyl-1-(4-nitrobenzyl)pipérazine-2,5-dione



C₁₉H₁₉N₃O₄
MM 353,37
SR-10-32

Une solution de (S) 2-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-N-(4-nitrobenzyl)-3-phénylpropanamido)propanoate de méthyle (238 mg, 0.61 mmol, 1 eq) dans une solution TFA/CH₂Cl₂ (7 mL, 1/1, v/v) est agitée 30 min à TA et est évaporée sous pression réduite. Le brut est repris dans une solution de 4 eq de triéthylamine dans le DMF (343 µL, 2.47 mmol dans 4 mL de DMF) et agité à 60 °C pendant 1 nuit. Après purification par chromatographie flash en phase inverse, un solide blanc est obtenu (144 mg, 66%).

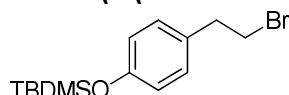
Pf = 89-90 °C

t_R = 4.07 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.17 (d, 2 H, J = 8.6 Hz), 7.38-7.26 (m, 5 H), 7.19 (d, 2 H, J = 7.2 Hz), 7.01 (sl, 1 H), 5.11 (d, 1 H, J = 15.4 Hz), 4.42 (sl, 1 H), 4.18 (d, 1 H, J = 15.5 Hz), 3.76 (q, 1 H, J = 7.0 Hz), 3.24-3.14 (m, 2 H), 0.89 (d, 3 H, J = 6.9 Hz).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 169.3, 165.3, 147.9, 143.1, 134.9, 130.2, 129.2, 129.0, 128.1, 124.3, 57.0, 55.9, 47.5, 41.1, 18.6.

137 (4-(2-bromoéthyl)phénoxy)(tert-butyl)diméthylsilane



C₁₄H₂₃BrOSi
MM 315,32
EP-IV-82

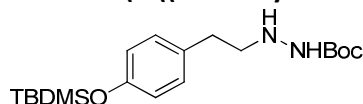
À une solution de 4-(2-bromoéthyl)phénol (250 mg, 1.24 mmol, 1 eq) et de chlorure de tert-butyl diméthylsilyl (206 mg, 1.37 mmol, 1 eq) dans le CH₂Cl₂ sous argon et à 0 °C est ajouté l'imidazole (212 mg, 3.1 mmol, 2.5 eq). Le mélange réactionnel est agité 10 min à 0 °C puis 24 h à TA. 6 mL d'eau sont ajoutés au mélange réactionnel. Le milieu est acidifié avec une solution d'acide citrique 10% jusqu'à pH < 4. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau, à la saumure, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice pour obtenir une huile verdâtre (298 mg, 94%).

Rf = 0.70 (AcOEt/Heptane, 1/9, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.04 (d, 2 H, J = 8.4 Hz), 6.77 (d, 2 H, J = 8.4 Hz), 3.50 (t, 2 H, J = 7.8 Hz), 3.04 (t, 2 H, J = 7.8 Hz), 0.96 (s, 9 H), 0.18 (s, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 154.8, 131.9, 129.8, 120.3, 40.0, 33.4, 25.9, -5.0.

138 2-(4-((tert-butyl diméthylsilyl)oxy)phénéthyl)hydrazinecarboxylate de tert-butyle



C₁₉H₃₄N₂O₃Si
MM 366,57
EP-IV-86

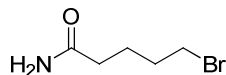
À une solution de (4-(2-bromoéthyl)phénoxy)(tert-butyl)diméthylsilane (290 mg, 0.92 mmol, 1 eq) dans le DMF anhydre sous argon et à 0 °C est ajouté au goutte à goutte le carbazate de tert-butyle (365 mg, 2.76 mmol, 3 eq) dissous le DMF anhydre (3 mL). Le mélange réactionnel est ramené à TA, est agité à 80 °C pendant une nuit puis évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée à la saumure, séchée et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice pour obtenir une huile incolore (178 mg, 53%).

Rf = 0.645 (AcOEt/Hept, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.08-6.99 (m, 2 H), 6.79-6.69 (m, 2 H), 3.06 (t, 2 H, J = 7.4 Hz), 2.69 (t, 2 H, J = 7.4 Hz), 1.43 (s, 9 H), 0.952 (s, 9 H), 0.157 (s, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 156.9, 154.2, 132.3, 130.2, 129.7, 120.4, 120.2, 80.5, 53.5, 33.8, 28.6, 28.4, 25.9, -4.2.

139 5-bromopentanamide



C₅H₁₀BrNO
MM 180,04
EP-IV-135

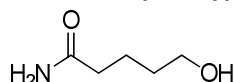
À une solution d'acide 5-bromovalérique (600 mg, 3.31 mmol, 1 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre (8 mL) est ajouté le chlorure de thionyle (724 µL, 994 mmol, 3 eq). Le mélange réactionnel est agité 1 nuit à TA et évaporé sous pression réduite (azéotrope avec toluène). Le brut est dissous dans 3 mL de NH₄OH 30% aqueux (8 mL) à 0 °C. Le mélange réactionnel est agité 1 h à 0 °C puis est dilué avec du chloroforme. Les phases organique et aqueuse sont séparées. La phase aqueuse est lavée au chloroforme. Les phases organiques sont combinées, lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir un solide blanc (354 mg, 60%).

Rf = 0.55 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 3.40 (t, 2 H, J = 6.6 Hz), 2.20 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 1.91-1.69 (m, 4 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 177.6, 62.1, 35.0, 33.5, 32.7, 24.7.

140 5-hydroxypentanamide



C₅H₁₁NO₂
MM 117,15
EP-V-22

Une solution de tétrahydro-2H-pyran-2-one (230 µL, 2.49 mmol, 1 eq) dans 6 mL de NH₄OH est agitée 5 min à 0 °C et 30 min à TA. Le mélange réactionnel est évaporé à sec. Le résidu est purifié par chromatographie flash en phase inverse pour obtenir une poudre blanche (314 mg, 70%).

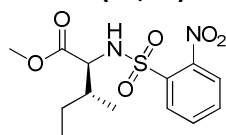
Pf = 101-102 °C

Rf = 0.16 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 3.56 (q, 2 H, J = 5.6 Hz), 2.32-2.18 (m, 2 H), 1.77-1.49 (m, 4 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 179.2, 62.6, 36.3, 33.1, 23.3.

141 (2S,3R) 3-méthyl-2-(2-nitrophénylsulfonamido)pentanoate de méthyle



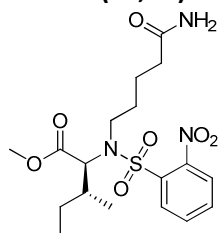
C₁₃H₁₈N₂O₆S
MM 330,36
EP-V-23

À une solution de chlorure d'ester méthylique d'isoleucine (410 mg, 2.25 mmol, 1 eq) et de triéthylamine (629 µL, 4.51 mmol, 2 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre et à 0 °C est ajouté le chlorure de 2-nitrobenzènesulfonyl (500 mg, 2.25 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel est agité 10 min à 0 °C puis 3 h à TA. La phase organique est lavée avec une solution de HCl 1N, une solution saturée de NaHCO₃, de la saumure, séchée sur Na₂CO₃ et évaporée sous pression réduite pour obtenir une huile jaune (519 mg, 70%).

Rf = 0.421 (AcOEt/Hept 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.04-7.99 (m, 1 H), 7.90-7.85 (m, 1 H), 7.73-7.67 (m, 2 H), 6.03 (d, 1 H, J = 9.8 Hz), 4.01 (dd, 1 H, J = 9.8, 5.6 Hz), 3.38 (s, 3 H), 1.92-1.80 (m, 1 H), 1.50-1.37 (m, 1 H), 1.25-1.12 (m, 1 H), 0.92 (d, 3 H, J = 6.8 Hz), 0.86 (t, 3 H, J = 7.3 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.2, 147.8, 133.8, 133.0, 130.6, 125.7, 61.5, 52.2, 38.3, 24.9, 15.6, 11.4.

142 (2S,3R) 2-(N-(5-amino-5-oxopentyl)-2-nitrophénylsulfonamido)-3-pentanoate de méthyleC₁₈H₂₇N₃O₇S

MM 429,49

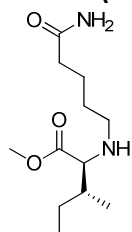
EP-V-27

À une solution (2S,3R) 3-méthyl-2-(2-nitrophénylsulfonamido)pentanoate de méthyle (200 mg, 0.605 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (12 mL) sous argon et refroidi à 0 °C sont ajoutés le 5-hydroxypentanamide (109 mg, 0.605 mmol, 1 eq) et la triphénylphosphine (317 mg, 1.21 mmol, 2 eq). Après 10 min d'agitation à 0 °C et le diéthyl azodicarboxylate (190 µL, 1.21 mmol, 2 eq) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0 °C puis une nuit à TA. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice pour obtenir une huile jaune (145 mg, 66%).

 $t_R = 4.5$ minR_f = 0.22 (AcOEt)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.95 (d, 1 H, J = 7 Hz), 7.65 (q, 2 H, J = 7 Hz), 7.58 (d, 1 H, J = 7 Hz), 3.55-3.32 (m, 5 H), 2.22 (t, 2 H, J = 7.1 Hz), 1.91-1.73 (m, 3 H), 1.72-1.51 (m, 4 H), 1.22 (t, 2 H, J = 7 Hz), 1.13-0.99 (m, 1 H), 0.93-0.77 (m, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175.4, 170.9, 148.6, 133.8, 131.5, 124.0, 65.0, 51.9, 45.8, 35.3, 35.1, 30.5, 25.6, 23.0, 15.7, 11.0.

143 (2S,3R) 2-((5-amino-5-oxopentyl)amino)-3-méthylpentanoate de méthyleC₁₂H₂₄N₂O₃

MM 244,33

EP-V-46

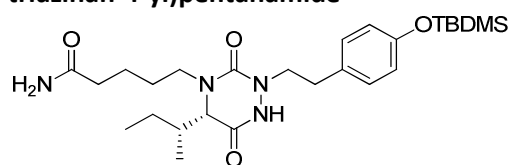
À une solution de (2S,3R) 2-(N-(5-amino-5-oxopentyl)-2-nitrophénylsulfonamido)-3-pentanoate de méthyle (110 mg, 0.17 mmol, 1 eq) dans le DMF anhydre (1 mL) sont ajoutés le carbonate de potassium (47 mg, 0.33 mmol, 2 eq) et le thiophénol (26 µL, 0.25 mmol, 1.5 eq). Le mélange réactionnel est agité 3 heures à TA et évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après purification sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v), une huile incolore est obtenue (41 mg, quant).

R_f = 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.96 (s, 1 H), 5.80 (s, 1 H), 3.65 (s, 3 H), 3.01 (d, 1 H, J = 6.1 Hz), 2.58-2.49 (m, 1 H), 2.41-2.32 (m, 1 H), 2.16 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 1.67-1.54 (m, 3 H), 1.51-1.38 (m, 3 H), 1.22-1.03 (m, 1 H), 0.86-0.79 (m, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175.9, 175.8, 66.3, 51.5, 48.2, 38.5, 35.7, 29.8, 29.7, 25.9, 23.2, 15.9, 15.6, 11.6.

144 5-((S)-5-((R)-sec-butyl)-2-(4-((tert-butyldiméthylsilyl)oxy)phénéthyl)-3,6-dioxo-1,2,4-triazinan-4-yl)pentanamide



C₂₆H₄₄N₄O₄Si
MM 504,74
EP-V-57

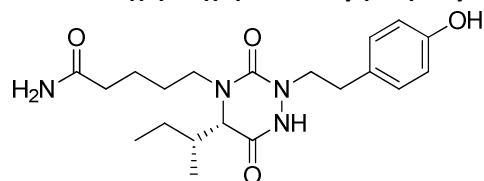
À une solution de 2-(4-((tert-butyldiméthylsilyl)oxy)phénéthyl)hydrazinecarboxylate de *tert*-butyle (91 mg, 0.25 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (4 mL) dans un tube micro-onde sont ajoutés la DIEA (62 µL, 0.37 mmol, 1.5 eq) et le triphosgène (22 mg, 0.07 mmol, 0.3 eq). Le mélange réactionnel est agité 5 min à TA puis une solution de (2S,3R) 2-((5-amino-5-oxopentyl)amino)-3-méthylpentanoate de méthyle (61 mg, 0.25 mmol, 1 eq) et de DIEA (62 µL, 0.37 mmol, 1.25 eq) dans le THF anhydre (0.5 mL) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité une nuit à 100 °C puis 24 h à 110 °C et le solvant est évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur phase inverse, une huile est obtenue (30 mg, 25%).

t_R = 6.32 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.04 (d, 2 H, *J* = 8.3 Hz), 6.72 (d, 2 H, *J* = 8.3 Hz), 5.73-5.56 (sl, 2 H), 3.83 (d, 1 H, *J* = 3.1 Hz), 3.73-3.58 (m, 1 H), 3.13 (t, 2 H, *J* = 7.4 Hz), 3.09-2.97 (m, 1 H), 2.74 (t, 2 H, *J* = 7.4 Hz), 2.31-2.17 (m, 2 H), 1.95-1.79 (m, 1 H), 1.72-1.48 (m, 6 H), 0.98-0.90 (m, 12 H), 0.81 (d, 3 H, *J* = 7.1 Hz), 0.14 (s, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175.0, 170.0, 155.9, 154.3, 131.3, 130.1, 129.7, 120.2, 61.4, 52.2, 40.2, 35.2, 34.9, 33.6, 27.2, 25.9, 25.1, 22.4, 13.3, 12.3, -4.3.

145 5-((S)-5-((R)-sec-butyl)-2-(4-hydroxyphénéthyl)-3,6-dioxo-1,2,4-triazinan-4-yl)pentanamide



C₂₀H₃₀N₄O₄
MM 390,48
EP-V-60

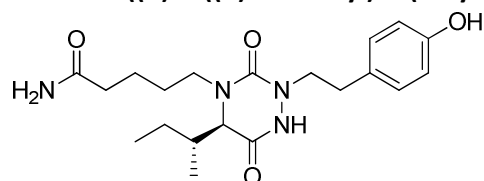
À une solution de 5-((S)-5-((R)-sec-butyl)-2-(4-((tert-butyldiméthylsilyl)oxy)phénéthyl)-3,6-dioxo-1,2,4-triazinan-4-yl)pentanamide (29 mg, 0.056 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (2 mL) est ajouté une solution de TBAF 1M (62 µL, 0.062 mmol, 1.1 eq) dans le THF. Le mélange réactionnel est agité 10 min à 0 °C et une nuit à TA. Le solvant est concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée avec de l'eau, de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash en phase inverse, une huile incolore est obtenue (12.3 mg, 55%).

t_R = 3.47 min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.01 (d, 2 H, *J* = 7.4 Hz), 6.71 (d, 2 H, *J* = 8 Hz), 3.85 (dd, 1 H, *J* = 9.3, 3.2 Hz), 3.56-3.69 (m, 1 H), 3.11 (t, 2 H, *J* = 7.6 Hz), 3.08-3.00 (m, 1 H), 2.71 (t, 2 H, *J* = 7.6 Hz), 2.31-2.15 (m, 2 H), 1.98-1.83 (m, 1 H), 1.70-1.52 (m, 6 H), 1.50-1.29 (m, 1 H), 1.08 (d, 2 H, *J* = 7.1 Hz), 0.94 (dt, 3 H, *J* = 18.0, 7.5 Hz), 0.8 (d, 2 H, *J* = 6.8 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 177.4, 171.4, 171.0, 156.6, 156.5, 155.9, 130.1, 115.9, 62.8, 61.8, 52.3, 41.4, 40.7, 36.1, 35.5, 35.1, 33.9, 27.6, 25.4, 24.3, 23.0, 14.6, 13.5, 12.4, 12.3.

115 5-((R)-5-((R)-sec-butyl)-2-(4-hydroxyphénéthyl)-3,6-dioxo-1,2,4-triazinan-4-yl)pentanamide



C₂₀H₃₀N₄O₄
MM 390,48
EP-V-91

À une solution de 5-((R)-5-((R)-sec-butyl)-2-(4-((tert-butyldiméthylsilyl)oxy)phénéthyl)-3,6-dioxo-1,2,4-triazinan-4-yl)pentanamide (19 mg, 0.037 mmol, 1 eq) dans le THF anhydre (2 mL) est ajouté

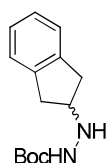
une solution de TBAF 1M (41 μ L, 0.041 mmol, 1.1 eq) dans le THF. Le mélange réactionnel est agité 10 min à 0 °C et une nuit à TA. Le solvant est concentré. Le résidu est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée avec de l'eau, de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash en phase inverse, une huile incolore est obtenue (8.1 mg, 55%).

t_R = 3.47 min

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.08-7.00 (m, 2 H), 6.78-6.68 (m, 2 H), 3.89 (dd, 1 H, J = 9.7, 3.0 Hz), 3.69-3.54 (m, 1 H), 3.24-3.02 (m, 4 H), 2.73 (t, 3 H, J = 7.9 Hz), 2.31-2.19 (m, 3 H), 2.04-1.82 (m, 2 H), 1.73-1.52 (m, 6 H), 1.12 (t, 2 H, J = 6.3 Hz), 1.03-0.90 (m, 4 H), 0.3 (t, 2 H, J = 7.0 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 177.4, 171.4, 171.0, 156.6, 156.5, 155.9, 130.1, 115.9, 62.8, 61.8, 52.3, 41.4, 40.7, 36.1, 35.5, 35.1, 33.9, 27.6, 25.4, 24.3, 23.0, 14.6, 13.5, 12.4, 12.3.

148 2-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)hydrazinecarboxylate de *tert*-butyle



C₁₄H₂₀N₂O₂

MM 248,32

EP-VI-62

Une solution de 2-indanone (325 mg, 2.45 mmol, 1 eq) et de carbazate de *tert*-butyle (325 mg, 2.45 mmol, 1 eq) est agitée 2 h à TA et évaporée sous pression réduite. Le brut est repris dans 5 mL d'une solution d'acide acétique à 50% et 5 mL de TMOF. A cette solution est ajouté par portion le NaBH₃CN (154 mg, 2.49 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel est agité 2 h à TA puis neutralisé avec une solution de NaOH 1N. La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, lavées avec une solution de NaHCO₃ saturée, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice, une poudre blanche est obtenue.

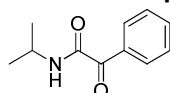
R_f = 0.66 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

P_f = 109 °C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.20-7.18 (m, 2 H), 7.15-7.10 (m, 2 H), 6.17 (sl, 1 H), 3.99 (s, 1 H), 3.06 (dd, 2 H, J = 16.1, 6.7 Hz), 2.80 (dd, 2 H, J = 16.1, 4 Hz), 1.45 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 157.2, 141.6, 126.7, 125.0, 124.6, 81.0, 60.6, 38.1, 28.6.

149 N-isopropyl-2-oxo-2-phénylacétamide



C₁₁H₁₃NO₂

MM 191,23

EP-VI-60

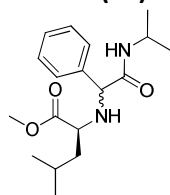
À une solution d'acide benzoylformique (300 mg, 1.99 mmol, 1 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre et refroidi à 0 °C est ajouté, au goutte à goutte, le chlorure d'oxalyle (343 μ L, 3.99 mmol, 2 eq) et une goutte de DMF anhydre. Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 4 h et évaporé sous pression réduite (coévaporation avec CH₂Cl₂ 3 fois). Le résidu est repris dans 5 mL de CH₂Cl₂ et est refroidi à 0 °C. La 2-propanamine (205 μ L, 2.39 mmol, 1.2 eq) et la triéthylamine (416 μ L, 2.99 mmol, 1.5 eq) sont rajoutées au mélange réactionnel. La solution est agitée à TA pendant 5 h, diluée avec du CH₂Cl₂ et neutralisée avec de l'eau. La phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, un solide blanc est obtenu (293 mg, 77%).

R_f = 0.78 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

P_f = 83 °C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.27 (dd, 2 H, J = 8.0, 1.7 Hz), 7.55 (t, 1 H, J = 7.4 Hz), 7.41 (t, 2 H, J = 7.4 Hz), 4.16-4.04 (m, 1 H), 1.20 (s, 3 H), 1.19 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 188.2, 161.1, 134.5, 131.4, 128.7, 41.9, 22.7.

150 (2S) 2-((2-(isopropylamino)-2-oxo-1-phényléthyl)amino)-4-méthylpentanoate de méthyle

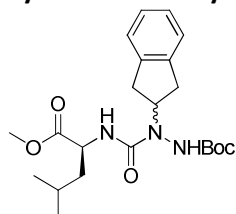
C₁₈H₂₈N₂O₃
MM 320,43
EP-VI-73

À une solution de triéthylamine supportée (117 mg, 0.41 mmol, 2 eq) dans le CH₂Cl₂ (3 mL) dans une seringue en polypropylène est ajouté l'ester méthylique de leucine (114 mg, 0.63 mmol, 3 eq). Le mélange est agité 30 min à TA puis la solution est filtrée et évaporée. Le résidu est repris dans 2 mL de toluène. A cette solution sont ajoutés la N-isopropyl-2-oxo-2-phénylacétamide (40 mg, 0.20 mmol, 1 eq) et l'isopropoxyde de titanium (IV) (61 µL, 0.20 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel est agité 2 h à TA et est évaporé sous pression réduite. Au résidu repris dans le CH₂Cl₂ anhydre (2 mL) sont ajoutés le triacétoborohydrure de sodium (67 mg, 0.31 mmol, 1.5 eq) et l'acide acétique (12 µL, 0.20 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA et est quenché avec une solution de NaHCO₃ saturée et dilué avec du CH₂Cl₂. La solution est filtrée sur célite (rincée avec du CH₂Cl₂). La phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na₂SO₄ et sont évaporées sous pression réduite. Après purification par HPLC semi préparative, un solide blanc est obtenu (28 mg, 30%).

t_R = 3.55 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.24 (sl, 2 H), 7.50-7.31 (m, 5 H), 5.02 (d, 1 H, J = 40.6 Hz), 4.09-3.91 (m, 1 H), 3.66 (s, 3 H), 3.54 (s, 1 H), 3.69-3.46 (m, 1 H), 1.85-1.54 (m, 3 H), 1.11 (dd, 3 H, J = 9.4, 6.7 Hz), 1.01 (dd, 3 H, J = 10.6, 6.4 Hz), 0.91-0.77 (m, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 171.3, 168.4, 168.1, 161.8, 161.5, 130.1, 129.8, 129.6, 129.3, 129.0, 128.9, 64.4, 63.8, 57.8, 57.2, 52.8, 52.7, 42.3, 42.1, 40.8, 40.2, 25.0, 22.8, 22.5, 22.4, 22.2, 22.1, 21.9. (deux diastéréoisomères)

152 (S)-2-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)-2-((1-méthoxy-4-méthyl-1-oxopentan-2-yl)carbamoyl)hydrazinecarboxylate de tert-butyle

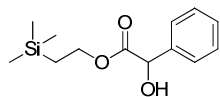
C₂₂H₃₃N₃O₅
MM 419,51
EP-VI-110

À une solution d'ester méthylique d'isoleucine (73.16 mg, 0.40 mmol, 1 eq) dans le THF (2.5 mL) est ajouté le triphosgène (42 mg, 0.14 mmol, 0.35 eq) et la DIEA (99 µL, 0.6 mmol, 1.5 eq). Le mélange réactionnel est agité 15 min à TA et une solution du 2-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)hydrazinecarboxylate de tert-butyle (100 mg, 0.4 mmol, 1 eq) et de DIEA (99 µL, 0.6 mmol, 1.5 eq) en solution dans le THF (2.5 mL) est ajoutée au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA et évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, une huile incolore est obtenue (168 mg, 99%).

R_f = 0.39 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.20-7.08 (m, 4 H), 6.16 (sl, 1 H), 5.56 (sl, 1 H), 5.24 (sl, 1 H), 4.57-4.41 (m, 1 H), 3.71 (s, 3 H), 3.20-3.07 (m, 2 H), 3.06-2.78 (m, 2 H), 1.78-1.50 (m, 2 H), 1.39 (s, 9 H), 0.97-0.87 (m, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.5, 157.1, 155.0, 141.0, 126.7, 1024.6, 81.8, 57.7, 53.6, 21.1, 38.3, 36.2, 28.1, 25.1, 15.6, 11.7.

153 2-(triméthylsilyl)éthyl 2-hydroxy-2-phénylacétate

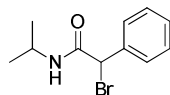
$C_{13}H_{20}O_3Si$
MM 252,38
EP-VI-121

À une solution d'acide DL-mandélique (100 mg, 0.65 mmol, 1 eq) dans le CH_2Cl_2 anhydre (5 mL) est ajouté le chlorure de thionyle (95 μ L, 1.3 mmol, 2 eq). Le mélange réactionnel est agité 5 h à TA, est évaporé sous pression réduite (azéotrope avec toluène) et est séché sous vide 30 min. Le brut est repris dans du CH_2Cl_2 anhydre (5 mL) et le triméthylsilyléthanol (188 μ L, 1.31 mmol, 2 eq) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité 2 h à TA et évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, une huile est obtenue (46 mg, 28%).

Rf = 0.69 (AcOEt/Hept, 1/1, v/v)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.48-7.28 (m, 5 H), 5.14 (s, 1 H), 4.38-4.15 (m, 2 H), 3.42 (sl, 1 H), 0.97 (t, 2 H, J = 8.7 Hz), 0.05 (s, 9 H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 175.4, 140.1, 130.1, 130.0, 128.2, 74.6, 66.3, 18.8, 0.0.

154 2-bromo-N-isopropyl-2-phénylacétamide

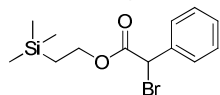
$C_{11}H_{14}BrNO$
MM 256,14
EP-VI-174

À une solution d'acide 2-bromo-phényl acétique (200 mg, 0.93 mmol, 1 eq) dans le CH_2Cl_2 (10 mL) et à 0 °C sont ajoutés l'HOBt (150.3 mg, 1.12 mmol, 1.5 eq), l'EDCI (173.3 mg, 1.12 eq, 1.5 eq), et la 2-propanamine (55 mg, 0.93 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA et dilué avec du CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée à l'eau, à la saumure, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, un solide blanc est obtenu (100 mg, 42%).

t_R = 4.33 min

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.48-7.31 (m, 5 H), 6.48 (sl, 1 H), 5.42 (s, 1 H), 4.22-4.01 (m, 1 H), 1.24, (s, 3 H), 1.22 (s, 3 H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 156.8, 129.8, 128.5, 42.9, 22.8, 14.4.

155 2-(triméthylsilyl)éthyl 2-bromo-2-phénylacétate

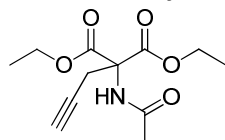
$C_{13}H_{19}BrO_2Si$
MM 315,28
EP-VI-140

À une solution d'acide 2-bromo-phényl acétique (100 mg, 0.46 mmol, 1 eq) dans le CH_2Cl_2 anhydre (5 mL) est ajouté le chlorure de thionyle (40 μ L, 0.56 mmol, 1.2 eq). Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA et évaporé sous pression réduite (azéotrope avec toluène). Le résidu est séché sous vide pour la nuit et repris dans du CH_2Cl_2 anhydre (5 mL) et le triméthylsilyléthanol (73 μ L, 0.51 mmol, 1.1 eq) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité 5 h à TA et est dilué avec CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec une solution de HCl 1N, de $NaHCO_3$ saturée, de la saumure, séchée sur Na_2SO_4 et est évaporée sous pression réduite pour obtenir une huile (83 mg, 57%).

Rf = 0.89 (CH_2Cl_2 /MeOH, 9/1, v/v)

H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.55-7.49 (m, 2 H), 7.36-7.28 (m, 3 H), 5.30 (s, 1 H), 4.32-4.17 (m, 2 H), 0.99 (t, 2 H, J = 8.6 Hz), 0.005 (s, 9 H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 168.5, 136.1, 129.4, 128.9, 128.8, 65.2, 47.3, 17.3, -1.3.

159 diéthyl 2-acétamido-2-(prop-2-yn-1-yl)malonate

$C_{12}H_{17}NO_5$
MM 255,27
EP-IV-155

Une solution de diéthyl malonate (500 mg, 2.3 mmol, 1 eq), de carbonate de césium (1.5 g, 4.6 mmol, 2 eq) et une solution de bromure de propargyle 80% dans le toluène (500 µL, 4.6 mmol, 2 eq) dissous dans l'acétonitrile dans un tube micro-onde flambé est irradiée 10 min à 130 °C. Le précipité est filtré. Le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (AcOEt/Heptane, 8/2, v/v) pour obtenir un solide blanc (905 mg, 77%).

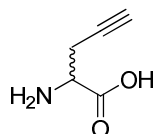
Rf= 0.442 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

Pf= décomposition

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.92 (s, 1 H), 4.24-4.15 (m, 4 H), 3.20 (dd, 2 H, J = 2.7, 1.8 Hz), 2.00 (d, 3 H, J = 1.4 Hz), 1.92 (t, 1 H, J = 2.6 Hz), 1.20 (td, 6 H J = 7.1, 1.4 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 166.7, 78.4, 71.5, 65.4, 63.0, 23.9, 23.0, 14.0.

160 Acide 2-aminopent-4-ynoïque



C₅H₇NO₂
MM 113,11
EP-IV-159

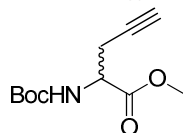
Une suspension de diéthyl 2-acétamido-2-(prop-2-yn-1-yl)malonate (715 mg, 2.8 mmol, 1 eq) dans une solution d'HCl 6N (10 mL) est irradiée au micro-onde à 100 °C pendant 20 min, à 105 °C pendant 25 min et est évaporée sous pression réduite. Le résidu est précipité dans l'acétone et filtré pour obtenir un solide blanc (356 mg, 85%).

Pf= décomposition

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.20 (t, 1 H, J = 5.3 Hz), 2.92 (td, 2 H, J = 5.3, 2.7 Hz), 2.54 (t, 1 H, J = 2.7 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 171.0, 76.7, 74.0, 51.6, 20.0.

161 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)pent-4-ynoate de méthyle



C₁₁H₁₇NO₄
MM 227,26
EP-V-29, EP-V-31

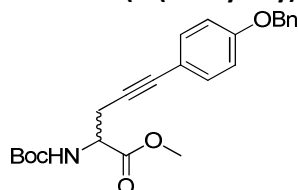
À une solution de chlorure de thionyle (254 µL, 3.5 mmol, 1.1 eq) dans le MeOH anhydre (4 mL) refroidi à 0 °C est ajouté l'acide 2-aminopent-4-ynoïque (477 mg, 3.19 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel est agité 10 min à 0 °C, une nuit à TA et évaporé sous pression réduite (azéotrope avec du toluène). Le produit est séché sous vide pendant 2 h et repris dans du CH₂Cl₂ anhydre (10 mL). La triéthylamine (444 µL, 3.82 mmol, 1.2 eq) et le dicarbonate de di-*tert*-butyle (835 mg, 3.82 mmol, 1.2 eq) sont rajoutés au milieu réactionnel. Le mélange réactionnel est agité 6 h à TA, concentré sous pression réduite et purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice pour obtenir une huile incolore (423 mg, 60%).

Rf = (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.42-5.27 (m, 1 H), 4.54-4.39 (m, 1 H), 3.77 (s, 3 H), 2.81-2.66 (m, 2 H), 2.04 (t, 1 H, J = 2.7 Hz), 1.45 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.3, 155.3, 80.4, 78.7, 71.8, 52.8, 52.1, 28.5, 23.0.

162 5-(4-(benzyloxy)phényl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)pent-4-ynoate de méthyle



C₂₄H₂₇NO₅
MM 409,47
EP-VI-151

Une solution de 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)pent-4-ynoate de méthyle (250 mg, 1.1 mmol, 1. eq), de 1-(benzyloxy)-4-iodobenzène (341 mg, 1.1 mmol, 1 eq), de iodure de cuivre (21 mg, 0.11 mmol, 0.1

eq), de Pd(PPh₃)₂Cl₂ (38 mg, 0.055 mmol, 0.05 eq) et de thiéthylamine (1.52 mL, 11 mmol, 10 eq) dans le DMF anhydre sous argon dans un tube MW flambé est agitée 1 nuit à 40 °C et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, une huile est obtenue (296 mg, 66%).

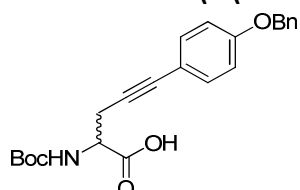
t_R = 6.67 min

Rf = 0.73 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43-7.30 (m, 7 H), 6.90 (d, 2 H, *J* = 8.6 Hz), 5.41 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz), 5.06 (s, 2 H), 4.63-4.52 (m, 1 H), 3.80 (s, 3 H), 3.01-2.84 (m, 2 H), 1.47 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.4, 158.7, 155.3, 136.7, 133.1, 128.6, 128.0, 127.4, 115.8, 114.9, 83.5, 82.4, 80.2, 70.1, 52.5, 28.2, 23.9.

163 Acide 5-(4-(benzyloxy)phényl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pent-4-ynoïque



C₂₃H₂₅NO₅

MM 395,45

EP-VI-124

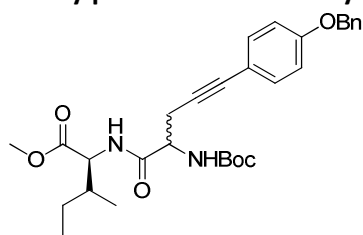
À une solution de 5-(4-(benzyloxy)phényl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pent-4-ynoate de méthyle (89.7 mg, 0.22 mmol, 1 eq) dans un mélange THF/H₂O (4.5 mL, 2/1) est ajouté l'hydroxide de sodium (21 mg, 0.88 mmol, 4 eq). Le mélange réactionnel est agité 4 h à TA puis une solution d'acide chlorhydrique 1N (15 mL) est ajoutée. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir un solide blanc (80 mg, 92%).

t_R = 5.87 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.41-7.27 (m, 7 H), 6.85 (d, 2 H, *J* = 8.7 Hz), 5.38 (d, 1 H, *J* = 8.5 Hz), 5.01 (s, 2 H), 4.61-4.53 (m, 1 H), 3.05-2.86 (m, 2 H), 1.44 (s, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175.6, 158.8, 155.6, 136.8, 133.4, 128.8, 128.2, 127.6, 115.5, 115.0, 83.9, 82.2, 80.7, 70.2, 28.5, 23.8.

164 (2S,3R) 2-(5-(4-(benzyloxy)phényl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pent-4-ynamido)-3-méthylpentanoate de méthyle



C₃₀H₃₈N₂O₆

MM 522,63

EP-VI-125

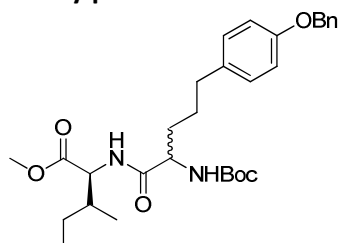
À une solution d'acide 5-(4-(benzyloxy)phényl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pent-4-ynoïque dans le CH₂Cl₂ sont ajoutés la triéthylamine (46 µL, 0.33 mmol, 1.5 eq), l'EDCI (41 mg, 0.26 mmol, 1.2 eq) et l'HOBt (35 mg, 0.26 mmol, 1.2 eq). Le mélange réactionnel est agité 10 min à TA puis l'ester méthylique d'isoleucine est ajouté. Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA et est dilué avec du CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée, de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice, une huile est obtenue (92.2 mg, 86%).

t_R = 6.87/6.91 min (diastéréoisomères)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.41-7.27 (m, 7 H), 6.86 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz), 5.50-5.30 (m, 1 H), 5.03 (s, 2 H), 4.63-4.54 (m, 1 H), 4.34 (sl, 1 H), 3.66 (s, 3 H), 3.00 (td, 1 H, *J* = 16.7; 5.2 Hz), 2.77 (dd, 1 H, *J* = 16.8; 7.0 Hz), 1.95-1.81 (m, 1 H), 1.44 (d, 9 H, *J* = 3.7 Hz), 1.42-1.34 (m, 1 H), 1.19-1.06 (m, 1 H), 0.87 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz), 0.82 (t, 3 H, *J* = 7.1 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.1, 171.9, 170.3, 170.2, 158.7, 155.4, 136.6, 133.2, 128.6, 127.5, 115.5, 114.8, 83.3, 80.4, 70.0, 56.7, 56.6, 53.5, 52.1, 38.0, 28.3, 25.0, 15.4, 11.5 (2 diastéréoisomères).

165 (2S,3R)2-(5-(4-(benzyloxy)phényl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)pentanamido)-3-méthylpentanoate de méthyle



C₃₀H₄₂N₂O₆
MM 526,66
EP-VI-181

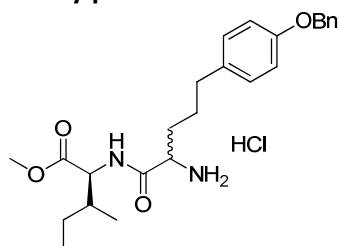
À une solution du (2S,3R) 2-(5-(4-(benzyloxy)phényl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)pent-4-ynamido)-3-méthylpentanoate de méthyle (120 mg, 0.22 mmol, 1 eq) dans l'AcOEt (10 mL) et sous argon est ajouté le rhodium sur charbon (47 mg, 0.022 mmol, 0.1 eq). Le mélange réactionnel est agité à TA sous une atmosphère d'hydrogène pendant 6 h, filtré sur célite et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Il reste du produit alcène. Le brut est repris dans l'AcOEt (8 mL) et le rhodium sur charbon (22 mg, 0.011 mmol, 0.05 eq) est ajouté au mélange réactionnel. Le mélange réactionnel est agité 8 heures à TA et est filtré sur célite. Le filtrat est évaporé pour donner une huile (115 mg, quant).

t_R = 6.87/6.91 min (diastéréoisomères)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.26 (m, 5 H), 7.09-6.99 (m, 2 H), 6.91-6.83 (m, 2 H), 5.17 (s, 2 H), 4.97-4.81 (m, 1 H), 4.59-4.47 (m, 1 H), 3.72-3.65 (m, 3 H), 2.66 -2.46 (m, 2 H), 1.93-1.79 (m, 2 H), 1.72-1.53 (m, 5 H), 1.47-1.35 (m, 9 H), 1.93-0.82 (m, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.3, 172.2, 172.0, 157.3, 155.9, 137.4, 134.4, 130.2, 129.5, 128.8, 128.1, 127.6, 115.0, 70.3, 56.6, 56.5, 54.6, 52.3, 38.1, 38.0, 34.8, 34.7, 28.5, 27.8, 25.2, 15.7, 15.6, 11.72.

166 Hydrochlorure de (2S,3R) 2-(2-amino-5-(4-(benzyloxy)phényl)pentanamido)-3-méthylpentanoate de méthyle

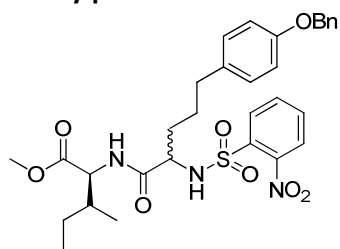


C₂₅H₃₄N₂O₄
MM 463,01
EP-VI-182

Une solution de (2S,3R)2-(5-(4-(benzyloxy)phényl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)pentanamido)-3-méthylpentanoate de méthyle (132.5 mg, 0.25 mmol, 1 eq) dans une solution de HCl 4N dans le dioxane (3 mL) est agitée 1h30 à TA. Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite (coévaporation avec heptane). Le résidu est séché sous vide pour la nuit. Le brut est utilisé tel quel pour la suite.

t_R = 4.58/4.66 min (diastéréoisomères)

167 (2S,3R) 2-(5-(4-(benzyloxy)phényl)-2-(2-nitrophénylsulfonamido)pentanamido)-3-méthylpentanoate de méthyle



C₃₁H₃₇N₃O₈S
MM 611,71
EP-VI-184

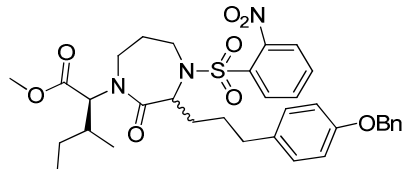
À une solution de hydrochlorure de (2S,3R) 2-(2-amino-5-(4-(benzyloxy)phényl)pentanamido)-3-méthylpentanoate de méthyle (125.7 mg, 0.26 mmol, 1 eq) dans le CH₂Cl₂ sont ajoutés la triéthylamine (25 µL, 0.37 mmol, 1.5 eq) et le chlorure de nosyle (55.7 mg, 0.26 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel est agité 3 h à TA et est dilué avec du CH₂Cl₂. La phase aqueuse est lavée avec une solution de HCl 1N, de NaHCO₃ saturé, de la saumure et est séchée sur Na₂SO₄. Le résidu est purifié par chromatographie flash en phase inverse pour obtenir une huile (107 mg, 70%).

t_R = 6.60-6.71 min (diastéréoisomères)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.06-7.99 (m, 1 H), 7.83-7.75 (m, 1 H), 7.67-7.60 (m, 2 H), 7.45-7.28 (m, 5 H), 6.96 (d, 1 H, *J* = 8.5 Hz), 6.91 (d, 1 H, *J* = 8.5 Hz), 6.02-5.95 (m, 1 H), 5.02 (d, 2 H, *J* = 2.1 Hz), 4.44-4.35 (m, 1 H), 3.98-3.85 (m, 1 H), 3.68 (d, 3 H, *J* = 8.9 Hz), 2.53-2.41 (m, 2 H), 1.89-1.62 (m, 3 H), 1.55-1.25 (m, 3 H), 1.17-0.97 (m, 1 H), 0.91-0.70 (m, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.2, 170.4, 157.3, 148.2, 137.4, 133.0, 131.1, 130.8, 129.5, 129.4, 128.8, 128.1, 127.7, 125.9, 115.0, 70.3, 58.1, 57.6, 56.8, 56.7, 52.4, 38.1, 37.9, 34.4, 34.2, 32.8, 32.4, 25.3, 15.6, 15.6, 11.8.

168 (2S,3R)-2-(3-(3-(4-(benzyloxy)phényl)propyl)-4-((2-nitrophényl)sulfonyl)-2-oxo-1,4-diazépan-1-yl)-3-méthylpentanoate de méthyle

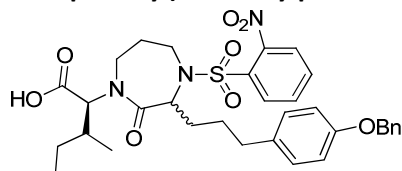


C₃₄H₄₁N₃O₈S
MM 651,77
EP-VI-187

À une solution (2S,3R) 2-(5-(4-(benzyloxy)phényl)-2-(2-nitrophénylsulfonamido)pentanamido)-3-méthylpentanoate de méthyle (107 mg, 0.17 mmol, 1 eq) dans le DMF anhydre sont ajoutés le 1,3-dibromopropane (36 µL, 0.35 mmol, 2 eq) et le carbonate de potassium (48 mg, 0.35 mmol, 2 eq). Le mélange réactionnel est agité 20 h à 65 °C dans un tube scellé et est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Le brut est utilisé tel quel pour la suite.

t_R = 7.18-7.31 min (diastéréoisomères)

169 Acide (2S,3R)-2-(3-(3-(4-(benzyloxy)phényl)propyl)-4-((2-nitrophényl)sulfonyl)-2-oxo-1,4-diazépan-1-yl)-3-méthylpentanoïque



C₃₃H₃₉N₃O₈S
MM 637,74
EP-VI-188

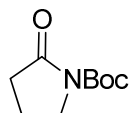
À une solution de (2S,3R)-2-(3-(3-(4-(benzyloxy)phényl)propyl)-4-((2-nitrophényl)sulfonyl)-2-oxo-1,4-diazépan-1-yl)-3-méthylpentanoate de méthyle (114 mg, 0.175 mmol, 1 eq) dans un mélange THF/H₂O (2/1, v/v) est ajouté l'hydroxyde de lithium (24 mg, 0.699 mmol, 4 eq). Le mélange réactionnel est agité 1h30 à TA. Une solution de HCl 1N est ajoutée au mélange réactionnel. La phase aqueuse est extraite à l'AcOEt. Le résidu est purifié par chromatographie flash en phase inverse pour obtenir une huile incolore (61 mg, 46%)

t_R = 6.53-6.71 min (diastéréoisomères)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 8.07-7.98 (m, 1 H), 7.74-7.60 (m, 3 H), 7.46-7.25 (m, 5 H), 6.99 (d, 2 H, J = 8.4 Hz), 6.86 (d, 2 H, J = 8.4 Hz), 5.88-5.74 (m, 1 H), 5.18-5.08 (m, 1 H), 5.03 (s, 3 H), 4.60-4.42 (m, 1 H), 4.31-4.17 (m, 2 H), 4.10-3.93 (m, 1 H), 2.57-2.37 (m, 2 H), 1.92-1.78 (m, 2 H), 1.76-1.61 (m, 1 H), 1.57-1.34 (m, 3 H), 1.31-1.09 (m, 2 H), 0.94-0.84 (m, 6 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ 174.5, 174.2, 172.7, 172.6, 172.3, 172.2, 158.5, 149.6, 149.5, 139.7, 136.6, 136.5, 135.6, 135.5, 134.3, 134.0, 133.3, 133.2, 132.1, 132.0, 130.5, 129.6, 128.9, 128.7, 125.5, 25.4, 118.7, 118.6, 116.0, 71.1, 61.2, 61.2, 61.0, 60.9, 58.4, 58.3, 58.2, 58.1, 38.7, 38.3, 35.4, 35.3, 30.7, 30.5, 29.3, 29.2, 26.4, 26.3, 16.3, 16.2, 12.0, 11.9.

177 2-oxopyrrolidine-1-carboxylate de *tert*-butyle



$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_3$
MM 185,22
EP-IV-176

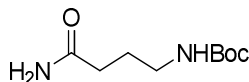
À une solution de 2-pyrrolidinone (500 μL , 6.57 mmol, 1 eq) dans l'acétonitrile anhydre (4 mL) et refroidi à 0 °C est ajouté au goutte à goutte le dicarbonate de di-*tert*-butyle (1.5 g, 7.23 mmol, 1.1 eq) dissous dans l'acétonitrile anhydre (2 mL) et la DMAP (80 mg, 0.65 mmol, 0.1 eq). Le mélange réactionnel est agité 2 h à TA puis est évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée avec une solution de HCl 1N, de la saumure, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite pour obtenir une huile incolore (783 mg, 64%).

Rf = 0.37 (AcOEt/Hept, 1/1, v/v)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.69 (t, 2 H, J = 7.6 Hz), 2.45 (t, 2 H, J = 7.6 Hz), 1.95 (t, 2 H, J = 7.6 Hz), 1.46 (s, 9 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 174.3, 150.2, 82.7, 46.5, 32.9, 28.0, 17.4.

178 (4-amino-4-oxobutyl)carbamate de *tert*-butyle



$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$
MM 202,25
EP-IV-177

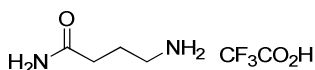
Une solution du 2-oxopyrrolidine-1-carboxylate de *tert*-butyle (720 mg, 3.88 mmol, 1 eq) dans de l'acétate d'ammonium concentré est agitée à 40 °C pendant 5 min puis à TA pendant 15 min. Un précipité blanc apparaît. La phase aqueuse est extraite au CH_2Cl_2 (2 \times). Les phases organiques sont combinées, lavées à la saumure, séchées sur Na_2SO_4 et évaporées sous pression réduite pour obtenir un solide blanc (534 mg, 68%).

Rf = 0.23 (CH_2Cl_2 /MeOH, 9/1, v/v)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.69 (t, 2 H, J = 7.3Hz), 2.45 (t, 2 H, J = 7.3Hz), 1.95 (t, 2 H, J = 7.3Hz), 1.46 (s, 9 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 174.2, 150.1, 82.6, 46.4, 32.9, 28.0, 17.4.

179 Trifluoroacétate de 4-aminobutanamide



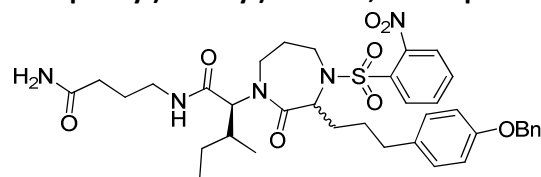
$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$
MM 216,16
EP-IV-178

Une solution de (4-amino-4-oxobutyl)carbamate de *tert*-butyle (461 mg, 2.28 mmol, 1 eq) dans un mélange TFA/ CH_2Cl_2 (1/1, v/v) est agitée 30 min à TA, évaporée sous pression réduite et lyophilisée pour obtenir une huile (403 mg, quant).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 2.97 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 2.37 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 1.92 (t, 2 H, J = 7.3 Hz).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ 177.3, 40.4, 33.1, 24.3.

180 (2S,3R)-N-(4-amino-4-oxobutyl)-2-(3-(3-(4-(benzyloxy)phényl)propyl)-4-((2-nitrophényl)sulfonyl)-2-oxo-1,4-diazépan-1-yl)-3-méthylpentanamide



C₃₇H₄₇N₅O₈S

MM 721,86

EP-VI-189

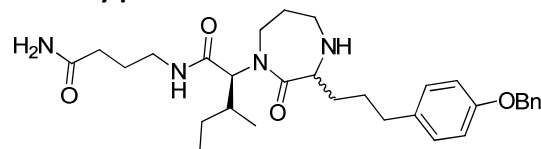
À une solution l'acide (2S,3R)-2-(3-(3-(4-(benzyloxy)phényl)propyl)-4-((2-nitrophényl)sulfonyl)-2-oxo-1,4-diazépan-1-yl)-3-méthylpentanoïque (61 mg, 0.081 mmol, 1 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre sont ajoutés l'EDCI (16 mg, 0.097 mmol, 1.2 eq), l'HOBt (14 mg, 0.097 mmol, 1.2 eq) et la triéthylamine (22 µL, 0.162 mmol, 2.2 eq). Le mélange réactionnel est agité 5 min à TA puis le trifluoroacétate de 4-aminobutanamide (21.05 mg, 0.097 mmol, 1.2 eq) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA. La phase organique est diluée et est lavée avec une solution de HCl 1N, de NaHCO₃ saturée, de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash en phase inverse, une huile incolore est obtenue (31 mg, 53%).

t_R = 5.83-6.01 min (diastéréoisomères)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.13-7.99 (m, 1 H), 7.75-7.63 (m, 3 H), 7.47-7.25 (m, 5 H), 7.02-6.93 (m, 2 H), 6.90-6.83 (m, 2 H), 5.87-5.69 (m, 1 H), 5.18-4.95 (m, 4 H), 4.58-4.14 (m, 1 H), 4.30-3.91 (m, 3 H), 3.25-3.15 (m, 2 H), 2.57-2.35 (m, 2 H), 2.27-2.16 (m, 2 H), 1.92-1.63 (m, 5 H), 1.60-1.23 (m, 3 H), 1.22-1.03 (m, 1 H), 0.96-0.81 (m, 6 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 178.5, 173.7, 172.5, 158.6, 149.5, 139.1, 136.4, 136.2, 135.6, 135.5, 133.4, 133.2, 132.4, 132.3, 130.5, 129.6, 128.9, 128.7, 125.6, 119.0, 118.8, 118.7, 116.0, 71.1, 60.9, 40.0, 39.9, 38.7, 38.6, 35.4, 35.4, 33.8, 30.8, 30.7, 30.3, 30.0, 29.4, 29.2, 27.5, 26.7, 26.6, 26.1, 26.0, 16.2, 16.1, 15.2, 15.1, 12.2, 12.1, 11.5.

181 (2S,3R)-N-(4-amino-4-oxobutyl)-2-(3-(3-(4-(benzyloxy)phényl)propyl)-2-oxo-1,4-diazépan-1-yl)-3-méthylpentanamide



C₃₁H₄₄N₄O₄

MM 536,71

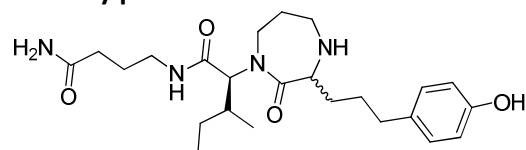
EP-VI-190

À une solution de (2S,3R)-N-(4-amino-4-oxobutyl)-2-(3-(3-(4-(benzyloxy)phényl)propyl)-4-((2-nitrophényl)sulfonyl)-2-oxo-1,4-diazépan-1-yl)-3-méthylpentanamide (31 mg, 0.043 mmol, 1 eq) dans le DMF anhydre (2 mL) sont ajoutés le thiophénol (9 µL, 0.085 mmol, 2 eq) et le carbonate de potassium (12 mg, 0.085 mmol, 2 eq). Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA. Le résidu est directement purifié par HPLC semi préparative pour obtenir une huile incolore (15.5 mg, 67%).

t_R = 3.86-4.18 min (diastéréoisomères)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.64-8.41 (m, 1 H), 7.44-7.25 (m, 5 H), 7.14-7.02 (m, 2 H), 6.93-6.84 (m, 2 H), 5.95-5.80 (m, 1 H), 5.58-5.42 (m, 2 H), 5.06-5.00 (m, 2 H), 4.92-4.81 (m, 1 H), 4.36-4.29 (m, 2 H), 4.22-4.09 (m, 1 H), 3.98-3.84 (m, 1 H), 3.60-3.49 (m, 2 H), 3.26-3.16 (m, 2 H), 2.65-2.52 (m, 2 H), 2.29-2.17 (m, 2 H), 1.92-1.72 (m, 5 H), 1.70-1.57 (m, 2 H), 1.52-1.31 (m, 1 H), 1.26-1.10 (m, 1 H), 0.99-0.83 (m, 6 H).

116 (2S,3R)-N-(4-amino-4-oxobutyl)-2-(3-(3-(4-hydroxyphényl)propyl)-2-oxo-1,4-diazépan-1-yl)-3-méthylpentanamide



C₂₄H₃₈N₄O₄

MM 446,58

EP-VI-191

Une solution de (2S,3R)-N-(4-amino-4-oxobutyl)-2-(3-(3-(4-(benzyloxy)phényl)propyl)-2-oxo-1,4-diazépan-1-yl)-3-méthylpentanamide (6.8 mg, 0.0126 mmol, 1 eq) dans 300 µL d'un mélange 1M de

thioanisole et de TMSOTf dans le TFA est agitée 30 min à 0 °C. Le brut est dissous avec ACN/H₂O et est directement purifié par HPLC semi préparative pour obtenir les deux diastéréoisomères séparés.

Diastéréoisomère 1 :

m = 0.5 mg

t_R = 2.53 min

HRMS (EI) calc 447.2865 pour C₂₄H₃₈N₄O₄, trouvé 447.2952

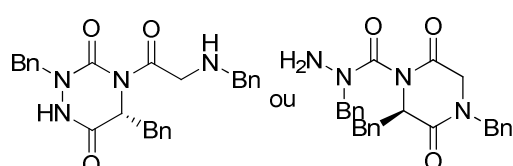
Diastéréoisomère 1 :

m = 1.2 mg

t_R = 2.79 min

HRMS (EI) calc 447.2865 pour C₂₄H₃₈N₄O₄, trouvé 447.2961

188 (R)-2,5-dibenzyl-4-(2-(benzylamino)acetyl)-1,2,4-triazinane-3,6-dione ou (R)-N,2,4-tribenzyl-3,6-dioxopiperazine-1-carbohydrazide



C₂₆H₂₆N₄O₃
MM 442,51
EP-IV-115

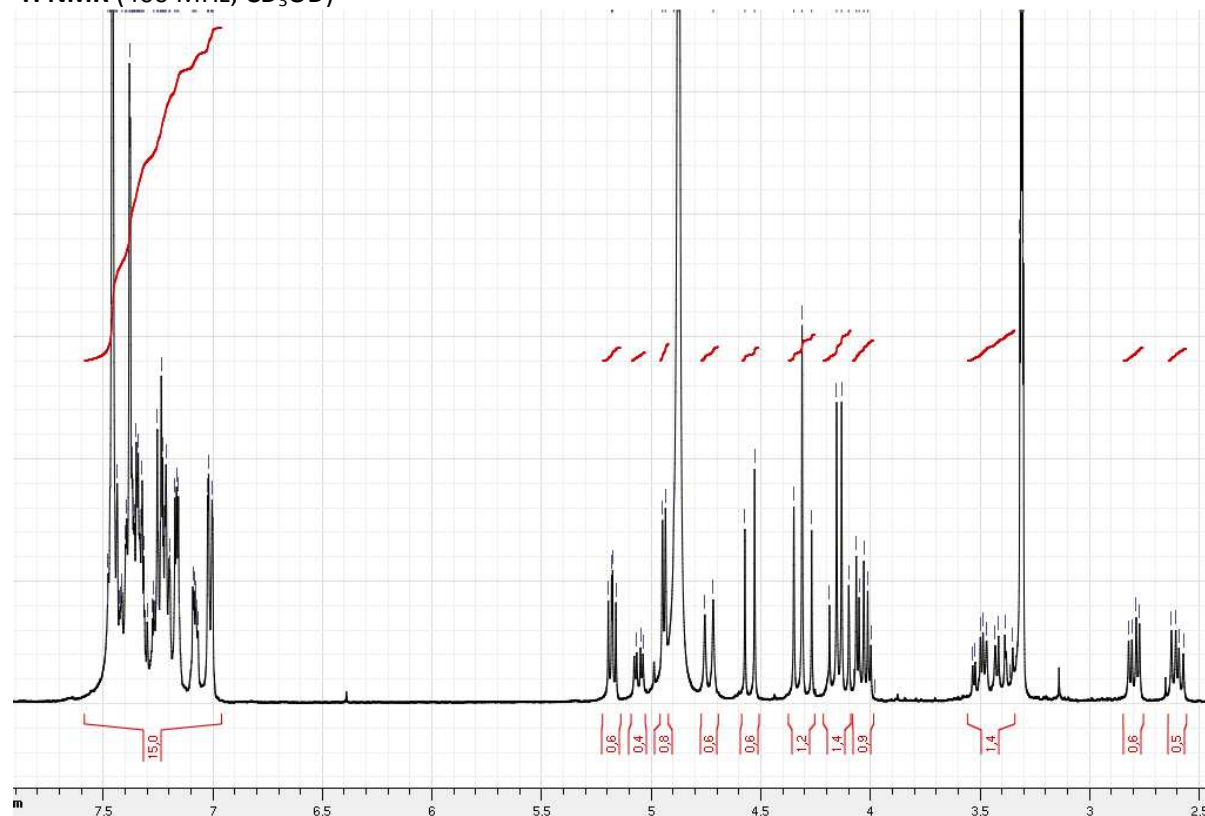
Protocoles **H, M, H, J, K, L**

La résine est agitée 2 h dans un mélange TFA/H₂O (95/5, v/v), filtrée et lavée avec (TFA/H₂O, 95/5, v/v) et CH₂Cl₂. Le filtrat est évaporé et lyophilisé. Après purification par HPLC semi-préparative, une huile incolore est obtenue (10.5 mg, 12%).

n = 0.198 mmol

t_R = 3.68 min

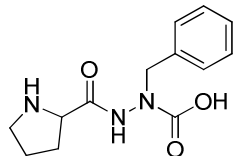
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)



¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 171.5, 168.0, 154.8, 150.0, 140.7, 138.0, 137.6, 136.4, 136.0, 132.2, 131.8, 131.3, 131.0, 130.8, 130.5, 130.2, 130.1, 129.9, 129.8, 129.2, 129.1, 128.6, 128.5, 59.2, 57.5, 52.6, 52.3, 52.2, 51.3, 50.2, 42.1, 37.5, 36.3.

MS (ES+) m/z 443.2 ([M+H]⁺)

194b Acide 1-benzyl-2-(pyrrolidine-2-carbonyl)hydrazinecarboxylique



C₁₃H₁₇N₃O₃

MM 263,29

EP-II-22

Protocoles H, M, H, J, K, L

La résine est agitée 2 h dans un mélange TFA/H₂O (95/5, v/v), filtrée et lavée avec (TFA/H₂O, 95/5, v/v) et CH₂Cl₂. Le filtrat est évaporé et lyophilisé. Après purification par HPLC semi-préparative, un solide blanc est obtenu (10 mg, 60%).

n = 0.064 mmol

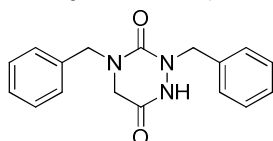
t_R = 5.12 min

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.84 (d, 1 H, *J* = 8 Hz), 7.26 (m, 5 H), 4.13 (dd, 1 H, *J* = 8.7, 6.5 Hz), 3.17 (m, 3 H), 2.92 (dd, 1 H, *J* = 14, 9.7 Hz), 2.28 (m, 1 H), 1.84 (m, 3 H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.2, 168.2, 137.3, 129.0, 128.2, 126.6, 58.7, 53.9, 40.1, 36.3, 29.4, 23.3.

MS (ES+) m/z 264.2 ([M+H]⁺)

195b/215 2,4-dibenzyl-1,2,4-triazinane-3,6-dione



C₁₇H₁₇N₃O₂

MM 295,34

EP-II-19

Protocoles H, M, H, J, K, Q

La résine est agitée 2 h dans un mélange TFA/H₂O (95/5, v/v), filtrée et lavée avec (TFA/H₂O, 95/5, v/v) et CH₂Cl₂. Le filtrat est évaporé et lyophilisé. Après purification par HPLC semi-préparative, un solide blanc est obtenu (5.5 mg, 30 %).

n = 0.064 mmol

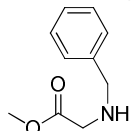
t_R = 3.53 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.32 (m, 9 H), 4.73 (s, 2 H), 4.51 (s, 2 H), 3.62 (s, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 163.9, 154.8, 135.6, 134.8, 129.3, 129.1, 128.8, 128.8, 128.6, 128.3, 52.1, 51.2, 48.6.

MS (ES+) m/z 296.2 ([M+H]⁺)

196 2-(benzylamino)acétate de méthyle



C₁₀H₁₃NO₂

MM 179,22

EP-III-21

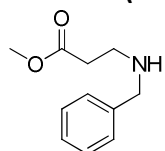
Protocole A

Huile incolore (146 mg, 77%)

R_f = 0.16 (AcOEt/Heptane, 3/7, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.37-7.33 (m, 4 H), 7.30-7.25 (m, 1 H), 3.82 (s, 2 H), 3.74 (s, 3 H), 3.44 (s, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 173.0, 139.6, 128.6, 128.4, 127.3, 53.4, 51.9, 50.0.

197 3-(benzylamino)propanoate de méthyle

C₁₁H₁₅NO₂
MM 193,24
EP-III-47

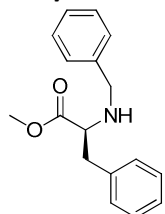
Protocole A

Huile incolore (323 mg, 37%)

t_R = 3.31 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.26 (d, 4 H, *J* = 4.3 Hz), 7.19 (s, 1 H), 3.75 (s, 2 H), 3.61 (s, 3 H), 2.85 (t, 2 H, *J* = 6.9 Hz), 2.49 (t, 2 H, *J* = 6.2 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.1, 139.5, 128.5, 128.2, 127.2, 53.6, 51.6, 44.3, 34.3.

120/198 (S) 2-(benzylamino)-3-phénylpropanoate de méthyle

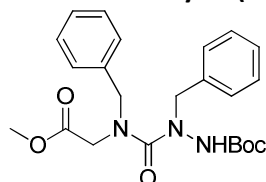
C₁₇H₁₉NO₂
MM 269,34
EP-II-190

Protocole A

Huile incolore (170 mg, 68%)

R_f = 0.59 (AcOEt/Heptane, 3/7, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.39-7.09 (m, 10 H), 3.84 (d, 1 H, *J* = 12.7 Hz), 3.74-6.62 (m, 4 H), 3.57 (t, 1 H, *J* = 6.9 Hz), 2.99 (d, 2 H, *J* = 6.7 Hz).

199 2-benzyl-2-(benzyl(2-méthoxy-2-oxoéthyl)carbamoyl)hydrazinecarboxylate de tert-butyle

C₂₃H₂₉N₃O₅
MM 427,49
EP-III-31

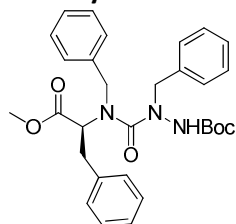
Protocole B

Huile incolore (172 mg, 73%)

R_f = 0.58 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39-7.26 (m, 10 H), 4.65 (sl, 2 H), 3.89 (s, 2 H), 3.73 (s, 3 H), 1.59 (s, 2 H), 1.38 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 158.0, 154.4, 154.3, 129.7, 128.9, 128.8, 128.1, 127.8, 53.1, 52.2, 49.0, 28.3.

125/201 (S) 2-benzyl-2-(benzyl(1-méthoxy-1-oxo-3-phénylpropan-2-yl)carbamoyl)hydrazine carboxylate de tert-butyle

C₃₀H₃₅N₃O₅
MM 517,62
EP-III-34

Protocole B

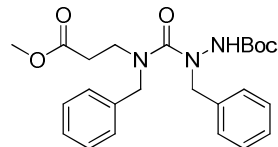
Huile incolore (248 mg, 30%)

t_R = 6.77 min

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.42-6.90 (m, 10 H), 5.86 (sl, 1 H), 4.87 (sl, 1 H), 4.54 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz), 4.44-4.30 (m, 1 H), 3.98 (sl, 1 H), 3.74 (s, 3 H), 3.46-3.27 (m, 2 H), 1.25 (s, 9 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 173.5, 153.3, 152.4, 136.5, 134.4, 129.3, 128.9, 128.7, 128.5, 127.7, 126.9, 61.6, 54.7, 51.9, 51.6, 38.9, 28.0.

200 2-benzyl-2-(benzyl(3-méthoxy-3-oxopropyl)carbamoyl)hydrazinecarboxylate de tert-butyle



$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5$

MM 441,52

EP-III-58

Protocole B

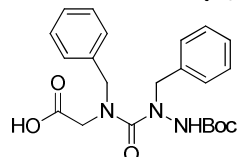
Huile incolore (273 mg, 46%)

Rf = 0.63 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.39-7.19 (m, 10 H), 6.10 (sl, 1 H), 4.53 (s, 2 H), 3.63 (s, 3 H), 3.53 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz), 2.63 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz), 1.37 (s, 9 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 160.2, 155.8, 137.6, 136.1, 129.2, 128.7, 128.6, 127.8, 127.7, 52.6, 51.7, 44.3, 32.7, 28.1.

202 Acide 2-(N,1-dibenzyl-2-(tert-butoxycarbonyl)hydrazinecarboxamido)acétique



$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5$

MM 413,47

EP-III-36

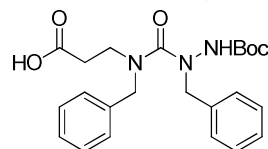
Protocole C

Huile incolore (124 mg, quant)

Rf = 0.2 (AcOEt/Heptane+ 1 goutte AcOH, 1/1, v/v)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.34-7.21 (m, 10 H), 4.95-4.18 (m, 4 H), 3.99-3.57 (m, 2 H), 1.24 (s, 9 H).

203 Acide 3-(N,1-dibenzyl-2-(tert-butoxycarbonyl)hydrazinecarboxamido)propanoïque



$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5$

MM 427,49

EP-III-61

Protocole C

Huile incolore (248 mg, quant)

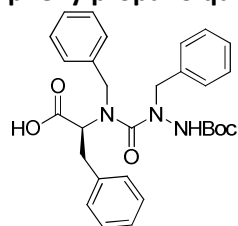
Rf = 0.12 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.37-7.20 (m, 10 H), 4.51 (sl, 3 H), 3.48 (sl, 2 H), 2.62 (sl, 2 H), 2.12-2.00 (m, 1 H), 1.36 (s, 9 H)

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ 176.0, 162.7, 154.5, 137.3, 135.9, 129.2, 128.6, 127.8, 127.3, 52.4, 44.3, 32.7, 28.1, 14.2.

204 Acide phénylpropanoïque

(S)-2-(N,1-dibenzyl-2-(tert-butoxycarbonyl)hydrazinecarboxamido)-3-



$\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5$

MM 503,59

EP-III-79

Protocole C

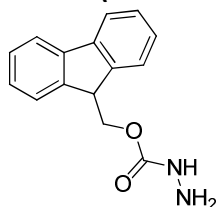
Huile incolore (72 mg, 85%)

Rf = 0.24 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.37-6.74 (m, 15 H), 5.53 (sl, 1 H), 4.77 (sl, 1 H), 4.35 (d, 1 H, $J = 16.1$ Hz), 4.07 (d, 1 H, $J = 16.8$ Hz), 3.83 (s, 1 H), 3.24 (s, 2 H), 1.14 (s, 9 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 173.5, 164.1, 153.8, 137.6, 135.9, 135.1, 130.0, 129.5, 128.9, 128.7, 128.4, 127.6, 127.1, 81.9, 64.6, 55.0, 35.2, 29.9, 20.1.

210 (9H-fluoren-9-yl)méthyl hydrazinecarboxylate



$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$

MM 254,28

EP-III-63

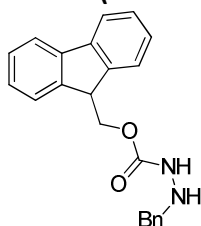
À une solution d'hydrazine monohydrate (725 μL , 15.4 mmol, 5 eq) dans un mélange acétonitrile/ H_2O (12 mL, 1/1, v/v) et refroidi à 0 °C est ajouté au goutte à goutte pendant 2 h le 9-fluorométhylchloroformate (800 mg, 3.09 mmol, 1 eq) dans l'acétonitrile (48 mL). Le mélange réactionnel est ramené à TA, agité une nuit à TA puis concentré jusqu'à 10 mL. Le précipité est filtré et rincé avec de l'eau puis de l'heptane pour obtenir un solide blanc (729 mg, 94%).

Rf = 0.25 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7.73 (d, 2 H, $J = 7.6$ Hz), 7.58 (d, 2 H, $J = 7.6$ Hz), 7.36 (t, 2 H, $J = 7.5$ Hz), 7.28 (t, 2 H, $J = 7.5$ Hz), 4.40 (d, 2 H, $J = 6.6$ Hz), 4.19 (t, 1 H, $J = 6.6$ Hz).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ 144.3, 141.9, 128.2, 127.6, 125.5, 120.5, 67.8, 47.7.

211 (9H-fluoren-9-yl)méthyl 2-benzylhydrazinecarboxylate



$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$

MM 344,41

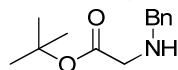
EP-II-94

À une solution de (9H-fluoren-9-yl)méthyl 2-benzylhydrazinecarboxylate (733 mg, 2.12 mmol, 1 eq) dans l'éthanol anhydre (12 mL) est ajouté le benzaldéhyde (216 μL , 2.12 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel est agité 2 h à reflux puis évaporé sous pression réduite. Le brut est repris dans un mélange DMF/MeOH (12 mL, 1/3, v/v) et le cyanoborohydrure de sodium est ajouté par portion (322 mg, 5.108 mmol, 2.4 eq). Le milieu réactionnel est acidifié jusqu'à $\text{pH} > 4$ avec une solution de HCl 2N. Le mélange réactionnel est agité 1 h à TA puis est acidifié jusqu'à $\text{pH} > 1$ avec une solution de HCl 2N et agité 10 min. Le mélange réactionnel est alors basifié jusqu'à $\text{pH} = 7$ avec une solution saturée de NaHCO_3 . Le brut est évaporé à sec sous pression réduite et repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée avec de l'eau, de la saumure, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice, un solide blanc est obtenu (600 mg, 81%).

Rf = 0.57 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.75 (d, 2 H, $J = 7.4$ Hz), 7.54 (d, 2 H, $J = 7.3$ Hz), 7.39 (t, 2 H, $J = 7.4$ Hz), 7.22-7.35 (m, 7 H), 4.44 (s, 2 H), 4.20 (t, 1 H, $J = 6.4$ Hz), 4.01 (s, 2 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 157.0, 143.6, 141.9, 136.9, 129.1, 128.6, 127.8, 128.75, 127.1, 125.0, 120.0, 67.1, 55.7, 47.2.

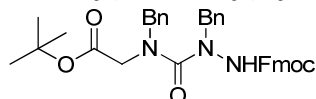
212 2-(benzylamino)acétate de *tert*-butyle

C₁₃H₁₉NO₂
MM 221,30
EP-III-59

A une solution d'ester de *tert*-butyle de glycine (300 mg, 1.789 mmol, 1 eq) dissous dans le MeOH anhydre (4 mL) sont ajoutés la triéthylamine (249 µL, 1.789 mmol, 1 eq) et le Na₂SO₄ (340 mg). Le mélange réactionnel est agité 15 min à TA puis le benzaldéhyde (182 µL, 1.789 mmol, 1 eq) est rajouté. Le milieu réactionnel est agité une nuit à TA puis refroidi à 0 °C et le NaBH₄ (136 mg, 3.579 mmol, 2 eq) est ajouté par portions. Le mélange réactionnel est agité 1 h à 0 °C, 1 h à TA et le milieu réactionnel est neutralisé avec 4 mL de NaOH. La phase aqueuse est extraite à l'éther. Les phases étherées sont rassemblées, lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice, une huile est obtenue (195.7 mg, 49%).

R_f = 0.64 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.34 (d, 3 H, J = 4.4 Hz), 7.24-7.32 (m, 2 H), 3.82 (s, 2 H), 3.32 (s, 2 H), 1.48 (s, 9 H).

213 (9H-fluoren-9-yl)méthyl 2-benzyl-2-(benzyl(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoéthyl)carbamoyl)hydrazinecarboxylate

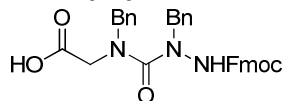
C₃₆H₃₇N₃O₅
MM 591,70
EP-III-66

À une solution de (9H-fluoren-9-yl)méthyl 2-benzylhydrazinecarboxylate (456 mg, 1.33 mmol, 1.5 eq) dissous dans le CH₂Cl₂ anhydre (13 mL) est ajoutée une solution de 20% de phosgène dans le toluène (1.38 ml, 2.65 mmol, 3 eq). Le mélange réactionnel est agité 20 min, évaporé sous pression réduite et repris du CH₂Cl₂ anhydre (4 mL) et la DIEA (521 µL, 2.65 mmol, 3 eq). Cette solution est ajoutée à une solution de 2-(benzylamino)acétate de *tert*-butyle (195 mg, 0.88 mmol, 1 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre (4 mL). Le mélange réactionnel est agité 90 min à TA et est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée avec une solution de KHSO₄ 1M, une solution de NaHCO₃ saturée, de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice, une huile incolore est obtenue (490 mg, 94%).

t_R = 7.31 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, 2 H, J = 8 Hz), 7.58 (d, 2 H, J = 7.5 Hz), 7.41 (t, 2 H, J = 7.1 Hz), 7.34-7.28 (m, 12 H), 4.74 (s, 4 H), 4.47 (s, 2 H), 4.44 (s, 2 H), 4.37-4.29 (m, 2 H), 1.26 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 155.1, 151.5, 142.7, 141.5, 135.1, 129.0, 128.5, 128.4, 127.4, 125.4, 120.4, 73.1, 49.7, 46.6, 22.9, 14.3.

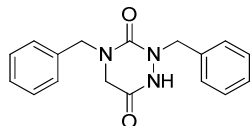
214 Acide 2-(2-(((9H-fluoren-9-yl)méthoxy)carbonyl)-N,1-dibenzylhydrazinecarboxamido)acétique

C₃₂H₂₉N₃O₅
MM 535,59
EP-III-67

Une solution de (9H-fluoren-9-yl)méthyl 2-benzyl-2-(benzyl(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoéthyl)carbamoyl)hydrazinecarboxylate (456 mg, 0.828 mmol, 1 eq) dissous dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (1/1, v/v) est agitée 1 h à TA puis évaporée sous pression réduite et lyophilisée pour obtenir une poudre (440 mg, quant).

t_R = 5.97 min

MS (ES⁺) m/z 558.2 ([M+Na]⁺)

215/195b 2,4-dibenzyl-1,2,4-triazinane-3,6-dione

C₁₇H₁₇N₃O₂
MM 295,34
EP-III-74

Protocoles **H, M, H, J, K, Q**

La résine est agitée 2 h dans un mélange TFA/H₂O (95/5, v/v), filtrée et lavée avec (TFA/H₂O, 95/5, v/v) et CH₂Cl₂. Le filtrat est évaporé et lyophilisé. Après purification par HPLC semi-préparative, un solide blanc est obtenu (6 mg, 22 %).

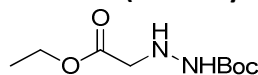
n = 0.06 mmol

t_R = 3.53 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.32 (m, 9 H), 4.73 (s, 2 H), 4.51 (s, 2 H), 3.62 (s, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 163.9, 154.8, 135.6, 134.8, 129.3, 129.1, 128.8, 128.8, 128.6, 128.3, 52.1, 51.2, 48.6.

MS (ES+) m/z 296.2 ([M+H]⁺)

216 2-(2-éthoxy-2-oxoéthyl)hydrazinecarboxylate de tert-butyle

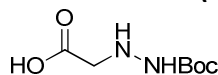
C₉H₁₈N₂O₄
MM 218,25
EP-V-92

Une solution de carbazate *tert*-butyle (3.55 g, 26.89 mmol, 3 eq) et de éthylbromoacétate (994 μL, 8.96 mmol, 1 eq) dans l'eau (15 mL) est agitée 2 h à TA. La phase aqueuse est extraite avec l'AcOEt. Les phases aqueuse sont combinées, lavées à la saumure, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice, une huile est obtenue (1.45 g, 74%).

R_f = 0.37 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.16 (q, 2 H, *J* = 7.2 Hz), 3.60 (s, 2 H), 1.41 (s, 9 H), 1.24 (t, 3 H, *J* = 7.2 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.3, 156.4, 80.8, 61.1, 53.0, 28.5, 14.3.

217 Acide 2-(2-(*tert*-butoxycarbonyl)hydrazinyl)acétique

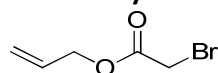
C₇H₁₄N₂O₄
MM 190,20
EP-V-87

Une solution de 2-(2-éthoxy-2-oxoéthyl)hydrazinecarboxylate de *tert*-butyle (852 mg, 3.90 mmol, 1 eq) et d'hydroxyde de lithium (934 mg, 39.04 mmol, 10 eq) dans un mélange eau/dioxane (1/2, v/v, 18 mL) est agitée à 40 °C pendant 1 h. Le mélange réactionnel est acidifié jusqu'à pH < 4 avec une solution d'acide citrique 1M. La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂. Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir un solide blanc (530 mg, 71%).

P_f = 140-141 °C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 3.37 (s, 2 H), 1.24 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 173.6, 147.4, 87.5, 52.9, 28.6.

218 allyl 2-bromoacétate

C₅H₇BrO₂
MM 179,01
EP-V-159

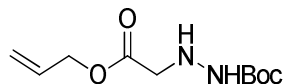
À une solution de bromoacétyl bromide (393 μL, 4.50 mmol, 1 eq) dans le CH₂Cl₂ anhydre (6 mL) et refroidi à 0 °C sont ajoutés successivement la pyridine (401 μL, 4.96 mmol, 1.1 eq) et l'alcool allylique (338 μL, 4.96 mmol, 1.1 eq). Le mélange réactionnel est agité 10 min à 0 °C et une nuit à TA et évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, une huile est obtenue (315 mg, 40%).

Rf = 0.82 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.89 (ddt, 1 H, J = 17.2, 10.4, 5.7 Hz), 5.34 (dq, 1 H, J = 17.2, 1.6 Hz), 5.25 (dd, 1 H, J = 10.4, 1.6 Hz), 4.63 (dt, 2 H, J = 5.7, 1.6 Hz), 3.84 (s, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.9, 131.3, 119.1, 66.7, 25.8.

219 2-(2-(allyloxy)-2-oxoéthyl)hydrazinecarboxylate de tert-butyle



C₁₀H₁₈N₂O₄

MM 230,26

EP-V-185

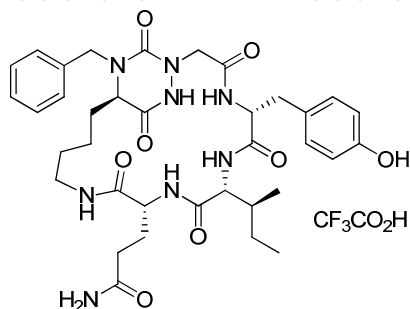
À une solution d'allyl 2-bromoacétate (1.8 mg, 10.06 mmol, 1 eq) dans la DIEA (8.3 mL) est ajouté le tert-butyl carbazate (1.32 mg, 10.06 mmol, 1 eq). Le mélange réactionnel est agité 1 nuit à TA et évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'AcOEt. La phase organique est lavée à l'eau, à la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie flash sur colonne de gel de silice, une huile est obtenue (1.83 mg, 79%).

Rf = 0.57 (AcOEt/Heptane, 1/1, v/v)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.84 (ddt, 1 H, J = 17.2, 10.4, 5.8 Hz), 5.24 (1 H, J = 17.2, 1.6 Hz), 5.17 (dd, 1 H, J = 10.3, 1.5 Hz), 4.56 (dd, 2 H, J = 5.9, 1.6 Hz), 3.61 (s, 2 H), 1.37 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.9, 156.3, 131.8, 118.8, 80.7, 65.6, 52.8, 28.4.

228 Trifluoroacétate de 3-((5R,8R,11R,18R)-19-benzyl-8-((S)-sec-butyl)-5-(4-hydroxybenzyl)-3,6,9,12,20,22-hexaoxo-1,4,7,10,13,19,21-heptaazabicyclo[16.2.2]docosan-11-yl)propanamide



C₃₆H₄₈N₈O₈

MM 834.84

EP-V-152/188

Protocoles H, J, K, L, H, M, H, M, H, M, H, N, O.

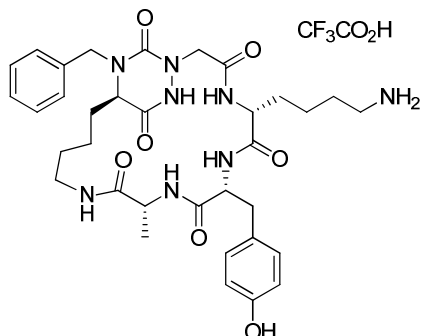
La résine est agitée 2 h dans un mélange TFA/H₂O (95/5, v/v), filtrée et lavée avec (TFA/H₂O, 95/5, v/v) et CH₂Cl₂. Le filtrat est évaporé et lyophilisé. Après purification par HPLC semi-préparative, un solide blanc est obtenu (1 mg, 2%).

n = 0.07 mmol

t_R = 3.31 min

HRMS (EI) calc pour C₃₆H₄₈N₈O₈: 721.3667, trouvé: 721.3672.

229 Trifluoroacétate d'allyl (4-((5R,8R,11R,18R)-19-benzyl-8-(4-hydroxybenzyl)-11-méthyl-3,6,9,12,20,22-hexaoxo-1,4,7,10,13,19,21-heptaazabicyclo[16.2.2]docosan-5-yl)butyl)carbamate



C₃₄H₄₆N₈O₇·C₂HF₃O₂

MM 792,80

EP-V-150

Protocoles H, J, K, L, H, M, H, M, H, M, H, N, O.

La résine est agitée 2 h dans un mélange TFA/H₂O (95/5, v/v), filtrée et lavée avec (TFA/H₂O, 95/5,

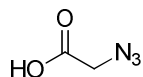
v/v) et CH₂Cl₂. Le filtrat est évaporé et lyophilisé. Après purification par HPLC semi-préparative, un solide blanc est obtenu (2 mg, 4%).

n = 0.07 mmol

t_R = 2.80 min

HRMS (EI) calc pour C₃₄H₄₆N₈O₇: 679.3562, trouvé 679.3578.

237 acide 2-azidoacétique



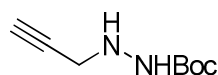
C₂H₃N₃O₂
MM 101,06
EP-VI-40

À une solution d'acide bromoacétique (416 mg, 3 mmol, 1 eq) dans l'eau (4 mL) et à 0 °C est ajouté l'azoture de sodium (390 mg, 6 mmol, 2 eq). Le mélange réactionnel est agité 15 min à 0 °C, une nuit à TA et dilué avec de l'eau. La phase aqueuse acidifiée jusqu'à pH = 5 avec une solution d'acide citrique 10% et est extraite avec de l'AcOEt. Les phases organiques sont assemblées, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées sous pression réduite pour obtenir une huile incolore (226 mg, 87%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.4 (sl, 1 H), 3.96 (s, 2 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 174.5, 50.23.

238 2-(prop-2-yn-1-yl)hydrazinecarboxylate de *tert*-butyle



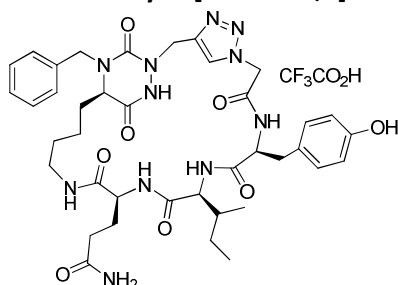
C₈H₁₄N₂O₂
MM 170,21
EP-VI-43

A une solution de carbamate de *tert*-butyle (10 g, 75.67 mmol, 1 eq) et de carbonate de potassium (3.4 g, 24.97 mmol, 0.33 eq) dans un mélange THF/DMF (120 mL, 9/1, v/v) est ajouté le 3-bromopropyne (2.7 mL, 27.97 mmol, 0.33 eq) dissous dans un mélange THF/DMF (8.5 mL, 9/1, v/v) pendant 1h30. Le mélange réactionnel est agité une nuit à TA et est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans du CH₂Cl₂ et lavé à l'eau. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, une huile incolore est obtenue (1.1 g, 27%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.96 (s, 1 H), 3.57 (s, 2 H), 2.19 (s, 1 H), 1.4 (s, 9 H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 156.5, 81.0, 80.0, 72.5, 41.3, 28.4.

246 Trifluoroacétate de 3-((10*S*,13*S*,16*S*,23*R*)-24-benzyl-13-((*R*)-*sec*-butyl)-10-(4-hydroxybenzyl)-8,11,14,17,25,27-héxaoxo-1,4,5,6,9,12,15,18,24,26-decaazatricyclo[21.2.2.13,6]octacos-3(28),4-dien-16-yl)propanamide



C₃₉H₅₁N₁₁O₈.C₂HF₃O₂
MM 915.91
EP-VI-36

Protocoles H, J, K, L, H, M, H, M, H, M, H, M, P.

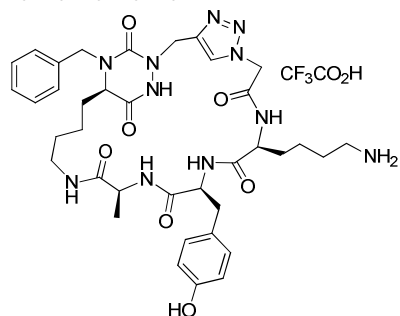
La résine est agitée 2 h dans un mélange TFA/H₂O (95/5, v/v), filtrée et lavée avec (TFA/H₂O, 95/5, v/v) et CH₂Cl₂. Le filtrat est évaporé et lyophilisé. Après purification par HPLC semi-préparative, un solide blanc est obtenu (1.3 mg, 4%).

n = 0.06 mmol

t_R = 3.24 min

HRMS (EI) calc pour C₃₉H₅₁N₁₁O₈: 802.3994, trouvé 802.4022.

247 Trifluoroacétate de (10S,13S,16S,23R)-10-(4-aminobutyl)-24-benzyl-13-(4-hydroxybenzyl)-16-méthyl-1,4,5,6,9,12,15,18,24,26-decaazatricyclo[21.2.2.13,6]octacos-3(28),4-diene-8,11,14,17,25,27-héxaone



$C_{37}H_{49}N_{11}O_7$

MM 873,88

EP-VI-38

Protocoles **H, J, K, L, H, M, H, M, H, M, H, M, P.**

La résine est agitée 2 h dans un mélange TFA/H₂O (95/5, v/v), filtrée et lavée avec (TFA/H₂O, 95/5, v/v) et CH₂Cl₂. Le filtrat est évaporé et lyophilisé. Après purification par HPLC semi-préparative, un solide blanc est obtenu (0.8 mg, 3%).

$n = 0.06$ mmol

$t_R = 2.72$ min

HRMS (EI) calc pour $C_{37}H_{49}N_{11}O_7$: 760.3889, trouvé: 760.3885.

Bibliographie

- (1) Drews, J. Paul Ehrlich: Magister Mundi. *Nat. Rev. Drug discovery* **2004**, *3*, 797–801.
- (2) Hill, S. J. G-protein-coupled Receptors: Past, Present and Future. *Brit. J. Pharmacol.* **2006**, *147 Suppl*, S27–37.
- (3) Lefkowitz, R. J.; Roth, J.; Pastan, I. Radioreceptor Assay of Adrenocorticotrophic Hormone: New Approach to Assay of Polypeptide Hormones in Plasma. *Science* **1970**, *170*, 633–5.
- (4) Marinissen, M. J.; Gutkind, J. S. G-protein-coupled Receptors and Signaling Networks: Emerging Paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 368–76.
- (5) Hibert, F.; Trumpp-Kallmeyer, S.; Bruinvels, A.; Hoflack, J. Three-Dimensional Models of Neurotransmitter G-Binding Protein-Coupled Receptors. *Mol. Pharmacol.* **1991**, *40*, 8–15.
- (6) Baldwin, J. M. The Probable Arrangement of the Helices in G Protein-coupled Receptors. *EMBO J.* **1993**, *12*, 1693–703.
- (7) Palczewski, K. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **2000**, *289*, 739–745.
- (8) Venkatakrishnan, A. J.; Deupi, X.; Lebon, G.; Tate, C. G.; Schertler, G. F.; Babu, M. M. Molecular Signatures of G-protein-coupled Receptors. *Nature* **2013**, *494*, 185–94.
- (9) Kobilka, B. K. G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochim. et Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 794–807.
- (10) Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.-G.; Schiöth, H. B. The G-protein-coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256–72.
- (11) Schiöth, H. B.; Fredriksson, R. The GRAFS Classification System of G-protein Coupled Receptors in Comparative Perspective. *Gen. Comp. Endocr.* **2005**, *142*, 94–101.
- (12) Sondek, J.; Bohm, A.; Lambright, D. G.; Hamm, H. E.; Sigler, P. B. Crystal Structure of a G-protein Beta Gamma Dimer at 2.1 Å Resolution. *Nature* **1996**, *379*, 369–74.
- (13) Lambright, D. G.; Sondek, J.; Bohm, A.; Skiba, N. P.; Hamm, H. E.; Sigler, P. B. The 2.0 Å Crystal Structure of a Heterotrimeric G Protein. *Nature* **1996**, *379*, 311–319.
- (14) Neer, E. J. Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals. *Cell* **1995**, *80*, 249–57.
- (15) Bockaert, J.; Pin, J. P. [Use of a G-protein-coupled Receptor to Communicate. An Evolutionary Success]. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie* **1998**, *321*, 529–51.

- (16) Oldham, W. M.; Hamm, H. E. Heterotrimeric G Protein Activation by G-protein-coupled Receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 60–71.
- (17) GPCR: Twenty Questions. *Nat. Rev. Drug discovery* **2004**, *3*, 577–626.
- (18) De Lean, A.; Stadel, J. M.; Lefkowitz, R. J. A Ternary Complex Model Explains the Agonist-specific Binding Properties of the Adenylate Cyclase-coupled Beta-adrenergic Receptor. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 7108–17.
- (19) Kenakin, T. Principles: Receptor Theory in Pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 186–92.
- (20) Weiss, J. M.; Morgan, P. H.; Lutz, M. W.; Kenakin, T. P. The Cubic Ternary Complex Receptor-occupancy Model, Resurrecting Efficacy. *J. Theor. Biol.* **1996**, *181*, 381–97.
- (21) Durroux, T. Principles: a Model for the Allosteric Interactions Between Ligand Binding Sites Within a Dimeric GPCR. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 376–84.
- (22) Drake, M. T.; Shenoy, S. K.; Lefkowitz, R. J. Trafficking of G Protein-coupled Receptors. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 570–82.
- (23) Audet, M.; Bouvier, M. Restructuring G-protein- Coupled Receptor Activation. *Cell* **2012**, *151*, 14–23.
- (24) Farrens, D. L.; Altenbach, C.; Yang, K.; Hubbell, W. L.; Khorana, H. G. Requirement of Rigid-body Motion of Transmembrane Helices for Light Activation of Rhodopsin. *Science* **1996**, *274*, 768–70.
- (25) Kohout, T. a; Lefkowitz, R. J. Regulation of G Protein-coupled Receptor Kinases and Arrestins During Receptor Desensitization. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 9–18.
- (26) Stoop, R. Neuromodulation by Oxytocin and Vasopressin. *Neuron* **2012**, *76*, 142–59.
- (27) Barberis, C.; Mouillac, B.; Durroux, T. Structural Bases of Vasopressin/oxytocin Receptor Function. *J. Endocrinol* **1998**, *156*, 223–229.
- (28) Chini, B.; Mouillac, B.; Ala, Y.; Balestre, M. N.; Trumpp-Kallmeyer, S.; Hoflack, J.; Elands, J.; Hibert, M.; Manning, M.; Jard, S. Tyr115 Is the Key Residue for Determining Agonist Selectivity in the V1a Vasopressin Receptor. *EMBO J.* **1995**, *14*, 2176–82.
- (29) Ufer, E.; Postina, R.; Gorbulev, V.; Fahrenholz, F. An Extracellular Residue Determines the Agonist Specificity of V2 Vasopressin Receptors. *FEBS Lett.* **1995**, *362*, 19–23.
- (30) Mouillac, B.; Chini, B.; Elands, J.; Trumpp-, S.; Hoflack, J.; Hibert, M.; Jard, S.; Barberis, C. The Binding Site of Neuropeptide Vasopressin V1a Receptor. **1995**, *270*, 25771–25777.

- (31) Chini, B.; Mouillac, B.; Balestre, M. N.; Trumpp-Kallmeyer, S.; Hoflack, J.; Hibert, M.; Andriolo, M.; Pupier, S.; Jard, S.; Barberis, C. Two Aromatic Residues Regulate the Response of the Human Oxytocin Receptor to the Partial Agonist Arginine Vasopressin. *FEBS Lett.* **1996**, *397*, 201–6.
- (32) Postina, R.; Kojro, E.; Fahrenholtz, F. Separate Agonist and Peptide Antagonist Binding Sites of the Oxytocin Receptor Defined by Their Transfer into the V2 Vasopressin Receptor. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31593–31601.
- (33) Gimpl, G.; Postina, R.; Fahrenholz, F.; Reinheimer, T. Binding Domains of the Oxytocin Receptor for the Selective Oxytocin Receptor Antagonist Barusiban in Comparison to the Agonists Oxytocin and Carbetocin. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *510*, 9–16.
- (34) Phalipou, S.; Seyer, R.; Cotte, N.; Breton, C.; Barberis, C.; Hibert, M.; Mouillac, B. Docking of Linear Peptide Antagonists into the Human V(1a) Vasopressin Receptor. Identification of Binding Domains by Photoaffinity Labeling. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23316–27.
- (35) Cotte, N.; Balestre, M. N.; Aumelas, A.; Mahé, E.; Phalipou, S.; Morin, D.; Hibert, M.; Manning, M.; Durroux, T.; Barberis, C.; Mouillac, B. Conserved Aromatic Residues in the Transmembrane Region VI of the V1a Vasopressin Receptor Differentiate Agonist Vs. Antagonist Ligand Binding. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4253–63.
- (36) Breton, C.; Chellil, H.; Kabbaj-Benmansour, M.; Carnazzi, E.; Seyer, R.; Phalipou, S.; Morin, D.; Durroux, T.; Zingg, H.; Barberis, C.; Mouillac, B. Direct Identification of Human Oxytocin Receptor-binding Domains Using a Photoactivatable Cyclic Peptide Antagonist: Comparison with the Human V1a Vasopressin Receptor. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26931–41.
- (37) Hawtin, S. R.; Wesley, V. J.; Parslow, R. a; Simms, J.; Miles, A.; McEwan, K.; Wheatley, M. A Single Residue (arg46) Located Within the N-terminus of the V1a Vasopressin Receptor Is Critical for Binding Vasopressin but Not Peptide or Nonpeptide Antagonists. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 600–9.
- (38) Hawtin, S. R.; Wesley, V. J.; Simms, J.; Parslow, R. a; Miles, A.; McEwan, K.; Keen, M.; Wheatley, M. An Arginyl in the N-terminus of the V1a Vasopressin Receptor Is Part of the Conformational Switch Controlling Activation by Agonist. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4681–4688.
- (39) Hawtin, S. R.; Simms, J.; Conner, M.; Lawson, Z.; Parslow, R. a; Trim, J.; Sheppard, A.; Wheatley, M. Charged Extracellular Residues, Conserved Throughout a G-protein-coupled Receptor Family, Are Required for Ligand Binding, Receptor Activation, and Cell-surface Expression. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 38478–88.
- (40) Conner, M.; Hawtin, S. R.; Simms, J.; Wootten, D.; Lawson, Z.; Conner, A. C.; Parslow, R. a; Wheatley, M. Systematic Analysis of the Entire Second Extracellular Loop of the V(1a) Vasopressin Receptor: Key Residues, Conserved Throughout a G-protein-coupled Receptor Family, Identified. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 17405–12.

- (41) Klotz, P.; Rognan, D.; Barberis, C.; Mouillac, B.; Hibert, M. Identification of the Binding Sites of the SR49059 Nonpeptide Antagonist into the V 1a Vasopressin Receptor Using Sulfhydryl- Reactive Ligands and Cysteine Mutants as Chemical Sensors. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 40010–40019.
- (42) Tahtaoui, C.; Balestre, M.-N.; Klotz, P.; Rognan, D.; Barberis, C.; Mouillac, B.; Hibert, M. Identification of the Binding Sites of the SR49059 Nonpeptide Antagonist into the V1a Vasopressin Receptor Using Sulfhydryl-reactive Ligands and Cysteine Mutants as Chemical Sensors. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 40010–9.
- (43) Rodrigo, J.; Pena, A.; Murat, B.; Trueba, M.; Durroux, T.; Guillon, G.; Rognan, D. Mapping the Binding Site of Arginine Vasopressin to V1a and V1b Vasopressin Receptors. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 512–23.
- (44) Macion-dazard, R.; Callahan, N.; Xu, Z.; Wu, N.; Thibonnier, M. Mapping the Binding Site of Six Nonpeptide Antagonists to the Human V 2 -Renal Vasopressin Receptor. *J. Pharm. Exp. Thr.* **2006**, *316*, 564–571.
- (45) Wootten, D. L.; Simms, J.; Massoura, A. J.; Trim, J. E.; Wheatley, M. Agonist-specific Requirement for a Glutamate in Transmembrane Helix 1 of the Oxytocin Receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* **2011**, *333*, 20–7.
- (46) Insel, T. R. A Neurobiological Basis of Social Attachment. *Am. J. Psychiat.* **1997**, *154*, 726–735.
- (47) Gordon, I.; Zagoory-Sharon, O.; Leckman, J. F.; Feldman, R. Oxytocin and the Development of Parenting in Humans. *Biol. Psychiat.* **2010**, *68*, 377–82.
- (48) Feldman, R.; Weller, A.; Zagoory-Sharon, O.; Levine, A. Evidence for a Neuroendocrinological Foundation of Human Affiliation: Plasma Oxytocin Levels Across Pregnancy and the Postpartum Period Predict Mother-infant Bonding. *Psychol. sci.* **2007**, *18*, 965–70.
- (49) Bartels, A.; Zeki, S. The Neural Correlates of Maternal and Romantic Love. *NeuroImage* **2004**, *21*, 1155–66.
- (50) Matthiesen, A. S.; Ransjö-Arvidson, A. B.; Nissen, E.; Uvnäs-Moberg, K. Postpartum Maternal Oxytocin Release by Newborns: Effects of Infant Hand Massage and Sucking. *Birth* **2001**, *28*, 13–9.
- (51) Pedersen, C. A.; Ascher, J. A.; Monroe, Y. L.; Prange, A. J. Oxytocin Induces Maternal Behavior in Virgin Female Rats. *Science* **1982**, *216*, 648–50.
- (52) Schaller, F.; Watrin, F.; Sturny, R.; Massacrier, A.; Szepetowski, P.; Muscatelli, F. A Single Postnatal Injection of Oxytocin Rescues the Lethal Feeding Behaviour in Mouse Newborns Deficient for the Imprinted *Magel2* Gene. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 4895–905.

- (53) Winslow, J. T.; Hastings, N.; Sue Carter, C.; Harbaugh, C. R.; Insel, T. R. A Role for Central Vasopressin in Pair Bonding in Monogamous Prairies Voles. *Nature* **1993**, *365*, 545–548.
- (54) Schneiderman, I.; Zagoory-Sharon, O.; Leckman, J. F.; Feldman, R. Oxytocin During the Initial Stages of Romantic Attachment: Relations to Couples' Interactive Reciprocity. *Psychoneuroendocrino.* **2012**, *37*, 1277–85.
- (55) Ferguson, J. N.; Aldag, J. M.; Insel, T. R.; Young, L. J. Oxytocin in the Medial Amygdala Is Essential for Social Recognition in the Mouse. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 8278–85.
- (56) Kosfeld, M.; Heinrichs, M.; Zak, P. J.; Fischbacher, U.; Fehr, E. Oxytocin Increases Trust in Humans. *Nature* **2005**, *435*, 673–6.
- (57) Heinrichs, M.; Meinlschmidt, G.; Wippich, W.; Ehlert, U.; Hellhammer, D. H. Selective Amnesic Effects of Oxytocin on Human Memory. *Physiol. Behav.* **2004**, *83*, 31–8.
- (58) Rodrigues, S. M.; Saslow, L. R.; Garcia, N.; John, O. P.; Keltner, D. Oxytocin Receptor Genetic Variation Relates to Empathy and Stress Reactivity in Humans. *PNAS* **2009**, *106*, 21437–41.
- (59) Ditzen, B.; Schaer, M.; Gabriel, B.; Bodenmann, G.; Ehlert, U.; Heinrichs, M. Intranasal Oxytocin Increases Positive Communication and Reduces Cortisol Levels During Couple Conflict. *Biol. Psychiat.* **2009**, *65*, 728–31.
- (60) De Dreu, C. K. W.; Greer, L. L.; Van Kleef, G. a; Shalvi, S.; Handgraaf, M. J. J. Oxytocin Promotes Human Ethnocentrism. *PNAS* **2011**, *108*, 1262–6.
- (61) De Dreu, C. K. W.; Greer, L. L.; Handgraaf, M. J. J.; Shalvi, S.; Van Kleef, G. a; Baas, M.; Ten Velden, F. S.; Van Dijk, E.; Feith, S. W. W. The Neuropeptide Oxytocin Regulates Parochial Altruism in Intergroup Conflict Among Humans. *Science* **2010**, *328*, 1408–11.
- (62) Parker, K. J.; Kenna, H. a; Zeitzer, J. M.; Keller, J.; Blasey, C. M.; Amico, J. a; Schatzberg, A. F. Preliminary Evidence That Plasma Oxytocin Levels Are Elevated in Major Depression. *Psychiatr. Res.* **2010**, *178*, 359–62.
- (63) Sala, M.; Braida, D.; Donzelli, A.; Martucci, R.; Busnelli, M.; Bulgheroni, E.; Rubino, T.; Parolaro, D.; Nishimori, K.; Chini, B. Mice Heterozygous for the Oxytocin Receptor Gene (Oxtr(+/-)) Show Impaired Social Behaviour but Not Increased Aggression or Cognitive Inflexibility: Evidence of a Selective Haploinsufficiency Gene Effect. *J. Neuroendocrinol.* **2013**, *25*, 107–118.
- (64) Bielsky, I. F.; Hu, S.-B.; Szegda, K. L.; Westphal, H.; Young, L. J. Profound Impairment in Social Recognition and Reduction in Anxiety-like Behavior in Vasopressin V1a Receptor Knockout Mice. *Neuropsychopharmacol.* **2004**, *29*, 483–93.

- (65) Barrett, C. E.; Keebaugh, A. C.; Ahern, T. H.; Bass, C. E.; Terwilliger, E. F.; Young, L. J. Variation in Vasopressin Receptor (Avpr1a) Expression Creates Diversity in Behaviors Related to Monogamy in Prairie Voles. *Horm. Behav.* **2013**, *63*, 518–26.
- (66) Smith, A. S.; Agmo, A.; Birnie, A. K.; French, J. a Manipulation of the Oxytocin System Alters Social Behavior and Attraction in Pair-bonding Primates, Callithrix Penicillata. *Horm. Behav.* **2010**, *57*, 255–62.
- (67) Parr, L. A.; Modi, M.; Siebert, E.; Young, L. J. Intranasal Oxytocin Selectively Attenuates Rhesus Monkeys' Attention to Negative Facial Expressions. *Psychoneuroendocrino.* **2013**, *38*, 1748–1756.
- (68) Chang, S. W. C.; Barter, J. W.; Ebitz, R. B.; Watson, K. K.; Platt, M. L. Inhaled Oxytocin Amplifies Both Vicarious Reinforcement and Self Reinforcement in Rhesus Macaques (Macaca Mulatta). *PNAS* **2012**, *109*, 959–64.
- (69) Modahl, C.; Green, L.; Fein, D.; Morris, M.; Waterhouse, L.; Feinstein, C.; Levin, H. Plasma Oxytocin Levels in Autistic Children. *Biol. Psychiat.* **1998**, *43*, 270–7.
- (70) Green, L.; Fein, D.; Modahl, C.; Feinstein, C.; Waterhouse, L.; Morris, M. Oxytocin and Autistic Disorder: Alterations in Peptide Forms. *Biol. Psychiat.* **2001**, *50*, 609–13.
- (71) Hollander, E.; Novotny, S.; Hanratty, M.; Yaffe, R.; DeCaria, C. M.; Aronowitz, B. R.; Mosovich, S. Oxytocin Infusion Reduces Repetitive Behaviors in Adults with Autistic and Asperger's Disorders. *Neuropsychopharmacol.* **2003**, *28*, 193–8.
- (72) Hollander, E.; Bartz, J.; Chaplin, W.; Phillips, A.; Sumner, J.; Soorya, L.; Anagnostou, E.; Wasserman, S. Oxytocin Increases Retention of Social Cognition in Autism. *Biol. Psychiat.* **2007**, *61*, 498–503.
- (73) Guastella, A. J.; Einfeld, S. L.; Gray, K. M.; Rinehart, N. J.; Tonge, B. J.; Lambert, T. J.; Hickie, I. B. Intranasal Oxytocin Improves Emotion Recognition for Youth with Autism Spectrum Disorders. *Biol. Psychiat.* **2010**, *67*, 692–4.
- (74) Anagnostou, E.; Soorya, L.; Chaplin, W.; Bartz, J.; Halpern, D.; Wasserman, S.; Wang, a T.; Pepa, L.; Tanel, N.; Kushki, A.; Hollander, E. Intranasal Oxytocin Versus Placebo in the Treatment of Adults with Autism Spectrum Disorders: a Randomized Controlled Trial. *Mol. Autism* **2012**, *3*, 16.
- (75) Dadds, M. R.; Macdonald, E.; Cauchi, A.; Williams, K.; Levy, F.; Brennan, J. Nasal Oxytocin for Social Deficits in Childhood Autism: A Randomized Controlled Trial. *J. Autism Dev. Disord.* **2013**.
- (76) Meyer-Lindenberg, A.; Domes, G.; Kirsch, P.; Heinrichs, M. Oxytocin and Vasopressin in the Human Brain: Social Neuropeptides for Translational Medicine. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, *12*, 524–38.

- (77) Ganong, W.; Barrett, K.; Barman, S.; Boitano, S.; Brookes, H. *Physiologie Médicale*; De Boer Estem, Ed.; 3e Edition.; 2012.
- (78) Bree, F. M. De Trafficking of the Vasopressin and Oxytocin Prohormone Through the Regulated Secretory Pathway. *J. Neuroendocrinol.* **2000**, *12*, 589–594.
- (79) Engstrøm, T.; Barth, T.; Melin, P.; Vilhardt, H. Oxytocin Receptor Binding and Uterotonic Activity of Carbetocin and Its Metabolites Following Enzymatic Degradation. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *355*, 203–10.
- (80) Valenzuela, G. J.; Sanchez-Ramos, L.; Romero, R.; Silver, H. M.; Koltun, W. D.; Millar, L.; Hobbins, J.; Rayburn, W.; Shangold, G.; Wang, J. Maintenance Treatment of Preterm Labor with the Oxytocin Antagonist Atosiban. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2000**, *182*, 1184–1190.
- (81) Reinheimer, T. M.; Bee, W. H.; Resendez, J. C.; Meyer, J. K.; Haluska, G. J.; Chellman, G. J. Barusiban, a New Highly Potent and Long-acting Oxytocin Antagonist: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Comparison with Atosiban in a Cynomolgus Monkey Model of Preterm Labor. *J. Clin. Endocr. Metab.* **2005**, *90*, 2275–81.
- (82) Hobbs, D. W.; Gould, N. P.; Hoffman, J. B.; Clineschmidt, B. V.; Pettibones, D. J.; Veber, D. F.; Freidinger, R. M. Non-peptide Oxytocin Antagonists: Identification and Synthesis of a Potent Camphor Aminosuccinimide. *Biorg. Med. Chem. Letters* **1995**, *5*, 119–122.
- (83) Williams, P. D.; Ball, R. G.; Clineschmidt, B. V.; Culberson, J. C.; Erb, J. M.; Freidinger, R. M.; Pawluczyk, J. M.; Perlow, D. S.; Pettibone, D. J.; Veber, D. F. Conformationally Constrained O-tolylpiperazine Camphorsulfonamide Oxytocin Antagonists. Structural Modifications That Provide High Receptor Affinity and Suggest a Bioactive Conformation. *Biorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 971–985.
- (84) Lemaire, W.; O'Brien, J. a; Burno, M.; Chaudhary, A. G.; Dean, D. C.; Williams, P. D.; Freidinger, R. M.; Pettibone, D. J.; Williams, D. L. A Nonpeptide Oxytocin Receptor Antagonist Radioligand Highly Selective for Human Receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *450*, 19–28.
- (85) Gal, C. S.; Germain, G.; Advenier, C.; Naline, E.; Bardou, M.; Martinolle, J.; Pouzet, B.; Raufaste, D.; Garcia, C.; Pauly, M.; Pascal, M.; Barbier, A.; Scatton, B.; Maffrand, J. N - ethyl- N - (3-pyridylmethyl) -benzamide , Hydrochloride): A New Selective and Orally Active Oxytocin Receptor Antagonist for the Prevention of Preterm Labor. *J. Pharm. Exp. Thr.* **2004**, *309*, 414–424.
- (86) Evans, B.; Pipe, A.; Clark, L.; Banks, M. Identification of a Potent and Selective Oxytocin Antagonist, from Screening a Fully Encoded Differential Release Combinatorial Chemical Library. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2001**, *11*, 1297–300.
- (87) Wyatt, P. G.; Allen, M. J.; Chilcott, J.; Hickin, G.; Miller, N. D.; Woollard, P. M. Structure-activity Relationship Investigations of a Potent and Selective Benzodiazepine Oxytocin Antagonist. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2001**, *11*, 1301–5.

- (88) Cirillo, R.; Tos, E. G.; Schwarz, M. K.; Quattropiani, A.; Scheer, A.; Nichols, A.; Borrelli, F.; Giachetti, C.; Golzio, L.; Marinelli, P.; Thomas, R. J.; Chevillard, C.; Laurent, F.; Portet, K.; Barberis, C.; Andr, E.; Biomediche, R.; Bioscience, L. C. G.; Giacosa, C.; De, I. N. Pharmacology of Pyrrolidinecarboxamide , a New Potent and Selective Nonpeptide Antagonist of the Oxytocin Receptor. *J. Pharm. Exp. Thr.* **2003**, *306*, 253–261.
- (89) Quattropiani, A.; Dorbais, J.; Covini, D.; Pittet, P.-A.; Colovray, V.; Thomas, R. J.; Coxhead, R.; Halazy, S.; Scheer, A.; Missotten, M.; Ayala, G.; Bradshaw, C.; De Raemy-Schenk, A.-M.; Nichols, A.; Cirillo, R.; Tos, E. G.; Giachetti, C.; Golzio, L.; Marinelli, P.; Church, D. J.; Barberis, C.; Chollet, A.; Schwarz, M. K. Discovery and Development of a New Class of Potent, Selective, Orally Active Oxytocin Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7882–905.
- (90) Brown, A. D.; Ellis, D.; Smith, C. R. Substituted Triazole Derivatives as Oxytocin Antagonists. WO/2005/028452, 2005.
- (91) Borthwick, A. D. Oral Oxytocin Antagonists. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6525–38.
- (92) Brown, A.; Brown, L.; Ellis, D.; Puhalo, N.; Smith, C. R.; Wallace, O.; Watson, L. Design and Optimization of Potent, Selective Antagonists of Oxytocin. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2008**, *18*, 4278–81.
- (93) Brown, A.; Brown, T. B.; Calabrese, A.; Ellis, D.; Puhalo, N.; Ralph, M.; Watson, L. Triazole Oxytocin Antagonists: Identification of an Aryloxyazetidone Replacement for a Biaryl Substituent. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2010**, *20*, 516–20.
- (94) Wyatt, P. G.; Allen, M. J.; Borthwick, A. D.; Davies, D. E.; Exall, A. M.; Hatley, R. J. D.; Irving, W. R.; Livermore, D. G.; Miller, N. D.; Nerozzi, F.; Sollis, S. L.; Szardenings, A. K. 2,5-Diketopiperazines as Potent and Selective Oxytocin Antagonists 1: Identification, Stereochemistry and Initial SAR. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2005**, *15*, 2579–82.
- (95) Borthwick, A. D.; Davies, D. E.; Exall, A. M.; Livermore, D. G.; Sollis, S. L.; Nerozzi, F.; Allen, M. J.; Perren, M.; Shabbir, S. S.; Woollard, P. M.; Wyatt, P. G. 2,5-diketopiperazines as Potent, Selective, and Orally Bioavailable Oxytocin Antagonists. 2. Synthesis, Chirality, and Pharmacokinetics. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6956–69.
- (96) Borthwick, A. D.; Davies, D. E.; Exall, A. M.; Hatley, R. J. D.; Hughes, J. a; Irving, W. R.; Livermore, D. G.; Sollis, S. L.; Nerozzi, F.; Valko, K. L.; Allen, M. J.; Perren, M.; Shabbir, S. S.; Woollard, P. M.; Price, M. a 2,5-diketopiperazines as Potent, Selective, and Orally Bioavailable Oxytocin Antagonists. 3. Synthesis, Pharmacokinetics, and in Vivo Potency. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4159–70.
- (97) Liddle, J.; Allen, M. J.; Borthwick, A. D.; Brooks, D. P.; Davies, D. E.; Edwards, R. M.; Exall, A. M.; Hamlett, C.; Irving, W. R.; Mason, A. M.; McCafferty, G. P.; Nerozzi, F.; Peace, S.; Philp, J.; Pollard, D.; Pullen, M. a; Shabbir, S. S.; Sollis, S. L.; Westfall, T. D.; Woollard, P. M.; Wu, C.; Hickey, D. M. B. The Discovery of GSK221149A: a Potent and Selective Oxytocin Antagonist. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2008**, *18*, 90–4.

- (98) Pitt, G. R. W.; Batt, A. R.; Haigh, R. M.; Penson, A. M.; Robson, P. a; Rooker, D. P.; Tartar, A. L.; Trim, J. E.; Yea, C. M.; Roe, M. B. Non-peptide Oxytocin Agonists. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2004**, *14*, 4585–9.
- (99) Frantz, M.-C.; Rodrigo, J.; Boudier, L.; Durroux, T.; Mouillac, B.; Hibert, M. Subtlety of the Structure-affinity and Structure-efficacy Relationships Around a Nonpeptide Oxytocin Receptor Agonist. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1546–62.
- (100) Ring, R. H.; Schechter, L. E.; Leonard, S. K.; Dwyer, J. M.; Platt, B. J.; Graf, R.; Grauer, S.; Pulicichio, C.; Resnick, L.; Rahman, Z.; Sukoff Rizzo, S. J.; Luo, B.; Beyer, C. E.; Logue, S. F.; Marquis, K. L.; Hughes, Z. a; Rosenzweig-Lipson, S. Receptor and Behavioral Pharmacology of WAY-267464, a Non-peptide Oxytocin Receptor Agonist. *Neuropharmacology* **2010**, *58*, 69–77.
- (101) Hicks, C.; Jorgensen, W.; Brown, C.; Fardell, J.; Koehbach, J.; Gruber, C. W. The Nonpeptide Oxytocin Receptor Agonist WAY 267 , 464 : Receptor-Binding Profile , Prosocial Effects and Distribution of c- Fos Expression in Adolescent Rats. *J. Neuroendocrinol.* **2012**, *24*, 1012–1029.
- (102) Ali, F.; Raufi, M.; Washington, B.; Ghali, J. K. Conivaptan: a Dual Receptor Vasopressin V1a/V2 Antagonist. *Cardiovasc. Drug. Rev.* **2007**, *25*, 261–279.
- (103) Tahara, A.; Tsukada, J.; Tomura, Y.; Kusayama, T.; Wada, K.-I.; Ishii, N.; Taniguchi, N.; Suzuki, T.; Yatsu, T.; Uchida, W.; Shibasaki, M. Effects of YM218, a Nonpeptide Vasopressin V1A Receptor-selective Antagonist, on Human Vasopressin and Oxytocin Receptors. *Pharmacol. res.* **2005**, *51*, 275–81.
- (104) Serradeil-Le Gal, C.; Wagnon, J.; Garcia, C.; Lacour, C.; Guiraudou, P.; Christophe, B.; Villanova, G.; Nisato, D.; Maffrand, J. P.; Le Fur, G. Biochemical and Pharmacological Properties of SR 49059, a New, Potent, Nonpeptide Antagonist of Rat and Human Vasopressin V1a Receptors. *J. Clin. Invest.* **1993**, *92*, 224–31.
- (105) Guillon, C. D.; Koppel, G. A.; Brownstein, M. J.; Chaney, M. O.; Ferris, C. F.; Lu, S.; Fabio, K. M.; Miller, M. J.; Heindel, N. D.; Hunden, C.; Cooper, R. D. G.; Kaldor, S. W.; Skelton, J. J.; Bruce, A.; Clay, M. P.; Steinberg, M. I.; Bruns, R. F.; Simon, N. G. Azetidines as Vasopressin V1a Antagonists. *Biorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2054–2080.
- (106) Fabio, K. M.; Guillon, C. D.; Lu, S.; Heindel, N. E. D. D.; Brownstein, M. J.; Lacey, C. J.; Garippa, C.; Simon, N. G. Pharmacokinetics and Metabolism of SRX246 : A Potent and Selective Vasopressin 1a Antagonist. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 2033–2043.
- (107) Ferris, C. F.; Lu, S.-F.; Messenger, T.; Guillon, C. D.; Heindel, N.; Miller, M.; Koppel, G.; Robert Bruns, F.; Simon, N. G. Orally Active Vasopressin V1a Receptor Antagonist, SRX251, Selectively Blocks Aggressive Behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2006**, *83*, 169–74.

- (108) Russell, R.; Doyle, R.; Turner, J.; Attkins, N.; Ramsey, S.; Weibley, L.; Bateman, L.; Bictash, M.; Neal-Morgan, S.; Ivarsson, M.; Pullen, N. In Vitro and in Vivo Pharmacological Characterisation of the Potent and Selective Vasopressin V(1A) Receptor Antagonist 4-[4-(4-Chloro-phenyl)-5-[1,2,3]triazol-2-ylmethyl-4H-[1,2,4]triazol-3-yl]-piperidin-1-yl-(3,5-difluoro-phenyl) Methanone (PF-00738245). *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *670*, 347–55.
- (109) Gunnet, J. W.; Wines, P.; Xiang, M.; Rybczynski, P.; Andrade-Gordon, P.; de Garavilla, L.; Parry, T. J.; Cheung, W.-M.; Minor, L.; Demarest, K. T.; Maryanoff, B. E.; Damiano, B. P. Pharmacological Characterization of RWJ-676070, a Dual Vasopressin V(1A)/V(2) Receptor Antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *590*, 333–42.
- (110) Xiang, M. A.; Rybczynski, P. J.; Patel, M.; Chen, R. H.; McComsey, D. F.; Zhang, H.-C.; Gunnet, J. W.; Look, R.; Wang, Y.; Minor, L. K.; Zhong, H. M.; Villani, F. J.; Demarest, K. T.; Damiano, B. P.; Maryanoff, B. E. Next-generation Spirobenzazepines: Identification of RWJ-676070 as a Balanced Vasopressin V1a/V2 Receptor Antagonist for Human Clinical Studies. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2007**, *17*, 6623–8.
- (111) Xiang, M. A.; Chen, R. H.; Demarest, K. T.; Gunnet, J.; Look, R.; Hageman, W.; Murray, W. V.; Combs, D. W.; Rybczynski, P. J.; Patel, M. Synthesis and Evaluation of Nonpeptide Substituted Spirobenzazepines as Potent Vasopressin Antagonists. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2004**, *14*, 3143–6.
- (112) Bleickardt, C. J.; Mullins, D. E.; Macsweeney, C. P.; Werner, B. J.; Pond, a J.; Guzzi, M. F.; Martin, F. D. C.; Varty, G. B.; Hodgson, R. a Characterization of the V1a Antagonist, JNJ-17308616, in Rodent Models of Anxiety-like Behavior. *Psychopharmacology* **2009**, *202*, 711–8.
- (113) Arbuckle, W.; Baker, J.; Barn, D.; Bingham, M.; Brown, A.; Buchanan, K.; Craighead, M.; Goodwin, R.; Goutcher, S.; Kiczun, M.; Lyons, A.; Milne, R.; Montgomery, B.; Napier, S.; Presland, J.; Sloan, H.; Turnbull, Z.; Wishart, G. Optimisation of Pharmacokinetic Properties to Afford an Orally Bioavailable and Selective V1A Receptor Antagonist. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2011**, *21*, 4622–8.
- (114) Hovius, R.; Vallotton, P.; Wohland, T.; Vogel, H. Fluorescence Techniques: Shedding Light on Ligand-receptor Interactions. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 266–73.
- (115) Bazin, H.; Préaudat, M.; Trinquet, E.; Mathis, G. Homogeneous Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Using Rare Earth Cryptates as a Tool for Probing Molecular Interactions in Biology. *Spectrochim. Acta A* **2001**, *57*, 2197–211.
- (116) Degorce, F.; Card, A.; Soh, S.; Trinquet, E.; Knapik, G. P.; Xie, B. HTRF: A Technology Tailored for Drug Discovery - a Review of Theoretical Aspects and Recent Applications. *Curr. Chem. Genom.* **2009**, *3*, 22–32.
- (117) Xu, J.; Corneillie, T. M.; Moore, E. G.; Law, G.-L.; Butlin, N. G.; Raymond, K. N. Octadentate Cages of Tb(III) 2-hydroxyisophthalamides: a New Standard for Luminescent Lanthanide Labels. *J. Am. Chem. Soc* **2011**, *133*, 19900–10.

- (118) Mouillac, B.; Manning, M.; Durroux, T. Fluorescent Agonists and Antagonists for Vasopressin/oxytocin G Protein-coupled Receptors: Usefulness in Ligand Screening Assays and Receptor Studies. *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 996–1005.
- (119) Albizu, L.; Teppaz, G.; Seyer, R.; Bazin, H.; Ansanay, H.; Manning, M.; Mouillac, B.; Durroux, T. Toward Efficient Drug Screening by Homogeneous Assays Based on the Development of New Fluorescent Vasopressin and Oxytocin Receptor Ligands. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4976–85.
- (120) Kakefuda, A.; Suzuki, T.; Tobe, T.; Tsukada, J.; Tahara, A.; Sakamoto, S.; Tsukamoto, S.-I. Synthesis and Pharmacological Evaluation of 5-(4-biphenyl)-3-methyl-4-phenyl-1,2,4-triazole Derivatives as a Novel Class of Selective Antagonists for the Human Vasopressin V(1A) Receptor. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2589–98.
- (121) Marugán, J. J.; Manthey, C.; Anaclerio, B.; Lafrance, L.; Lu, T.; Markotan, T.; Leonard, K. a; Crysler, C.; Eisennagel, S.; Dasgupta, M.; Tomczuk, B. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Potent and Selective Alphavbeta3/alphavbeta5 Integrin Dual Inhibitors with Improved Bioavailability. Selection of the Molecular Core. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 926–34.
- (122) Heckmann, D.; Meyer, A.; Laufer, B.; Zahn, G.; Stragies, R.; Kessler, H. Rational Design of Highly Active and Selective Ligands for the Alpha5beta1 Integrin Receptor. *Chembiochem* **2008**, *9*, 1397–407.
- (123) Ozturk, T.; Ertas, E.; Mert, O. Use of Lawesson's Reagent in Organic Syntheses. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5210–78.
- (124) Johnsson, K. SNAP-tag® Technologies: Novel Tools to Study Protein Function <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/snap-tag-technologies-novel-tools-to-study-protein-function> (accessed Feb 8, 2013).
- (125) Sun, X.; Zhang, A.; Baker, B.; Sun, L.; Howard, A.; Buswell, J.; Maurel, D.; Masharina, A.; Johnsson, K.; Noren, C. J.; Xu, M.-Q.; Corrêa, I. R. Development of SNAP-tag Fluorogenic Probes for Wash-free Fluorescence Imaging. *Chembiochem* **2011**, *12*, 2217–26.
- (126) Akerlund, M.; Bossmar, T.; Brouard, R.; Kostrzewska, A.; Laudanski, T.; Lemancewicz, A.; Serradeil-Le Gal, C.; Steinwall, M. Receptor Binding of Oxytocin and Vasopressin Antagonists and Inhibitory Effects on Isolated Myometrium from Preterm and Term Pregnant Women. *Brit. J. Obstet. Gynaec.* **1999**, *106*, 1047–53.
- (127) Jordan, B. A.; Devi, L. A. G-protein-coupled Receptor Heterodimerization Modulates Receptor Function. *Nature* **1999**, *399*, 697–700.
- (128) Terrillon, S.; Bouvier, M. Roles of G-protein-coupled Receptor Dimerization. *EMBO reports* **2004**, *5*, 30–4.

- (129) Daly, C. J.; McGrath, J. C. Fluorescent Ligands, Antibodies, and Proteins for the Study of Receptors. *Pharmacol. Therapeut.* **2003**, *100*, 101–118.
- (130) Hipser, C.; Bushlin, I.; Gupsta, A.; Gomes, I.; Devi, L. Role of Antibodies in Developing Drugs That Target G Protein-coupled Receptor Dimers. *Mt. Sinai. J. Med.* **2010**, *77*, 374–380.
- (131) Rozenfeld, R.; Devi, L. a Receptor Heteromerization and Drug Discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 124–30.
- (132) Reddy, P. S.; Corley, R. B. Assembly, Sorting, and Exit of Oligomeric Proteins from the Endoplasmic Reticulum. *BioEssays* **1998**, *20*, 546–54.
- (133) Marshall, F. H.; White, J.; Main, M.; Green, A.; Wise, A. GABA(B) Receptors Function as Heterodimers. *Biochem. Soc. T.* **1999**, *27*, 530–5.
- (134) Blanpain, C.; Vanderwinden, J.-M.; Cihak, J.; Wittamer, V.; Le Poul, E.; Issafras, H.; Stangassinger, M.; Vassart, G.; Marullo, S.; SchIndorff, D.; Parmentier, M.; Mack, M. Multiple Active States and Oligomerization of CCR5 Revealed by Functional Properties of Monoclonal Antibodies. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 723–37.
- (135) Floyd, D. H.; Geva, A.; Bruinsma, S. P.; Overton, M. C.; Blumer, K. J.; Baranski, T. J. C5a Receptor Oligomerization. II. Fluorescence Resonance Energy Transfer Studies of a Human G Protein-coupled Receptor Expressed in Yeast. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35354–61.
- (136) Terrillon, S.; Durroux, T.; Mouillac, B.; Breit, A.; Ayoub, M. a; Taulan, M.; Jockers, R.; Barberis, C.; Bouvier, M. Oxytocin and Vasopressin V1a and V2 Receptors Form Constitutive Homo- and Heterodimers During Biosynthesis. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 677–91.
- (137) Terrillon, S.; Durroux, T.; Mouillac, B.; Breit, A.; Ayoub, M. A.; Taulan, M.; Jockers, R.; Barberis, C.; Bouvier, M. Oxytocin and Vasopressin V1a and V2 Receptors Form Constitutive Homo- and Heterodimers During Biosynthesis. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 677–91.
- (138) Overton, M. C.; Blumer, K. J. G-protein-coupled Receptors Function as Oligomers in Vivo. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 341–4.
- (139) Dinger, M. C.; Bader, J. E.; Kobor, A. D.; Kretschmar, A. K.; Beck-Sickinger, A. G. Homodimerization of Neuropeptide γ Receptors Investigated by Fluorescence Resonance Energy Transfer in Living Cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 10562–71.
- (140) Kunishima, N.; Shimada, Y.; Tsuji, Y.; Sato, T.; Yamamoto, M.; Kumasaka, T.; Nakanishi, S.; Jingami, H.; Morikawa, K. Structural Basis of Glutamate Recognition by a Dimeric Metabotropic Glutamate Receptor. *Nature* **2000**, *407*, 971–7.

- (141) Dann, C. E.; Hsieh, J. C.; Rattner, a; Sharma, D.; Nathans, J.; Leahy, D. J. Insights into Wnt Binding and Signalling from the Structures of Two Frizzled Cysteine-rich Domains. *Nature* **2001**, *412*, 86–90.
- (142) Armstrong, D.; Strange, P. G. Dopamine D2 Receptor Dimer Formation: Evidence from Ligand Binding. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22621–9.
- (143) George, S. R.; O’Dowd, B. F.; Lee, S. P. G-protein-coupled Receptor Oligomerization and Its Potential for Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug discovery* **2002**, *1*, 808–20.
- (144) Terrillon, S.; Cheng, L. L.; Stoev, S.; Mouillac, B.; Barberis, C.; Manning, M.; Durroux, T. Synthesis and Characterization of Fluorescent Antagonists and Agonists for Human Oxytocin and Vasopressin V1a Receptors. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2579–88.
- (145) Whorton, M. R.; Bokoch, M. P.; Rasmussen, S. G. F.; Huang, B.; Zare, R. N.; Kobilka, B.; Sunahara, R. K. A Monomeric G Protein-coupled Receptor Isolated in a High-density Lipoprotein Particle Efficiently Activates Its G Protein. *PNAS* **2007**, *104*, 7682–7687.
- (146) Duthey, B.; Caudron, S.; Perroy, J.; Bettler, B.; Fagni, L.; Pin, J.; Prézeau, L.; Pre, L. A Single Subunit (GB2) Is Required for G-protein Activation by the Heterodimeric GABA B Receptor. *J. Biol. Chem.* **2013**, *277*, 3236–3241.
- (147) Galvez, T.; Duthey, B.; Kniazeff, J.; Blahos, J.; Rovelli, G.; Bettler, B.; Prézeau, L.; Pin, J. P. Allosteric Interactions Between GB1 and GB2 Subunits Are Required for Optimal GABA(B) Receptor Function. *EMBO J.* **2001**, *20*, 2152–9.
- (148) Hlavackova, V.; Goudet, C.; Kniazeff, J.; Zikova, A.; Maurel, D.; Vol, C.; Trojanova, J.; Prézeau, L.; Pin, J.-P.; Blahos, J. Evidence for a Single Heptahelical Domain Being Turned on Upon Activation of a Dimeric GPCR. *EMBO J.* **2005**, *24*, 499–509.
- (149) Han, Y.; Moreira, I. S.; Urizar, E.; Weinstein, H.; Javitch, J. A. Allosteric Communication Between Protomers of Dopamine Class A GPCR Dimers Modulates Activation. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 688–695.
- (150) Maurice, P.; Kamal, M.; Jockers, R. Asymmetry of GPCR Oligomers Supports Their Functional Relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 514–20.
- (151) Maurice, P.; Daulat, A. M.; Mozo, J.; Clary, G.; Chafey, P.; Guillaume, J.; Ferry, G.; Boutin, J. A.; Delagrangé, P.; Camoin, L.; Jockers, R. A Generic Approach for the Purification of Signaling Complexes That Specifically Interact with the Carboxyl-terminal Domain of G Protein-coupled Receptors. *Mol. Cell Proteomics* **2008**, *7*, 1556–1569.
- (152) Damian, M.; Mary, S.; Martin, A.; Pin, J.; Banères, J. G Protein Activation by the Leukotriene B4 Receptor Dimer. Evidence for an Absence of Trans-activation. *J. Biol. Chem.* **2013**, *283*, 21081–92.

- (153) Jordan, B. A.; Trapaidze, N.; Gomes, I.; Nivarthi, R.; Devi, L. A. Oligomerization of Opioid Receptors with 2-adrenergic Receptors : A Role in Trafficking and Mitogen-activated Protein Kinase Activation. *PNAS* **2001**, *98*, 343–348.
- (154) Hillion, J.; Canals, M.; Casadó, V.; Scott, R.; Terasmaa, A.; Hansson, A.; Olah, M. E.; Mallol, J.; Enric, I.; Zoli, M.; Agnati, L. F.; Ibáñez, F.; Lluís, C.; Franco, R.; Fuxe, K.; Chem, J. B.; Torvinen, M.; Casado, V.; Watson, S.; Canela, E. I.; Iba, C. F.; Ferre, S. Coaggregation, Cointernalization, and Codesensitization of Adenosine A2A Receptors and Dopamine D2 Receptors. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 18091–7.
- (155) Devost, D.; Zingg, H. H. Homo- and Hetero-dimeric Complex Formations of the Human Oxytocin Receptor. *J. Neuroendocrinol.* **2004**, *16*, 372–7.
- (156) Albizu, L.; Cottet, M.; Kralikova, M.; Stoev, S.; Seyer, R.; Brabet, I.; Roux, T.; Bazin, H.; Bourrier, E.; Lamarque, L.; Breton, C.; Rives, M.-L.; Newman, A.; Javitch, J.; Trinquet, E.; Manning, M.; Pin, J.-P.; Mouillac, B.; Durroux, T. Time-resolved FRET Between GPCR Ligands Reveals Oligomers in Native Tissues. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 587–94.
- (157) Loison, S.; Cottet, M.; Orcel, H.; Adihou, H.; Rahmeh, R.; Lamarque, L.; Trinquet, E.; Kellenberger, E.; Hibert, M.; Durroux, T.; Mouillac, B.; Bonnet, D. Selective Fluorescent Nonpeptidic Antagonists for Vasopressin V₂ GPCR: Application to Ligand Screening and Oligomerization Assays. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8588–602.
- (158) Gal, C. S. An Overview of SR121463 , a Selective Non-Peptide Vasopressin V₂ Receptor Antagonist. **2001**, *19*, 201–214.
- (159) Ashworth, D.; Batt, A.; Baxter, A. Nonpeptide Oxytocin Agonists. *Drugs Fut.* **2006**, *31*, 345–353.
- (160) Yea, C. M.; Allan, C. E.; Ashworth, D. M.; Barnett, J.; Baxter, A. J.; Broadbridge, J. D.; Franklin, R. J.; Hampton, S. L.; Hudson, P.; Horton, J. a; Jenkins, P. D.; Penson, A. M.; Pitt, G. R. W.; Rivière, P.; Robson, P. a; Rooker, D. P.; Semple, G.; Sheppard, A.; Haigh, R. M.; Roe, M. B. New Benzylureas as a Novel Series of Potent, Nonpeptidic Vasopressin V₂ Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 8124–34.
- (161) Ashworth, D.; Pitt, G.; Hudson, P.; Yea, C.; Francklin, R. Preparation of Bicyclic Compounds as Vasopressin Agonists. WO 2001029005, 2001.
- (162) Yechezkel, T.; Salitra, Y.; Gilon, C. In Situ Generation of Fmoc-amino Acid Chlorides Using Bis-(trichloromethyl) Carbonate and Its Utilization for Difficult Couplings in Solid-phase Peptide Synthesis. *J. Pept. Sci.* **1999**, 507–517.
- (163) Batey, R.; Santhakumar, V.; Yoshinaishii, C.; Taylor, S. An Efficient New Protocol for the Formation of Unsymmetrical Tri- and Tetrasubstituted Ureas. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6267–6270.
- (164) Wiberg, K. B.; Rablen, P. R. Why Does Thioformamide Have a Larger Rotational Barrier Than Formamide? *J. Am. Chem. Soc* **1995**, *117*, 2201–2209.

- (165) Hou, T. J.; Xu, X. J. ADME Evaluation in Drug Discovery. 3. Modeling Blood-brain Barrier Partitioning Using Simple Molecular Descriptors. *J. chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 2137–52.
- (166) Sanborn, B. M. Hormones and Calcium : Mechanisms Controlling Uterine Smooth Muscle Contractile Activity. *Exp. Physiol.* **2001**, *86.2*, 223–237.
- (167) Gravati, M.; Busnelli, M.; Bulgheroni, E.; Reversi, A.; Spaiardi, P.; Parenti, M.; Toselli, M.; Chini, B. Dual Modulation of Inward Rectifier Potassium Currents in Olfactory Neuronal Cells by Promiscuous G Protein Coupling of the Oxytocin Receptor. *J. Neurochem.* **2010**, *114*, 1424–35.
- (168) Rimoldi, V.; Reversi, A.; Taverna, E.; Rosa, P.; Francolini, M.; Cassoni, P.; Parenti, M.; Chini, B. Oxytocin Receptor Elicits Different EGFR/MAPK Activation Patterns Depending on Its Localization in Caveolin-1 Enriched Domains. *Oncogene* **2003**, *22*, 6054–60.
- (169) Reversi, A.; Cassoni, P.; Chini, B. Oxytocin Receptor Signaling in Myoepithelial and Cancer Cells. *J. Mammary Gland Biol.* **2005**, *10*, 221–9.
- (170) Cassoni, P.; Marrocco, T.; Deaglio, S.; Sapino, A.; Bussolati, G. Biological Relevance of Oxytocin and Oxytocin Receptors in Cancer Cells and Primary Tumors. *Ann. Oncol.* **2001**, *12*, 37–39.
- (171) Reversi, A.; Rimoldi, V.; Cassoni, P.; Bussolati, G.; Parenti, M.; Chini, B.; Marrocco, T. The Oxytocin Receptor Antagonist Atosiban Inhibits Cell Growth via a “ Biased Agonist ” Mechanism. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16311–16318.
- (172) Busnelli, M.; Saulière, A.; Manning, M.; Bouvier, M.; Galés, C.; Chini, B. Functional Selective Oxytocin-derived Agonists Discriminate Between Individual G Protein Family Subtypes. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 3617–29.
- (173) Rahmeh, R.; Damian, M.; Cottet, M.; Orcel, H.; Mendre, C.; Durroux, T.; Sharma, K. S.; Durand, G.; Pucci, B.; Trinquet, E.; Zwier, J. M.; Deupi, X.; Bron, P.; Banères, J.-L.; Mouillac, B.; Granier, S. Structural Insights into Biased G Protein-coupled Receptor Signaling Revealed by Fluorescence Spectroscopy. *PNAS* **2012**, *109*, 6733–8.
- (174) Manning, M.; Misicka, A.; Olma, A.; Bankowski, K.; Stoev, S.; Chini, B.; Durroux, T.; Mouillac, B.; Corbani, M.; Guillon, G. Oxytocin and Vasopressin Agonists and Antagonists as Research Tools and Potential Therapeutics. *J. Neuroendocrinol.* **2012**, *24*, 609–28.
- (175) Borthwick, A. D. 2.5-diketopiperazine Synthesis Reactions Medicinal Chemistry and Bioactive Natural Products. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3641–3716.
- (176) Marcaurelle, L. A.; Foley, M. A. The Evolving Role of Molecular Diversity in Drug Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 285–288.

- (177) Daugan, A.; Grondin, P.; Ruault, C.; Le Monnier de Gouville, A.-C.; Coste, H.; Linget, J. M.; Kirilovsky, J.; Hyafil, F.; Labaudinière, R. The Discovery of Tadalafil: a Novel and Highly Selective PDE5 Inhibitor. 2: 2,3,6,7,12,12a-hexahydropyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-b]indole-1,4-dione Analogues. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4533–42.
- (178) Brooks, T. D.; Wang, S. W.; Brünner, N.; Charlton, P. A. XR5967, a Novel Modulator of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Activity, Suppresses Tumor Cell Invasion and Angiogenesis in Vitro. *Anti Cancer Drug.* **2004**, *15*, 37–44.
- (179) Da Ressurreição, A. S. M.; Vidu, A.; Civera, M.; Belvisi, L.; Potenza, D.; Manzoni, L.; Ongeri, S.; Gennari, C.; Piarulli, U. Cyclic RGD-peptidomimetics Containing Bifunctional Diketopiperazine Scaffolds as New Potent Integrin Ligands. *Chemistry* **2009**, *15*, 12184–8.
- (180) Ressurreição, A. S. M.; Bordessa, A.; Civera, M.; Belvisi, L.; Gennari, C.; Piarulli, U. Synthesis and Conformational Studies of Peptidomimetics Containing a New Bifunctional Diketopiperazine Scaffold Acting as a Beta-hairpin Inducer. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 652–60.
- (181) Teixidó, M.; Zurita, E.; Prades, R.; Tarrago, T.; Giralt, E. A Novel Family of Diketopiperazines as a Tool for the Study of Transport Across the Blood-brain Barrier (BBB) and Their Potential Use as BBB-shuttles. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *611*, 227–8.
- (182) Pinnen, F.; Luisi, G.; Calcagni, A.; Lucente, G.; Gavuzzo, E.; Cerrini, S. Approaches to Pseudopeptidic Ergopeptines. Part 2. Consequences of the Incorporation of an β -azaproline Residue into the Oxacyclic System. *J. Chem. Soc. Perk. T. 1* **1994**, 1611.
- (183) Bourguet, C. B.; Proulx, C.; Klocek, S.; Sabatino, D.; Lubell, W. D. Solution-phase Submonomer Diversification of Aza-dipeptide Building Blocks and Their Application in Aza-peptide and aza-DKP Synthesis. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 284–96.
- (184) Obreza, A.; Urleb, U. A Two-Step Synthesis of Hexahydropyrrolo-[1,2-d][1,2,4]triazine-1,4-dione and Related Compounds. *Synthetic Commun.* **2003**, *33*, 1011–1018.
- (185) Hoffman, R. V.; Reddy, M. M.; Klumas, C. M.; Cervantes-Lee, F. The Reactions of Hydrazines with α -Lactams. Regiochemistry of Hydrazine Addition and Subsequent Ring Closure to N -Aminohydantoin or 1,2,4-Triazine-3,6-diones. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9128–9130.
- (186) Hamuro, Y.; Marshall, W. J.; Scialdone, M. a. Solid-Phase Synthesis of Acyclic and Cyclic Amino Acid Derived Urea Peptidomimetics Using Phoxime Resin †. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 163–172.
- (187) 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 Deliver. Rev.* **2001**, *46*, 3–26.

- (188) Bonnet, D.; Margathe, J.-F.; Radford, S.; Pflimlin, E.; Riché, S.; Doman, P.; Hibert, M.; Ganesan, A. Combinatorial Aid for Underprivileged Scaffolds: Solution and Solid-phase Strategies for a Rapid and Efficient Access To Novel Aza-diketopiperazines (Aza-DKP). *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 323–334.
- (189) Löser, R.; Schilling, K.; Dimmig, E.; Gütschow, M. Interaction of Papain-like Cysteine Proteases with Dipeptide-derived Nitriles. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7688–707.
- (190) Gaggini, F.; Porcheddu, A.; Reginato, G.; Rodriguez, M.; Taddei, M. Colorimetric Tools for Solid-phase Organic Synthesis. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 805–10.
- (191) Treu, M.; Jordis, U. 2-Bromo-5-hydroxy-4-methoxybenzenemethanol. *Molbank* **2002**, 293.
- (192) Strojny, R. A.; White, H. C.; Strojny, E. J. Ammonolysis of 2,5-Dichlorovaleric Acid and Some Related Chloro Acids. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 1241–1244.
- (193) Langmuir, I. The Structure of Atoms and the Octet Theory of Valence. *PNAS* **1919**, *5*, 252–9.
- (194) Erlenmeyer, H.; Leo, M. Uber Pseudoatome. *Helv. Chim. Acta* **1932**, *15*, 1171–1186.
- (195) Friedman, H. L. Influence of Isosteric Replacements Upon Biological Activity. *NASNRS* **1951**, *206*, 295–358.
- (196) Salunke, S. B.; Babu, N. S.; Chen, C.-T. Asymmetric Aerobic Oxidation of α -Hydroxy Acid Derivatives Catalyzed by Reusable, Polystyrene-Supported Chiral N-Salicylidene Oxidovanadium tert-Leucinates. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1234–1240.
- (197) Gobbi, L.; Knust, H.; Malherbe, P.; Nettekoven, M.; Pinard, E.; Roche, O. Aminoamides as Orexin Antagonists. WO2008107335A1, 2008.
- (198) Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. a.; Shah, R. D. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures(1). *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3849–3862.
- (199) Pohlmann, A.; Guillaume, D.; Quirion, J.; Husson, H. Stereoselective Synthesis of 1,3-disubstituted Hexahydro-1,4-diazepin-2-ones. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5809–5810.
- (200) Kim, H. J.; Chang, J.; Shin, E.; Park, Y. S. Dynamic Resolution of α -Bromo Tertiary Amides for Stereoselective Preparation of Dipeptide Analogues. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2005**, *26*, 273–277.
- (201) Iden, H. S.; Lubell, W. D. Syntheses via Homoallylic Ketones from Cascade Addition of Vinyl Grignard Reagent to *r*-Aminoacyl- -amino Esters. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3425–3428.

- (202) Biftu, T.; Feng, D.; Qian, X.; Liang, G.-B.; Kieczkowski, G.; Eiermann, G.; He, H.; Leiting, B.; Lyons, K.; Petrov, A.; Sinha-Roy, R.; Zhang, B.; Scapin, G.; Patel, S.; Gao, Y.-D.; Singh, S.; Wu, J.; Zhang, X.; Thornberry, N. a; Weber, A. E. (3R)-4-[(3R)-3-Amino-4-(2,4,5-trifluorophenyl)butanoyl]-3-(2,2,2-trifluoroethyl)-1,4-diazepan-2-one, a Selective Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2007**, *17*, 49–52.
- (203) Liang, G.-B.; Qian, X.; Feng, D.; Biftu, T.; Eiermann, G.; He, H.; Leiting, B.; Lyons, K.; Petrov, A.; Sinha-Roy, R.; Zhang, B.; Wu, J.; Zhang, X.; Thornberry, N. a; Weber, A. E. Optimization of 1,4-diazepan-2-one Containing Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitors for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2007**, *17*, 1903–7.
- (204) Brea, R. J.; Lo, M. P.; Castedo, L.; Granja, J. R. Acid by Sonogashira-Type Reactions in Aqueous Media Mild Conditions Are Described That Allow the Palladium- Catalyzed Cross-coupling of C R -alkynylated Glycine with a Wide Variety of Electron-rich and Electron-poor Aryl and the Use of Simple Peptides In. *J. Org. chem.* **2006**, *71*, 7870–7873.
- (205) Taj, R. a; Green, J. R. Nicholas Reactions in the Construction of Cyclohepta[de]naphthalenes and Cyclohepta[de]naphthalenones. The Total Synthesis of Microstegiol. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8258–70.
- (206) Tian, X.; Switzer, A. G.; Derose, S. a; Mishra, R. K.; Solinsky, M. G.; Mumin, R. N.; Ebetino, F. H.; Jayasinghe, L. R.; Webster, M. E.; Colson, A.-O.; Crossdoersen, D.; Pinney, B. B.; Farmer, J. a; Dowty, M. E.; Obringer, C. M.; Cruze, C. a; Burklow, M. L.; Suchanek, P. M.; Dong, L.; Dirr, M. K.; Sheldon, R. J.; Wos, J. a Discovery of Orally Bioavailable 1,3,4-trisubstituted 2-oxopiperazine-based Melanocortin-4 Receptor Agonists as Potential Antiobesity Agents. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6055–66.
- (207) Bowman, W. R.; Coghlan, D. R. A Facile Method for the N-Alkylation of alpha-Amino Esters. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15787–15798.
- (208) Carlier, P. R.; Chow, E. S.-H.; Barlow, R. L.; Bloomquist, J. R. Discovery of Non-zwitterionic GABA(A) Receptor Full Agonists and a Superagonist. *Biorg. Med. Chem. Letters* **2002**, *12*, 1985–8.
- (209) Fujii, N.; Otaka, A.; Ikemura, O.; Hatano, M.; Okamachi, A.; Funakoshi, S.; Sakurai, M.; Shioiri, T.; Yajima, H. Studies on Peptides. CLII. Hard Acid Deprotecting Procedure for Peptide Synthesis. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 3447–52.
- (210) Boeglin, D.; Lubell, W. D. Aza-amino Acid Scanning of Secondary Structure Suited for Solid-phase Peptide Synthesis with Fmoc Chemistry and Aza-amino Acids with Heteroatomic Side Chains. *J. Comb. Chem.* **7**, 864–78.
- (211) Lee, H.-J.; Song, J.-W.; Choi, Y.-S.; Park, H.-M.; Lee, K.-B. A Theoretical Study of Conformational Properties of N-methyl Azapeptide Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11881–93.

- (212) Cotton, R.; Gilles, M. B. Solid Phase Peptide Synthesis. EP 0518655B1, 1997.
- (213) Robinson, B. S.; Riccardi, K. A.; Gong, Y.; Guo, Q. I.; Stock, D. A.; Blair, W. S.; Terry, B. J.; Deminie, C. A.; Djang, F.; Colonno, R. J.; Lin, P.; Cao, Y.; Hurley, A.; Schluger, R.; Monard, S.; Kerr, B.; Anderson, R.; Eastman, S.; Ho, D. D.; Al, R. E. T.; Hemother, A. N. A. G. C. BMS-232632 , a Highly Potent Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitor That Can Be Used in Combination with Other Available Antiretroviral Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2093–2099.
- (214) Lopez Areiza, J. J.; Rueckle, T.; Soto-Jara, C. Aza-peptides. WO 2004/050689 A2, 2004.
- (215) Dugave, C.; Demange, L. Synthesis of Pseudopeptides Containing Aza-phenylalanine Surrogates of the Phe-pNA Motif : Influence on the Binding to the Human Cyclophilin hCyp-18. *Lett. Pept. Sci.* **2003**, *10*, 1–9.
- (216) Huang, N.; Kolhatkar, R.; Eyobo, Y.; Sorci, L.; Rodionova, I.; Osterman, A. L.; Mackerell, A. D.; Zhang, H. Complexes of Bacterial Nicotinate Mononucleotide Adenylyltransferase with Inhibitors: Implication for Structure-based Drug Design and Improvement. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5229–39.
- (217) Grzyb, J.; Shen, M.; Yoshina-Ishii, C.; Chi, W. Carbamoylimidazolium and Thiocarbamoylimidazolium Salts: Novel Reagents for the Synthesis of Ureas, Thioureas, Carbamates, Thiocarbamates and Amides. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7153–7175.
- (218) Zheng, C.; Combs, A. P. A General Method for the Solid-phase Synthesis of Unsymmetrical Tri- and Tetrasubstituted Ureas. *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 38–43.
- (219) Thakkar, A.; Trinh, T. B.; Pei, D. Global Analysis of Peptide Cyclization Efficiency. *ACS Comb. Sci.* **2013**, *15*, 120–9.
- (220) Van der Plas, S. E.; De Clercq, P. J.; Madder, A. Fast and Easy Detection of Aromatic Amines on Solid Support. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2587–2589.

Conception et synthèse de sondes fluorescentes et d'agonistes des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine : application mécanistique et thérapeutique.

Résumé

Conception et synthèse de sondes fluorescentes et d'agonistes des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine : application mécanistique et thérapeutique.

Les récepteurs couplés aux protéines G constituent la plus grande famille de protéines membranaires et interviennent dans de nombreux processus physiologiques. La compréhension de l'interaction ligand-récepteur d'un point de vue mécanistique mais également thérapeutique est cruciale. Appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine ont été choisis comme modèle d'étude. Ces hormones jouent un rôle important dans la modulation de l'attachement et de l'affect chez les mammifères. Afin d'accélérer la découverte de ligands ocytocinergiques et d'explorer les mécanismes fondamentaux de leurs interactions, nous avons conçu les premiers ligands fluorescents non peptidiques des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et de l'ocytocine. Ces ligands ont été utilisés pour développer des tests de liaisons par TR-FRET et démontrer la dimérisation des récepteurs de la vasopressine V_{1a} et V_2 sur cellules. Des études autour de petites plates-formes dérivées d'aza-dicétopipérazine ont permis d'accéder à un nouvel antagoniste non peptidique du récepteur de l'ocytocine. L'optimisation de dérivés benzodiazépines ocytocinergiques par des études de relations structure-activité a permis d'identifier les meilleurs agonistes non peptidiques du récepteur de l'ocytocine à ce jour. Une étude *in vivo* chez la souris et chez le singe est amorcée pour apporter dans un futur, une solution thérapeutique aux problèmes d'interaction sociale en général et d'autisme en particulier.

Mots clés : récepteurs couplés aux protéines G, ocytocine, vasopressine, ligands non peptidiques, relations structure-activité, ligands fluorescents, TR-FRET, criblage à haut débit.

Abstract

Design, synthesis and pharmacological evaluation of fluorescent probes and non-peptide agonists for oxytocin and vasopressin receptors: therapeutic and mechanistic applications.

G protein coupled receptors are the largest membrane protein family and play an important role in a large number of physiological processes. The comprehension of the ligand-receptor interaction from a mechanistic point of view but also for therapeutic use is crucial. Belonging to the G protein coupled receptors, the oxytocin and vasopressin receptors have been used as a model system. These two hormones play an important role in the modulation of attachment and affect in mammals. To accelerate the discovery of new ligands for oxytocin and vasopressin receptors and to explore the fundamental role of their interactions, we designed the first non-peptide fluorescent ligands for oxytocin and vasopressin V_{1a} receptors. These ligands have been used to develop new binding tests based on TR-FRET technology and to prove the V_{1a} and V_2 receptor dimerisation. In parallel, we developed a new non-peptide oxytocin antagonist around an aza-diketopiperazine platform. . Optimization of benzodiazepine derivatives enables us to identify the best non-peptide oxytocin agonists to date. *In vivo* studies in mice and monkeys are initiated to bring in the future a therapeutic solution to social interaction problems in general and autism in particular

Key-words: G protein-coupled receptors, oxytocin, arginine-vasopressin, non-peptide ligands, structure-activity relationships, fluorescent ligands, TR-FRET, high-throughput screening.

