



HAL
open science

Synthèse de nouveaux inducteurs chimiques de la maladie de Parkinson : étude relation structure/activité

Narimane Zeghib

► **To cite this version:**

Narimane Zeghib. Synthèse de nouveaux inducteurs chimiques de la maladie de Parkinson : étude relation structure/activité. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Est, 2016. Français. NNT : 2016PESC1168 . tel-01459525

HAL Id: tel-01459525

<https://theses.hal.science/tel-01459525v1>

Submitted on 7 Feb 2017

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.



UNIVERSITÉ —
— PARIS-EST



Thèse de doctorat de l'Université Paris Est
Ecole doctorale SIE : Sciences, Ingénierie et Environnement
Spécialité : Chimie médicinale

Présentée par :
Narimane ZEGHBIB

Pour obtenir le grade de :
Docteur de l'Université Paris-Est

Sujet de la thèse :

**Synthèse de nouveaux inducteurs chimiques de la maladie de Parkinson
Etude relation structure-activité**

*Thèse dirigée par le Professeur Thierry Martens
et Co-encadrée par le Docteur Michaël Rivard*

Soutenue publiquement le 14 avril 2016 devant le jury composé de :

Pr. Jean-Pierre HURVOIS	Université Rennes 1	Rapporteur
Dr. Samir MESSAOUDI	Université Paris Sud	Rapporteur
Dr. Emmanuel BROUILLET	Commissariat à Energie Atomique	Examineur
Dr. Christophe MORIN	Université Paris-Est Créteil	Examineur
Dr. Michaël RIVARD	Université Paris-Est Créteil	Co-encadrant de thèse
Pr. Thierry MARTENS	Université Paris-Est Créteil	Directeur de thèse

*« Chaque difficulté rencontrée doit être l'occasion d'un
nouveau progrès »*

Pierre de Coubertin

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Michel Latroche, directeur de l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est de m'avoir accueillie au sein de celui-ci.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements au Pr. Thierry Martens, directeur de l'équipe ESO et directeur de thèse, pour m'avoir offert l'opportunité de travailler sur un projet scientifique particulièrement intéressant et stimulant. Grâce à lui, j'ai eu l'occasion de faire des choses passionnantes et variées durant ces trois années. Je le remercie pour le partage de son expérience, de ses conseils avisés et pour sa grande gentillesse.

J'adresse toute ma gratitude au Dr. Michaël Rivard, co-encadrant de thèse, qui m'a soutenue, encouragée et s'est toujours montré disponible durant ces trois années. Etant de nature plutôt pessimiste, j'ai souvent douté de moi mais il a toujours su trouvé les mots pour m'encourager avec son fameux : « tu ne vas pas pleurer avant d'avoir mal ». Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Les mots ne sauraient exprimer toute ma reconnaissance. Un grand Merci.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr. Samir Messaoudi et au Pr. Jean-Pierre Hurvois, pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi qu'au Dr. Emmanuel Brouillet d'en être l'examineur.

Je tiens à remercier le Dr. Christophe Morin et le Pr. Laure Garrigue-Antar, ils ont su me transmettre leur passion de la biologie, leur savoir, leur confiance, je leur en suis particulièrement reconnaissante. J'en profite pour remercier toute l'équipe du CRRET, de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire, moi une « chimiste », merci à Dulce Papy, directrice du laboratoire.

Je témoigne toute ma gratitude à Isabelle Lachaise, responsable de la Plateforme Chromatographique Analytique et semi-préparative, pour sa gentillesse, le temps passé pour les analyses de LC-MS, les purifications par CPC, ses conseils, sa joie de vivre m'ont permis de garder le sourire même quand ça n'allait pas toujours. Je la remercie également de m'avoir permis d'utiliser la FAMEUSE SPOT II FLASH, ma grande amie durant ses trois années, je ne compte même plus les heures passées devant cette machine. Un grand merci Isabelle.

Mes remerciements vont également à Patrice Renevret, technicien de la plateforme analytique, pour sa sympathie, sa disponibilité au quotidien, sa connaissance des techniques analytiques qu'il a su m'enseigner avec patience, ce travail n'aurait clairement pas été pareil sans lui.

J'adresse également mes remerciements à Christine Jakubowicz, qui a quitté le laboratoire, merci pour ses analyses de GC-MS, sa grande sagesse et sa bonne humeur au quotidien.

Je remercie Christine Gaillet, de la plateforme RMN, pour sa disponibilité.

Merci aux étudiants qui ont participé à ce travail : Vincent, Sébastien, Paul et Marjorie.

Merci au Dr. Céline Laurencé, d'avoir initié ce travail de recherche, de m'avoir formée au tout début de ma thèse à la culture cellulaire, de m'avoir amenée avec elle aux RICT, à Nice, c'était vraiment une semaine qui restera gravée dans ma tête et merci pour ses précieux conseils.

Je remercie également mon colocataire de bureau : Jérôme Paul, même s'il est impatient de me voir quitté son « futur bureau », merci pour ses blagues (pas toujours bonnes), sa bonne humeur, même s'il m'a mal menée durant ces années, notamment en me charriant sur mon nez, c'est une personne toujours prête à rendre service. Je remercie ma bande de copines du labo : Pricilia Kutudila, ma copine de shopping, et Alicia Delory, pour leur sympathie, j'espère sincèrement qu'on continuera de se voir après cette thèse.

Merci également aux maîtres de conférence :

Stéphane Sengmany, qui a été pour moi comme un second encadrant, toujours prêt à rendre service, une personne vraiment formidable comme il en existe peu,

Christophe Pichon, le spécialiste de la RMN, merci pour ses lectures fines des spectres, ses élucidations structurales, un grand merci également pour ses conseils,

Marc Pesset, le bilingue, le génie du labo, merci pour tes précieux conseils, et oui je dois l'avouer tu as toujours raison.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers Gladys Bernari, secrétaire gestionnaire, pour son efficacité, sa bonne humeur. Je remercie également les autres membres de l'équipe ESO : le Pr. Eric Léonel, le Pr. Erwan Le Gall, le Pr. Sylvie Condon, le Dr. Michaël Davi, Pascal

Thomas, Charles Skarbek, et tous ceux que j'ai eu l'occasion de côtoyer durant ces trois années et qui ont quitté le laboratoire : Anthony, Hajer, Laura, Souhila, Antoine.

J'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à mes parents, merci de m'avoir accueillie au sein de leur famille, merci pour leur tendresse. Je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts qu'ils ont fait pour mon éducation.

Merci à mes frères: Youcef et Yacine, et surtout à ma petite sœur Myriam, que j'aime de tout mon cœur. Merci à ma belle-famille : Walid, Yacine, Papa Ben, Manel, Mamassa, Dida, Farid, Souad, ma belle-sœur que j'adore : Katia et surtout à ma belle-mère d'amour, merci, pour son soutien au quotidien durant ces trois années, un grand Merci.

Je remercie également mon mari, Lotfi et mon fils, Amine, pour leur amour, je vous aime.

Enfin, je souhaite dédier ce travail de doctorat à ma mère, partie trop tôt, et j'espère sincèrement que, du monde qui est le sien maintenant, elle appréciera cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qu'elle n'a malheureusement pas eu le temps de connaître.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	4
Abréviations	10
Introduction générale	14
Partie I : Etude de la maladie de Parkinson	16
Chapitre I : La maladie de Parkinson	18
I. Description	18
I.1 Atteinte dopaminergique	19
I.1.1 Biosynthèse, catabolisme et rôle de la DA	19
I.1.2 Dopamine et MP	22
I.2 Les corps de Lewy et dégénérescence des neurones dopaminergiques	22
II. Etiologie	24
II.1 Formes génétiques	24
II.2 Formes sporadiques	24
II.2.1 Historique	24
II.2.2 Exposition à des toxines	26
II.3 Combinaison facteurs génétiques et exposition à des toxines	26
III. Symptomatologie	27
III.1 Symptomatologie motrice	27
III.1.1 Le tremblement de repos.....	27
III.1.2 Bradykinésie	28
III.1.3 L'hypertonie (rigidité musculaire)	28
III.2 Symptomatologie non-motrice	29
IV. Pathogénèse	29

IV.1	L'hypothèse de l'α-synucléine.....	30
IV.2	L'hypothèse du stress oxydant et de la mitochondrie	31
IV.2.1	La chaîne respiratoire mitochondriale	32
IV.2.2	Homéostasie redox	33
IV.2.3	Altération du complexe I de CRM et production d'EROs	34
IV.2.4	Voie intrinsèque de l'apoptose	36
IV.3	Conclusion	37
V.	Approches thérapeutiques.....	37
V.1	Médicaments visant à combler le déficit en DA	38
V.1.1	La lévodopa	38
V.1.2	Les inhibiteurs de la dégradation de la DA.....	39
V.2	Médicaments n'agissant pas par l'intermédiaire de la DA	39
V.2.1	Les agonistes dopaminergiques	39
V.2.2	Les antagonistes	40
V.3	Conclusions	40
Chapitre II : Contexte et Problématique.....		42
I.	Les modèles de la MP	42
I.1	Nécessité de modèles d'étude de la MP	42
I.2	Modèles génétiques	43
I.2.1	Gènes impliqués dans la MP	43
I.2.2	Modèles génétiques animaux de la MP	44
I.3	Modèles chimiques	47
I.3.1	Modèles d'intoxication à la 6-OHDA	48
I.3.2	Modèle d'intoxication aux pesticides.....	50
I.3.3	Modèle d'intoxication au MPTP	53
II.	Propriétés et utilisations des pyridiniums.....	59
II.1	Propriété tensioactive	59
II.1.1	Utilisation en tant qu'agents antimicrobiens.....	59
II.1.2	Autres utilisations.....	62
II.2	Autres propriétés	63
II.2.1	Transport de principes actifs.....	63
II.2.2	Additifs alimentaires	64

II.2.3	Electrolyte pour batterie lithium.....	65
III.	<i>Analogues du MPP⁺ et étude de la MP</i>	65
III.1	Historique	65
III.2	Modifications structurales du MPP⁺	66
III.3	Etude des propriétés inductrices des analogues du MPP⁺	67
III.3.1	Inhibition du complexe I de la CRM	68
III.3.2	Accumulation dans la mitochondrie	76
III.3.3	Affinité pour le DAT	79
III.3.4	Conclusions	84
IV.	<i>Résultats préliminaires</i>	85
IV.1	Contexte	85
IV.2	Accès au pyridinium du Furosémide[®] (PF)	86
IV.2.1	Oxydation électrochimique	86
IV.2.2	Hydrolyse acide	87
IV.3	Etudes toxicologiques du PF	88
IV.3.1	Etudes <i>in vitro</i>	88
IV.3.2	Etudes <i>in vivo</i>	92
IV.4	Conclusion	93
V.	<i>Objectifs</i>	93
	<i>Partie II : Préparation des N-aryle pyridiniums</i>	96
	<i>Chapitre I : Préparation des N-aryle pyridiniums non hydroxylés</i>	100
I.	<i>Préparation des N-aryle pyridiniums non hydroxylés à partir de pyriliams</i>	100
I.1	Historique	100
I.2	Synthèse des N-aryle pyridiniums	101
I.2.1	Mécanisme réactionnel.....	101
I.2.2	Synthèse	101
II.	<i>Préparation des N-arylepyridiniums non hydroxylés à partir de quinones</i>	103
III.	<i>Préparation des N-aryle pyridiniums non hydroxylés par la réaction de Zincke</i>	104
III.1	Historique	104

III.2	Mécanisme réactionnel	105
III.3	Synthèse des <i>N</i>-aryle pyridiniums	107
III.3.1	Préparation du sel de Zincke	107
III.3.2	Accès aux sels de pyridinium par la réaction de Zincke	110
III.3.3	Variantes à la réaction de Zincke	113
III.3.4	Activations non conventionnelles de la réaction de Zincke	122
Chapitre II : Préparation des <i>N</i>-aryle pyridiniums 3-hydroxylés		138
I.	Préparation des <i>N</i>-aryle pyridiniums 3-hydroxylés par la réaction de Zincke	138
I.1	Rappels bibliographiques.....	138
I.2	Résultats et discussion	139
II.	Préparation one pot des <i>N</i>-aryle pyridiniums 3-hydroxylés	141
II.1	Historique	141
II.2	Synthèse de <i>N</i> -aryl pyridiniums 3-hydroxylés	142
III.	Préparation des <i>N</i>-aryle pyridiniums 3-hydroxylés par réaction multi-étapes	144
III.1	Oxydation de noyaux furanes : rappels bibliographiques	144
III.1.1	Réaction d' <i>Aza</i> -Achmatowicz	145
III.1.2	Oxydation de noyaux furane conduisant à la formation de 3-hydroxypyridiniums.....	146
III.2	L'oxydation du noyau furane du Furosémide®	149
III.2.1	Oxydation chimique du Furosémide®	149
III.2.2	Oxydation électrochimique du Furosémide®	151
III.2.3	Accès au 3-hydroxypyridinium issu du Furosémide®	153
III.3	Résultats et discussion	153
III.3.1	Amination réductrice	154
III.3.2	Oxydation du noyau furane.....	158
III.3.3	Protection de la fonction amine des composés 8	166
III.3.4	Oxydation anodique sélective des noyaux furane	171
III.3.5	Accès aux 3-hydroxypyridiniums.....	186
Partie III : Evaluation toxicologique des <i>N</i>-aryle pyridiniums.....		191
I.	Etude d'inhibition du complexe I.....	195
I.1	Dosage de l'activité du complexe I	195
I.1.1	Réaction d'oxydation du NADH en NAD ⁺	195

I.1.2	Dosage spectrophotométrique de l'activité du complexe I	196
I.1.3	Résultats et discussion	196
I.2	Dosage de l'activité des complexes I à III	198
I.2.1	Réaction de réduction du cytochrome c oxydé.....	198
I.2.2	Dosage spectrophotométrique de l'activité des complexes I à III	199
I.2.3	Résultats et discussion	199
II.	Etudes <i>in cellulo</i> : production d'EROs et viabilité cellulaire	204
II.1	Lignée cellulaire neuroblastique humaine SH-SY5Y.....	204
II.2	Quantification de la production d'EROs.....	204
II.3	Quantification de la viabilité cellulaire	205
II.4	Résultats et discussion	206
II.4.1	Influence du substituant porté par le noyau phényle dans le cas des <i>N</i> -aryle pyridiniums non hydroxylés.....	207
II.4.2	Influence du substituant 3-hydroxyle sur l'activité <i>in cellulo</i>	208
III.	Conclusions et perspectives.....	210
III.1	Conclusions.....	210
III.1.1	Résumé de l'étude de relation structure/activité	210
III.1.2	Modulation de la neurotoxicité des pyridiniums 3-hydroxylés.....	212
III.2	Perspectives.....	213
	Partie IV : Partie expérimentale	215
	Chapitre I : Partie expérimentale relative à la Partie II.....	217
I.	Méthodes d'analyse	217
II.	Procédures générales	219
III.	Préparation et description des produits.....	223
	Chapitre II : Partie expérimentale relative à la.....	325
	Partie III.....	325
I.	Matériel	325
II.	Protocoles expérimentaux	327
II.1	Culture cellulaire	327

II.1.1	Ensemencement des cellules SH-SY5Y	327
II.1.2	Exposition des SH-SY5Y aux composés à tester	328
II.2	Quantification des EROs	329
II.3	Quantification de la viabilité cellulaire	329
II.4	Dosage de l'activité du complexe I	329
II.4.1	Extraction et préparation des échantillons de mitochondries cérébrales	329
II.4.2	Dosage protéique par la méthode au BCA	330
II.4.3	Dosage de l'activité du complexe I	331
II.4.4	Dosage de l'activité des complexes I à III	332
Résumé.....		334
Abstract.....		335

Abréviations

✓ MP	Maladie de Parkinson
✓ 6-OHDA	6-hydroxy-dopamine
✓ AD	Aldéhyde déshydrogénase
✓ ADN	Acide désoxyribonucléique
✓ ADP	Adénosine diphosphate
✓ Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
✓ aq.	aqueux
✓ Ar	Aryle
✓ ATP	Adénosine-5'-triphosphate
✓ BHE	Barrière hémato-encéphalique
✓ Bn	Benzyle
✓ Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
✓ BSA	Albumine sérique bovine
✓ CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
✓ COMT	Catéchol- <i>O</i> -méthyl-transférase
✓ CoQ	Ubiquinone
✓ CoQH ₂	Ubiquinol
✓ COSY	Correlation Spectroscopy : Corrélation 2D RMN ¹ H/ ¹ H ⁿ J
✓ CPG	Chromatographie en phase gazeuse
✓ CRM	Chaîne respiratoire mitochondriale
✓ CTEI	Chaîne de transport d'électrons isolée
✓ Cy	Cyclohexyle
✓ DA	Dopamine
✓ DAT	Dopamine Active Transporter
✓ DMSO	Diméthylsulfoxyde
✓ DNP	2,4-dinitrophényle
✓ DOPA	Dihydroxyphénylalanine

✓ ECS	Electrode au calomel saturée en KCl
✓ éq.	équivalent
✓ EROs	espèces réactives de l'oxygène
✓ Et	Ethyle
✓ FAD	Flavine adénine dinucléotide
✓ FMN	Flavine mononucléotide
✓ GP	Groupement protecteur
✓ HMBC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence: Corrélation 2D RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ^2J et ^3J
✓ HPMP	4-hydroxy-4-phényl- <i>N</i> -méthylpipéridine
✓ HRMS	Hight Resolution Mass Spectroscopy
✓ HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence: Corrélation 2D RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ^1J
✓ HVA	Acide homovalinique
✓ IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
✓ ICOMT	Inhibiteurs de la COMT
✓ IDDC	Inhibiteurs de la Dopa-décarboxylase périphérique
✓ IMAO-B	Inhibiteurs de la MAO-B
✓ IR	Infra-rouge
✓ LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy
✓ L-Dopa	Lévodopa
✓ LRMS	Low Resolution Mass Spectroscopy
✓ M	Molaire
✓ <i>m</i> -	<i>mé</i> ta (position relative 1,3 d'un noyau aryle disubstitué)
✓ MAO	Monoamine oxydase
✓ <i>m</i> -CPBA	Acide <i>mé</i> ta-chloroperbenzoïque
✓ ME	Mitochondrie entière
✓ Me	Méthyle
✓ MO	Micro-ondes
✓ MPDP ⁺	<i>N</i> -méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium
✓ MPP ⁺	<i>N</i> -methyl-4-phenylpyridinium
✓ MPPP	1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine

✓ MPTP	<i>N</i> -methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine
✓ MS	Mass Spectroscopy
✓ NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
✓ NIH	National Institute of Health
✓ NMP	<i>N</i> -méthyl-4-pipéridone
✓ <i>o</i> -	<i>ortho</i> (position relative 1,2 d'un noyau aryle disubstitué)
✓ <i>p</i> -	<i>para</i> (position relative 1,4 d'un noyau aryle disubstitué)
✓ PF	Pyridinium issu de l'oxydation du Furosémide®
✓ Pi	Phosphate inorganique
✓ pKa	Constante logarithmique d'acidité
✓ Pr	Propyle
✓ rdt	Rendement
✓ réf.	Référence
✓ RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
✓ SN	Substance noire
✓ S _N (ANRORC)	Nucleophilic Substitution by Adding the Nucleophile, Ring Opening, and Ring Closure
✓ S _N Ar	Substitution nucléophile aromatique
✓ SNc	Substantia nigra pars compacta
✓ TA	Temperature ambiante
✓ t-Bu	<i>tert</i> -butyle
✓ TFA	Acide trifluoroacétique
✓ TFAA	Anhydride trifluoroacétique
✓ THF	Tetrahydrofurane
✓ TPB ⁻	Tétraphénylborate
✓ tr	Temps de rétention
✓ Ts	Tosyle
✓ UCH-L1	Ubiquitine C-terminal hydrolase L1
✓ UV	Ultra violet

Introduction générale

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle touche environ 6,3 millions de personnes dans le monde et 300 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. Elle constitue un enjeu de santé publique mondial d'autant plus important que son incidence augmente au cours du temps en raison du vieillissement de la population. Les coûts directs et indirects des soins liés à la MP déjà considérables sont donc appelés à croître dans les décennies à venir.

A ce jour, les modèles d'étude de la MP disponibles sont basés sur l'administration de neurotoxines et plus récemment, l'identification de mutations génétiques dans certaines formes de la MP, a conduit au développement de nouveaux modèles animaux transgéniques. Ces modèles chimiques et génétiques souffrent néanmoins d'un certain nombre de limitations (*Cf. partie I*) et faute d'outils efficaces permettant une étude mécanistique plus précise de la physiopathologie de la MP, il n'existe à ce jour aucun traitement curatif. Les traitements actuellement disponibles ne sont que symptomatiques et consistent principalement à compenser la perte en dopamine consécutive à la disparition des neurones dopaminergiques.

Récemment, il a été décrit la synthèse d'un composé de type *N*-aryle pyridinium ayant montré un réel potentiel en tant qu'inducteur chimique de la MP. Son administration *in vitro* et *in vivo* a permis l'apparition des marqueurs cellulaires caractéristiques de la MP mais suivant une cinétique d'action plus lente que celle des inducteurs chimiques actuellement disponibles. S'agissant d'induire chimiquement la MP, pathologie dont l'apparition et le développement chez l'Homme sont connus pour survenir de manière extrêmement lente, ce *N*-aryle pyridinium est donc apparu comme ouvrant vers une nouvelle génération de modèles chimiques de la MP à la fois plus adaptés et plus fidèles.

Ces travaux préliminaires ont suggéré l'existence d'un lien entre le motif *N*-aryle pyridinium et la capacité pour la molécule qui le porte, à induire chimiquement la MP. Ceci a permis d'envisager la préparation de composés structurellement inspirés, capables de mimer plus fidèlement les mécanismes biochimiques impliqués lors de l'apparition de la MP.

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés de synthétiser des composés de type *N*-aryle pyridinium diversement fonctionnalisés (*Cf. partie II*), d'entamer une étude de relation

structure-toxicité en lien avec la MP et d'identifier un ou plusieurs paramètre(s) pouvant permettre la modulation de la neurotoxicité de ces composés (*Cf. partie III*).

Partie I : Etude de la maladie de Parkinson

Chapitre I : La maladie de Parkinson

I. Description

Dans un essai intitulé *An Essay on the Shaking Palsy*, James Parkinson offre une description claire et détaillée de six patients présentant des tremblements de repos, des troubles de la posture et de la marche, une rigidité musculaire et une lenteur des mouvements volontaires.^{1,2} Cette maladie que Parkinson appelait « paralysie agitante » sera plus tard renommée en son honneur « Maladie de Parkinson » (MP) par le neurologue français Jean-Martin Charcot.

Aujourd'hui, il s'agit de la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer.^{3,4} Elle touche environ 6,3 millions de personnes dans le monde et 300 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. En France, 175 000 personnes sont atteintes de cette maladie et on recense 10 000 nouveaux cas et 3 500 décès chaque année.^{5(a)} Il s'agit de la deuxième cause de handicap moteur chez le sujet âgé après les accidents vasculaires cérébraux.

La MP constitue donc un enjeu de santé publique mondial car son incidence augmente au cours du temps en raison du vieillissement de la population. Avec d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, on s'attend à ce qu'elle dépasse le cancer au deuxième rang de la mortalité vers l'année 2040. L'incidence et la prévalence de la maladie augmentent avec l'âge, survenant chez environ 1 à 2 % des personnes âgées de plus de 65 ans et 3,4 % des plus de 75 ans.^{5(b)} Les coûts directs et indirects des soins de la MP sont donc considérables.

¹Parkinson J. *An Essay of the Shaking Palsy*. London: Sherwood, Neely and Jones, 1817.

²Kempster PA, Hurwitz B, Lees AJ. A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *Neurology* 2007; **69**: 482-85.

³Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 2007; **68**: 384-86.

⁴Alzheimer's Association. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2014; **10**: e47-e92.

⁵(a) source : lamadiedeparkinson.info ; (b)Source : OMS

I.1 Atteinte dopaminergique

Les signaux contrôlant les mouvements du corps se propagent dans le cerveau le long de neurones appelés neurones nigrostriés. Ces neurones se projettent sur le noyau caudé et le putamen (lesquels forment le *striatum*) à partir du *locus niger* et libèrent la dopamine (DA), un neurotransmetteur permettant entre autres le contrôle du mouvement, dans le *striatum* (Figure 1).

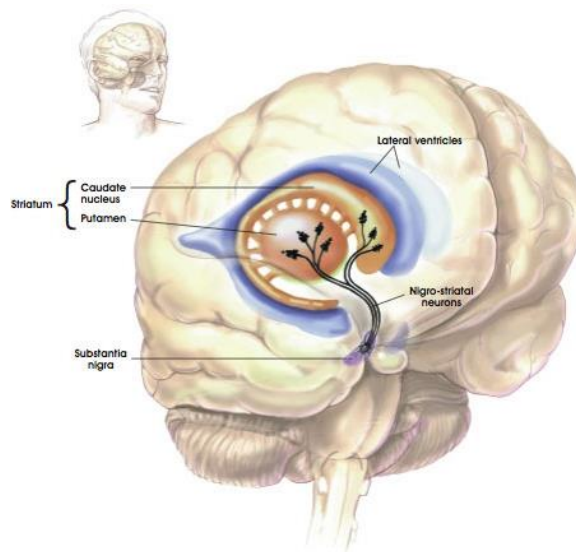


Figure 1 : Les voies neuronales impliquées dans la MP (Terese Winslow, Lydia Kibiuk, 2001).⁶

I.1.1 Biosynthèse, catabolisme et rôle de la DA

I.1.1.1 Biosynthèse de la DA

La DA fait partie de la famille des catécholamines, composés organiques jouant le rôle d'hormone ou de neurotransmetteur et synthétisés à partir de l'acide aminé tyrosine. L'hydroxylation du noyau phényle de la tyrosine par la tyrosine hydroxylase conduit à la dihydroxyphénylalanine (DOPA). La DA est ensuite obtenue par décarboxylation de la DOPA par la DOPA-décarboxylase (Figure 2).

⁶Bethesda MD. Rebuilding the Nervous System with Stem Cells. *Stem Cell Information*. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2009.

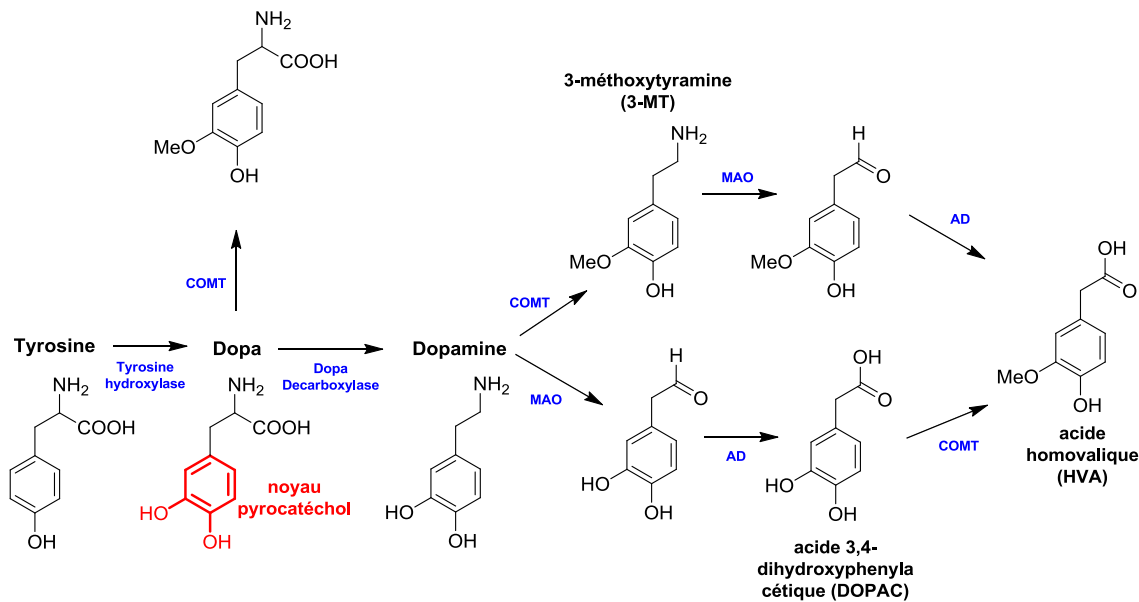


Figure 2 : Biosynthèse et catabolisme de la DA.

Après avoir été produite au niveau des terminaisons présynaptiques, la DA est chargée dans des vésicules synaptiques (Figure 3), puis libérée dans la fente synaptique par la fusion des vésicules de transport avec la membrane plasmique, appelée exocytose.

I.1.1.2 Catabolisme de la DA

Deux enzymes interviennent dans l'espace synaptique pour inactiver la DA :

- la catéchol-*O*-méthyl-transférase (COMT), qui catalyse la méthylation d'un groupement hydroxyle pour conduire à la 3-méthoxytyramine.
- la monoamine oxydase (MAO), qui réalise l'oxydation de la fonction amine de la DA. Cette enzyme existe sous deux formes : la MAO-A et la MAO- B. La MAO-B prédomine dans le cerveau, la forme A est aussi présente dans le foie et le tube digestif.

L'action des enzymes COMT, MAO et de l'aldéhyde déshydrogénase (AD) conduit à la formation d'acide homovalinique (HVA) à partir de la DA (Figure 2).

I.1.1.2.1 Fixation aux récepteurs dopaminergiques

La DA libérée dans la fente synaptique est en partie captée par des récepteurs postsynaptiques et transmet ainsi le signal neuronal par transduction (Figure 3). En effet, cela va entraîner une cascade de signaux secondaires et des processus cellulaires internes en réponse à ces signaux.

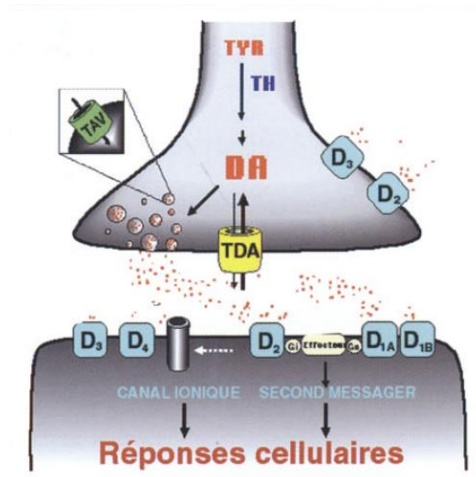


Figure 3 : Représentation schématique d'une synapse dopaminergique.⁷

On connaît actuellement 5 types de récepteurs dopaminergiques au plan moléculaire (5 gènes) : les récepteurs D1, D2, D3, D4 et D5. Les récepteurs D1 et D2 sont très enrichis dans le striatum. Les D1/D5 sont exprimés par les neurones de la voie *striatum* → *pallidum* interne et substance noire réticulée et les récepteurs D2/D3 par les neurones de la voie *striatum* → *pallidum* externe. Ils jouent un rôle important dans la modulation de l'activité motrice

I.1.1.2.2 Recapture de la DA dans l'espace synaptique

Environ 80 % de la DA libérée est recaptée par les neurones dopaminergiques présynaptiques par des transporteurs sélectifs DAT (Dopamine Active Transporter, Figure 3). Ces transporteurs contrôlent directement, à la fois dans le temps et dans l'espace, la concentration et la disponibilité de la DA libérée.⁸

I.1.1.2.3 Conclusion

A travers ces différentes voies, la DA régule plusieurs fonctions physiologiques telles que les mouvements volontaires, la coordination du mouvement mais également l'apprentissage et la mémoire.

⁷Giros B. Rôle des systèmes de recapture dopaminergiques dans la physiopathologie de l'addiction. *PSN* 2003; **1**: 13-8.

⁸Giros B, Caron MG. Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci* 1993; **14**: 43-9.

I.1.2 Dopamine et MP

En 1963, Hornykiewicz démontre que la dépigmentation de la substance noire (SN), à l'origine du tableau clinique observé par James Parkinson, correspond à un déficit en DA dans le *striatum* lequel conduit à la symptomatologie caractéristique de la MP.⁹ Ainsi était démontré le rôle déterminant du déficit dopaminergique dans la MP.

Chez le sujet parkinsonien, la mort cellulaire de cette zone crée un déficit en DA qui aboutit à un dérèglement de l'équilibre entre les quantités de DA et un autre neurotransmetteur, l'acétylcholine. Ainsi, la vitesse de dégénérescence de ces neurones est deux fois plus rapide chez le sujet parkinsonien que lors du vieillissement normal. La MP est donc une maladie neurodégénérative principalement due à une atteinte de la voie nigrostriée dopaminergique reliant la SN et le *striatum*. Ce processus se répercute au niveau du *striatum* qui est alors moins riche en DA. Ehringer et Hornykiewicz sont les premiers à rapporter une diminution importante du taux de DA au niveau de la *substantia nigra pars compacta* (SNc) et du *striatum*.¹⁰

Ceci a pour conséquence une diminution de l'initiation du mouvement et une perte du contrôle du mouvement, entraînant tremblements, rigidité musculaire et perte de coordination. Il est à noter que les symptômes de la maladie apparaissent alors même que le processus dégénératif a déjà atteint 50 % à 60 % de la population neuronale dopaminergique au sein de la SNc et que la concentration en DA dans le *striatum* est abaissée d'environ 70 %.

I.2 Les corps de Lewy et dégénérescence des neurones dopaminergiques

Au cours d'études anatomopathologiques dans la SN de malades parkinsoniens, Lewy (1913) constata la présence d'inclusions cytoplasmique qui furent appelées « corps de Lewy ». L'examen *post-mortem* des neurones dopaminergiques provenant de personnes atteintes de la MP révèle la présence de ces inclusions dans le cytoplasme de la plupart des cellules en

⁹ Hornykiewicz O. The tropical localization and content of noradrenalin and dopamine (3-hydroxytyramine) in the substantia nigra of normal persons and patients with Parkinson's disease. *Wien Klin Wochenschr* 1963; **75**: 309-12.

¹⁰ Ehringer H and Hornykiewicz. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr* 1960; **38**: 1236-9.

dégénérescence. La présence récurrente de ces inclusions intra-neuronales chez les patients atteints par la MP a contribué à leur utilisation par la suite comme marqueurs histopathologiques de cette maladie.

Les corps de Lewy se présentent classiquement sous la forme d'inclusions circulaires intra-neuronales cytoplasmiques de 5 à 25 µm de diamètre (Figure 4).

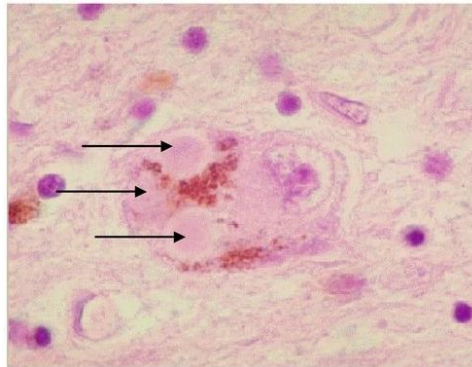


Figure 4 : Corps de Lewy.

Bien que la composition du cœur ne soit pas bien définie, plusieurs protéines ont pu être identifiées, parmi lesquelles l'ubiquitine, la parkine et plus récemment l' α -synucléine, cette dernière étant reconnue comme constituant principal des corps de Lewy. Il a également été démontré que, dans ces corps de Lewy, la sérine en position 129 de l' α -synucléine est phosphorylée.¹¹ L'origine et les implications exactes des corps de Lewy restent incertaines. Ils pourraient jouer un rôle protecteur vis-à-vis de la cellule, contre l'accumulation toxique des formes insolubles d' α -synucléine et d'autres protéines. Cette hypothèse est soutenue par la présence au sein des corps de Lewy de protéines impliquées dans les mécanismes de dégradation telles que l'ubiquitine, la parkine ou encore la cathepsine D.

Dans la MP, la présence de ces inclusions est accompagnée d'une perte neuronale préférentielle des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* et d'une gliose (activation des cellules gliales) dans la SNc. L'atteinte est plus forte dans la partie ventrolatérale laissant la région dorso-médiane (aire tegmentale ventrale) relativement préservée. La dénervation dans le *striatum* n'est pas homogène, la partie ventrale du *striatum* (putamen) présentant une atteinte plus forte que la partie dorsale (noyau caudé).

¹¹(a) Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, et al. Alpha-synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* 2002; **4**: 160–4. (b) Obi K, Akiyama H, Kondo H, Shimomura Y, Hasegawa M, Iwatsubo T, et al. Relationship of phosphorylated alpha synuclein and tau accumulation to Abeta deposition in the cerebral cortex of dementia with Lewy bodies. *Exp. Neurol.* 2008; **210**: 409–20.

II. Etiologie

II.1 Formes génétiques

Bien que l'origine et les causes de la MP demeurent inconnues, 5 à 10 % des patients atteints par cette maladie neurodégénérative présentent une mutation de gène(s) spécifique(s). La découverte en 1997 de mutations au niveau du gène SNCA, codant pour l' α -synucléine et impliqué dans une forme rare de la MP, a suscité l'intérêt pour l'étude des facteurs génétiques impliqués dans l'étiologie de la maladie. Par la suite, d'autres mutations de gènes spécifiques codant pour des protéines telles que parkin, ubiquitine C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1), DJ-1, PINK1 et LRRK2 ont été identifiés comme causes de formes héréditaires de la MP.¹²

II.2 Formes sporadiques

II.2.1 Historique

Au cours de l'année 1976, Barry Kidston, un étudiant en chimie du Maryland, synthétisa et s'injecta un analogue de la mépéridine : le 1-méthyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine (MPPP, Figure 5). Trois jours seulement après son injection, il développa les symptômes de la MP. Plus tard, le National Institute of Health (NIH) retrouva des traces de *N*-méthyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) ainsi que d'autres analogues de la mépéridine dans son laboratoire. Testées sur des rats, les substances retrouvées restèrent toutefois sans effet. Cette innocuité sera par la suite expliquée par la tolérance de ces rongeurs pour ce type de neurotoxines. Le patient fut traité avec succès avec la Lévodopa, mais est décèdera 18 mois plus tard d'une overdose de cocaïne. Son autopsie permit de mettre en évidence une destruction importante des neurones dopaminergiques de la SN.¹³

¹²Gautier CA, Corti O, Brice A. Mitochondrial dysfunctions in Parkinson's disease. *Rev Neurol*(Paris) 2014; **170**: 339-43.

¹³Stanley F. The Case of the Frozen Addicts: How the Solution of an Extraordinary Medical Mystery Spawned a Revolution in the Understanding and Treatment of Parkinson's Disease, *The New England Journal of Medicine* 1996; **335**: 2002-3.

Il convient de préciser que ce choix pour le MPPP s'explique par les propriétés analgésiques puissantes (surpassant celles de la mépéridine) de ce composé et par sa facilité de synthèse à partir de produits chimiques non réglementés. Le MPPP est en effet obtenu en deux étapes à partir de la *N*-méthyl-4-pipéridone (NMP). Traitée par le phényllithium, celle-ci est tout d'abord transformée en 4-hydroxy-4-phényl-*N*-méthylpipéridine (HPMP). Cet alcool est ensuite estérifié par l'anhydride propionique pour finalement conduire au MPPP. Une réaction secondaire de déshydratation peut toutefois survenir au cours de cette dernière étape, occasionnant une contamination du MPPP par le MPTP (Figure 5).

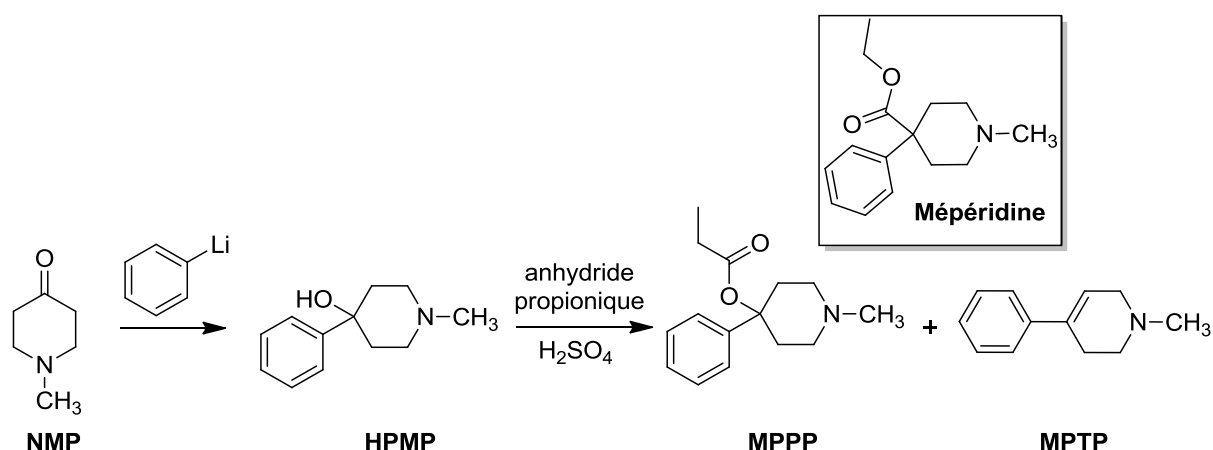


Figure 5 : Synthèse du MPPP et contamination par du MPTP.

En 1979, Davis *et al.* suggèrent que l'utilisation de lots contenant un mélange de HPMP, de MPPP et de MPTP est à l'origine du parkinsonisme constaté chez Barry Kidston.¹⁴ Plus tard, en 1982, de nouveaux cas de syndromes parkinsoniens sont décrits chez sept toxicomanes et ce, de nouveau suite à l'injection de MPPP. Récupéré par le neurologue J. W. Langston, un échantillon de la substance incriminée put être étudié par le chimiste I. Irwin (Université de Stanford). L'analyse par spectrométrie de masse permet d'identifier parmi les différents analogues de mépéridine, un composé commun avec ceux précédemment identifiés par le NIH : le MPTP.¹³ Très logiquement, l'hypothèse selon laquelle le MPTP était à l'origine du syndrome parkinsonien développé par les toxicomanes fut proposée. Plus tard, J. W. Langston, en collaboration avec le NIH, confirma grâce à des études menées non plus sur des rats mais sur des primates, que l'intoxication au MPTP était effectivement la cause de la MP observée chez les toxicomanes.^{13,15}

¹⁴ Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, et al. Chronic Parkinsonism Secondary to Intravenous Injection of Meperidine Analogues. *Psychiatry Research* 1979; **1**: 249-254

¹⁵ Langston JW, Palfreman J. The Case of the Frozen Addicts. *Vintage Books* 1996.

II.2.2 Exposition à des toxines

Par la suite, plusieurs produits chimiques entrant dans la composition d'herbicides, d'insecticides et de pesticides et dont la cible était identique à celle du MPTP, furent suspectés d'être impliqués dans la genèse de la MP (*cf.* Chap.2.I.3.2). Il faut en effet rappeler que dans plus de 90 % des cas, la MP se manifeste de façon sporadique et résulterait donc de facteurs environnementaux tels que l'exposition à des toxines.^{16,17,18} Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par différentes études épidémiologiques montrant une plus grande prévalence de la MP dans les zones d'agriculture intensive utilisant de façon importante des insecticides, herbicides et pesticides.¹⁹ De même, l'exposition chronique à certains métaux lourds tels que le cuivre, le manganèse ou le plomb pourrait constituer un facteur de risque.

II.3 Combinaison facteurs génétiques et exposition à des toxines

Au vu de ces découvertes, les scientifiques s'entendent pour proposer une origine multifactorielle à la MP, qui pourrait être le résultat d'une interaction complexe de facteurs génétiques et environnementaux. Selon ce scénario, même en présence d'une mutation d'un gène spécifique, la MP ne surviendrait que si la variante génétique coïncide également avec une exposition environnementale délétère. Dans ce contexte, une variation génétique ne serait pas nécessairement la cause de la maladie mais pourrait plutôt influencer la susceptibilité d'une personne à des facteurs environnementaux. Ainsi, une personne n'hériterait pas de l'état de la maladie en soi, mais plutôt d'un ensemble de traits de sensibilité à certains facteurs environnementaux. Des mutations de gènes codant pour parkin et LRRK2 ont ainsi été observées chez un certain nombre de patients sans antécédents familiaux apparents de MP.^{20,21}

¹⁶Tanner CM. Is the cause of Parkinson's disease environmental or hereditary? Evidence from twin studies. *Adv Neurol* 2003; **91**: 133-42.

¹⁷Taylor KS, Counsell CE, Gordon JC, Harris CE. Screening for undiagnosed parkinsonism among older people in general practice. *Age Ageing* 2005; **34**: 501-04.

¹⁸Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, et al. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med* 2007; **64**: 666-72.

¹⁹Barbeau A, Roy M, et al. Ecogenetics of Parkinson's disease: prevalence and environmental aspects in rural areas. *Can J Neurol Sci* 1987; **14**(1): 36-41.

²⁰Lucking CB, Durr A, Bonifati V, et al. for French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 2000; **342**: 1560-1567.

²¹Gilks WP, bou-Sleiman PM, Gandhi S, et al. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 2005; **365**: 415-416.

III. Symptomatologie

III.1 Symptomatologie motrice

Les symptômes moteurs classiques de la MP ont été reconnus comme des composants importants de la maladie depuis la description initiale de James Parkinson et précisés plus tard par Jean-Martin Charcot.²² Ces symptômes parkinsoniens incluent bradykinésie (lenteur des mouvements), rigidité musculaire, tremblements de repos et troubles posturaux.

Il a été constaté que ces symptômes moteurs sont variables d'une personne à l'autre, ce qui a conduit à des tentatives de classification de la MP en sous-types²³ sans qu'un consensus n'ait toutefois été encore établi. Des observations cliniques empiriques suggèrent néanmoins deux sous-groupes principaux :

- 1) la MP avec les tremblements comme symptômes dominants (avec une absence relative des autres symptômes moteurs),
- 2) la MP avec les tremblements comme symptômes non dominants.

L'évolution et le pronostic de la maladie diffèrent entre ces deux sous-groupes, le premier sous-groupe étant souvent associé à un taux de progression plus lent et d'invalidité moins important que le second.²⁴ Il est à noter que cette variation suggère une origine distincte (étiologique et pathogénique) entre ces deux sous-groupes.²⁵

III.1.1 Le tremblement de repos

Le premier signe de la maladie est aussi, bien souvent, à l'origine de la première consultation chez le médecin : il s'agit du tremblement de la main, ou même de celui d'un seul doigt. Plus tard le tremblement peut toucher les bras et les jambes, parfois même le visage avec un tremblement des lèvres ou du menton. Ces tremblements apparaissent au repos et

²²Goetz CG. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; **1**: a008862.

²³Marras C, Lang A. Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; **84**: 409-15.

²⁴Jankovic J, McDermott M, Carter J, et al. Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study group. *Neurology* 1990; **40**: 1529-34.

²⁵Marras C, Lang A. Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; **84**: 409-15.

disparaissent lors des mouvements volontaires ou pendant le sommeil. Bien que le tremblement soit devenu le symbole de la MP, tous les parkinsoniens ne tremblent pas et ne trembleront pas obligatoirement. Ainsi, 25 % des parkinsoniens ne présentent pas de tremblements, alors qu'ils constatent une raideur voire une rigidité de certaines parties de leur corps. Dans la mesure où le phénomène de tremblement peut résulter d'autres causes que la MP, c'est en fait la bradykinésie qui en est désormais le signe essentiel et le plus remarquable.

III.1.2 Bradykinésie

Un signe caractéristique de la MP est le ralentissement observé lors de l'exécution de mouvements volontaires. L'aisance du mouvement est perdue, les différents constituants de l'acte moteur doivent être voulus de manière consciente les uns après les autres, et demandent une dépense d'énergie permanente responsable d'une fatigue constante. Cette difficulté à organiser le mouvement est particulièrement visible lors du franchissement d'obstacles. Cette bradykinésie se remarque souvent précocement au cours de l'écriture qui devient plus difficile, très serrée et de taille réduite. La bradykinésie est donc responsable d'une perte des mouvements automatiques et inconscients : le patient doit commander consciemment la plupart de ses mouvements, même ceux qu'il réalisait auparavant, sans y penser.

III.1.3 L'hypertonie (rigidité musculaire)

Chez les personnes atteintes de la MP, on constate une raideur des membres et du rachis (colonne vertébrale) qui peut être mise en évidence lorsque le patient étend son bras. Il apparaît alors une résistance involontaire des muscles qui apparaît et disparaît par à-coups successifs au cours du mouvement. Les malades se plaignent alors fréquemment de raideur, d'ankylose (fixation et immobilité d'une articulation). Cette raideur peut concerner tout le corps, mais elle siège de préférence au niveau de la colonne vertébrale et de la racine des membres.

III.2 Symptomatologie non-motrice

Une symptomatologie non-motrice variée est fréquemment rencontrée dans la MP. Elle pourrait être le reflet de la dégénérescence ou de la souffrance neuronale observée dans les stades avancés de la maladie et impliquerait très probablement des systèmes de neurotransmission qui ne sont pas dopaminergiques (cholinergique notamment). Ces symptômes sont occasionnels et souvent très précoces. On observe, par exemple, des perturbations comportementales et psychiatriques, telles que des hallucinations survenant chez 25 à 50 % des patients et qui peuvent s'avérer tout aussi invalidantes que les symptômes moteurs. De plus, un dysfonctionnement olfactif, une déficience cognitive, des troubles du sommeil (insomnie) et digestifs (constipation) et une perturbation du sommeil paradoxal sont également régulièrement observés chez les parkinsoniens. Enfin, 50 % des malades développent un état dépressif qui serait expliqué par le rôle important de la DA dans la régulation de l'humeur, du tonus psychique et du plaisir. Par ailleurs, la MP s'accompagne de troubles de l'attention et de la mémoire, lesquels sont constatés dans 20 à 30 % des cas et rappellent ceux observés dans la maladie d'Alzheimer. Comme dans toute maladie neurodégénérative, les lésions s'étendent progressivement, et lentement, les symptômes s'accroissant petit à petit. Malheureusement ces symptômes sont non-spécifiques et rarement considérés pour établir un diagnostic précoce.

IV. Pathogénèse

Si l'étiologie se réfère aux *facteurs* qui initient le processus d'une maladie, la pathogénèse – et en l'occurrence, celle de la MP – se réfère aux *mécanismes* réels conduisant à la disparition des neurones dopaminergiques. S'agissant de la pathogénèse de la MP, il existe à ce jour deux grandes théories qui ne sont pas forcément antagonistes. La première théorie suggère que le mauvais repliement et l'accumulation toxique des formes insolubles d' α -synucléine sont la clé du processus neurodégénératif. La seconde théorie suggère que le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydant qui en résulte, en sont à l'origine.

IV.1 L'hypothèse de l' α -synucléine

Deux éléments viennent appuyer l'hypothèse selon laquelle l' α -synucléine serait impliquée dans la pathogénèse de la MP. Le premier est la présence de cette protéine dans les marqueurs histopathologiques de la MP que sont les corps de Lewy. Le deuxième élément découle de l'étiologie de la maladie. En effet, il a été mis en évidence que des mutations au niveau du gène codant pour l' α -synucléine étaient impliquées dans des formes génétiques de la MP.¹²

L' α -synucléine est une petite protéine composée de 140 acides aminés à l'état natif et qui est exprimée de façon ubiquitaire dans le cerveau, mais est principalement localisée dans les terminaisons présynaptiques où elle s'associe avec les membranes et les structures vésiculaires.²⁶ Bien que son rôle biologique ne soit pas encore totalement élucidé, de nombreuses études suggèrent son implication dans la régulation et le maintien de l'homéostasie dopaminergique dans la cellule, notamment en inhibant l'activité de la tyrosine hydroxylase réduisant ainsi la biosynthèse de dopamine (Figure 2).²⁷ Sa capacité à se lier à de nombreuses molécules endo- et exogènes, telles que des protéines ou divers ions métalliques, rend complexe l'identification de son rôle physiologique.

En 2000, une mutation non-sens pathologique touchant le gène SNCA codant pour l' α -synucléine a été identifiée chez des patients atteints de la MP.²⁸ Il s'agit d'une mutation ponctuelle dans laquelle le nucléotide d'un codon est changé, induisant le remplacement d'un codon codant pour un acide aminé par un codon-stop. La protéine résultante, tronquée et donc incomplète (car la traduction se termine prématurément), est généralement non-fonctionnelle. Dans le cas du gène SNCA, cette mutation touche le codon 53 et entraîne la substitution d'une alanine en thréonine (A53T).²⁹ D'autres mutations ponctuelles ont été découvertes par la suite telles que la substitution d'une alanine au codon 30 par une proline (A30P)³⁰ et celle d'un acide glutamique du codon 46 par une lysine (E46K).³¹ Excepté dans les cas de MP

²⁶ Kahle PJ, Neumann M, et al. Physiology and pathophysiology of alpha-synuclein. Cell culture and transgenic animal models based on a Parkinson's disease-associated protein. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **920**: 33-41.

²⁷ Perez RG, Waymire JC, et al. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 2002; **22**(8): 3090-9.

²⁸ Polymeropoulos MH. Genetics of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **920**: 28-32.

²⁹ Li W, Lesuisse C, et al. Stabilization of alpha-synuclein protein with aging and familial parkinson's disease-linked A53T mutation. *J Neurosci* 2004; **24**(33): 7400-9.

³⁰ Sousa VL, Bellani S, et al. {alpha}-synuclein and its A30P mutant affect actin cytoskeletal structure and dynamics. *Mol Biol Cell* 2009; **20**(16): 3725-39.

³¹ Zarranz JJ, Alegre J, et al. The new mutation E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004; **55**(2): 164-73.

héréditaires qui sont accompagnés soit par une multiplication du gène de l' α -synucléine, soit par ces mutations ponctuelles (A30P, A53T et E46K) caractéristiques, la cause de l'accumulation d' α -synucléine et de la formation des corps de Lewy restent énigmatiques.

Récemment, la piste d'un dysfonctionnement des systèmes de dégradation intracellulaire de l' α -synucléine a connu un regain d'intérêt. En effet, différentes études ont décrit la cathepsine D comme la principale enzyme dégradant l' α -synucléine,³² permettant ainsi d'empêcher son agrégation et sa toxicité. Ceci est en accord avec une étude plus récente montrant que l'augmentation de l'activité cathepsine D inhiberait l'agrégation de l' α -synucléine et sa toxicité.^{33, 34} Ainsi, cette boucle d'auto-amplification de l'agrégation de l' α -synucléine qui favorise la dégénérescence des neurones et la progression de la maladie, apparaît comme une cible de choix pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

IV.2 L'hypothèse du stress oxydant et de la mitochondrie

Un élément de l'étiologie de la MP est à l'origine de l'hypothèse selon laquelle le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydant qui en résulte seraient impliqués dans la pathogénèse de la MP. Depuis l'implication du MPTP dans l'étiologie de la MP, il a en effet été démontré que sa neurotoxicité, caractérisée par la mort des neurones dopaminergiques, résultait d'une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM).³⁵ Différents modèles ont ainsi démontré que des caractéristiques de la MP pouvaient être reproduites par inhibition du complexe I de la CRM et donc que la voie nigrostriée est intrinsèque et sélectivement sensible à un dysfonctionnement du complexe I. Par la suite, une réduction de l'activité du complexe I et une diminution de la respiration mitochondriale ont été constatées dans les neurones de la SN de patients décédés, atteints par la MP.^{36,37,38}

³²Sevlever D, Jiang P, et al. Cathepsin D is the main lysosomal enzyme involved in the degradation of alpha-synuclein and generation of its carboxy-terminally truncated species. *Biochemistry* 2008; **47**(36): 9678-87.

³³Qiao L, Hamamichi S, et al. Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity. *Mol Brain* 2008; **1**(1): 17.

³⁴Cullen V, Lindfors M, et al. Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo. *Mol Brain* 2009; **2**(1): 5.

³⁵Denton T, Howard BD. A dopaminergic cell line variant resistant to the neurotoxin MPTP. *J Neurochem* 1987; **49**: 622-30.

³⁶(a) Bindoff LA, Birch-Machin M, et al. Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; **2**: 49. (b) Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; **1**: 1269.

IV.2.1 La chaîne respiratoire mitochondriale

La CRM est constituée de cinq complexes qui sont la résultante de l'association d'une cinquantaine de protéines membranaires (par complexe). Ces complexes enzymatiques membranaires vont réoxyder les coenzymes NADH et FAD qui ont été réduits en particulier au cours du cycle de Krebs. Cette réoxydation s'accompagne de la création d'un gradient transmembranaire de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, qui va servir à synthétiser de l'ATP, molécule énergétique utilisée par la cellule (Figure 6).

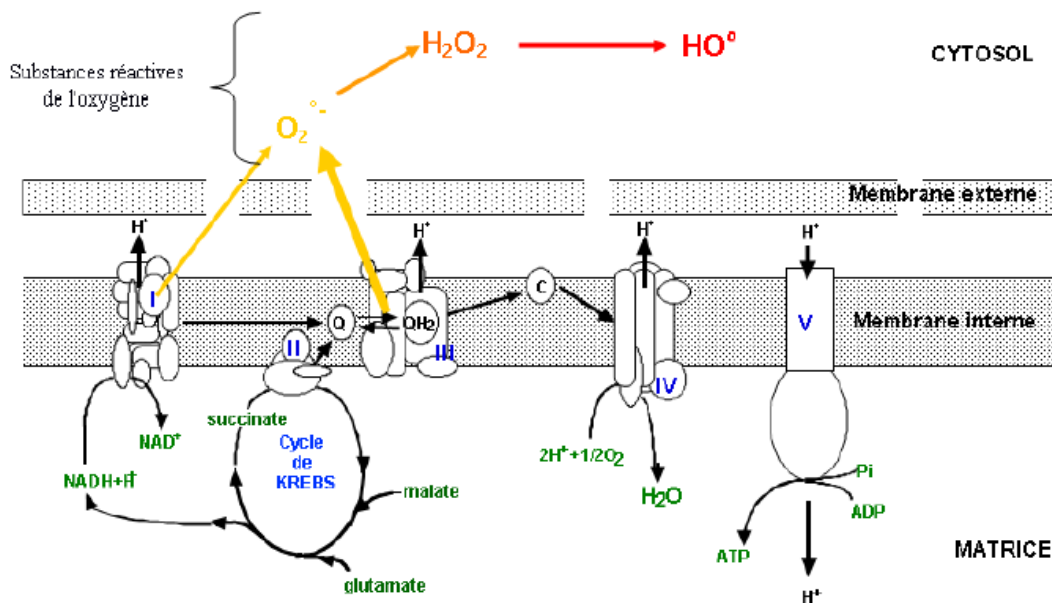


Figure 6 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale.

➤ **Complexe I : NADH-déshydrogénase** (couple redox : NAD^+/NADH , $E^\circ = -0,32 \text{ V}$)

Le transfert initial d'électrons nécessite le cofacteur réduit NADH qui est oxydé sur la face matricielle de la membrane interne mitochondriale par la NADH-déshydrogénase. Cette réaction est couplée au transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone (ou coenzyme Q) et à l'expulsion de protons vers l'espace inter-membranaire.

➤ **Complexe II : succinate-coenzyme Q réductase** (couple redox : FMN ou FAD/FMNH₂ ou FADH₂, $E^\circ = -0,20 \text{ V}$)

³⁷(a) Parker WD Jr, Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1989; **26**: 719-23. (b) Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, O. Abnormalities of electron transport chain in idiopathic Parkinson's dzawa T, Kagawa Y. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **163**: 1450-5.

³⁸Shoffner JM, Watts RL, et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1991; **30**: 332-9.

Ce complexe, appartenant à la CRM et au cycle de Krebs, catalyse la réoxydation du succinate en fumarate, ce qui permet le transfert de deux électrons à l'ubiquinone par l'intermédiaire de l'oxydation du FADH₂.

➤ **Complexe III : coenzyme Q-cytochrome c réductase** (couples redox : coenzyme Q ox/ coenzyme Q red, $E^\circ = 0,06 \text{ V}$; coenzyme b ox/ coenzyme b red, $E^\circ = 0,12 \text{ V}$)

Les ubiquinones sont des transporteurs, présent dans la membrane interne mitochondriale qui permettent le transfert d'électrons des complexes I et II vers le complexe III. Ce dernier permet un transfert d'électrons à un deuxième transporteur mobile situé dans l'espace inter-membranaire, le cytochrome c, qui le relie au dernier complexe de la CRM.

➤ **Complexe IV : cytochrome c oxydase** (couples redox : coenzyme c ox/ coenzyme c red, $E^\circ = 0,22 \text{ V}$; coenzyme a ox/ coenzyme a red, $E^\circ = 0,29 \text{ V}$; O₂/HO⁻, $E^\circ = 0,82 \text{ V}$)

Le cytochrome c est oxydé par le complexe IV qui catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction de la CRM et réduit l'O₂ en H₂O par quatre électrons. Ce transfert d'électrons est irréversible contrairement à celui ayant lieu au sein des complexes I et III.

➤ **Complexe V : l'ATP synthase**

L'ATP synthase couple la diffusion facilitée des protons, à travers la membrane interne mitochondriale, à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi (phosphate inorganique), permettant ainsi de transformer la différence de potentiel électrochimique de protons en énergie chimique.

IV.2.2 Homéostasie redox

Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) sont produites de manière continue au sein de la mitochondrie. Cette production est due à la fuite estimée à 2-3 % des électrons par les ubiquinones et les cytochromes b au niveau des complexes I et III de la CRM.

Cependant, lorsque les mécanismes de défense antioxydants sont submergés par les productions d'EROs, la cellule est endommagée : l'équilibre entre les systèmes pro-oxydants produisant les EROs et les systèmes antioxydants qui les éliminent est rompu. Ceci caractérise une situation de stress oxydant et peut aboutir à l'induction de l'apoptose ou mort cellulaire programmée.^{39,40,41} *A contrario*, la suppression complète de tous ces EROs par la

³⁹Sayre LM, Perry G, et al. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2008; **21**(1): 172-88.

⁴⁰Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(13): 9010-4.

surexpression de différents systèmes antioxydants peut être néfaste au bon fonctionnement de la cellule et plus généralement, de l'organisme. L'état d'équilibre redox (homéostasie redox) de la cellule est donc une condition clé pour maintenir la fonction cellulaire et tissulaire normale.

IV.2.3 Altération du complexe I de CRM et production d'EROs

L'inhibition du complexe I de la chaîne de transporteurs d'électrons mitochondriale interrompt le transfert d'électrons du complexe I à l'ubiquinone (Q) ce qui induit un important déficit dans la production d'ATP (Figure 6). Cette perte d'énergie cellulaire va avoir plusieurs conséquences qui peuvent être décisives pour la survie de la cellule.

IV.2.3.1 Effondrement du potentiel de membrane

D'une part, cette déplétion en ATP va entraîner un effondrement du potentiel de membrane mitochondriale suivie d'une altération de l'homéostasie calcique et la formation d'EROs,^{42,43} en particulier de radical-anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$.⁴⁴ Au sein de la mitochondrie, une partie de ces radicaux-anions superoxyde va être convertie en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et en radicaux hydroxyle OH \cdot . Une autre partie va se recombinaison de façon spontanée avec le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) produit par les cellules non dopaminergiques (et notamment les cellules gliales), générant ainsi des ions peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$). Ce dernier est capable d'induire des dommages cellulaires très importants dont la nitration de résidus tyrosine conduisant à la rupture des brins d'ADN, ou encore la peroxydation lipidique ou la nitration des protéines.

Au final, les lésions moléculaires induites par le stress oxydant peuvent toucher différents types de molécules biologiques constituant la cellule : protéines, lipides, acides nucléiques et

⁴¹Fujimura M, Morita-Fujimura Y, et al. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 2000; 20(8): 2817-24.

⁴²Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 1985; **36**: 2503-8.

⁴³Tiplon KF, Singer TP. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J Neurochem* 1993; **61**: 1191-206.

⁴⁴Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem* 1973; **134**(3): 707-16.

même polysaccharides. Il s'en suit une cascade d'évènements induisant notamment des dysfonctions mitochondriales et aboutissant finalement à la mort cellulaire.

IV.2.3.2 Libération de la DA

Une autre conséquence de la déplétion cellulaire en ATP est la libération dans le cytoplasme du contenu dopaminergique des vésicules de stockage. Cette libération a pour conséquence la production d'EROs *via* les deux voies principales de dégradation de la DA.⁴⁵

IV.2.3.2.1 Oxydation enzymatique de la DA

La première voie de dégradation de la DA repose sur son oxydation par les MAO-A et B. Cette désamination oxydante conduit à la production d' H_2O_2 (i) qui, dans un environnement très riche en fer comme l'est le système nerveux, induit la formation de radicaux hydroxyle hautement réactifs par la réaction de Fenton (ii, Figure 7).⁴⁶

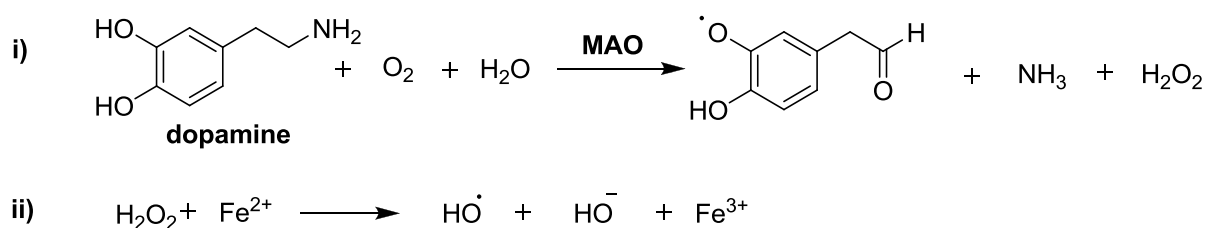


Figure 7 : Dégradation enzymatique de la DA.

IV.2.3.2.2 Oxydation non-enzymatique de la DA

La voie non enzymatique consiste en une auto-oxydation de la DA conduisant à des quinones et des semi-quinones avec production de radicaux-anions superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Figure 8). Par polymérisation, les semi-quinones vont former de la neuromélanine qui génère à son tour des radicaux libres.^{47,48}

⁴⁵ Lotharius J, O'Malley KL. The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. *J Bio Chem* 2000; **275**(49): 38581-8.

⁴⁶ Olanow CW, Stern MB, et al. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson's disease (2009). *Neurology* 2009; **72**: S1-136.

⁴⁷ Lotharius J, Brundlin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci* 2002; **3**(12): 1320-31.

⁴⁸ Nagatsu T, Sawada M. Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to Parkinson's disease: possible implications of glial cells. *J Neural Transm Suppl* 2006; **71**: 53-65.

et mène à l'activation des caspases effectrices telles que les caspases 3, 6 et 7.⁵² Cette cascade des caspases va finalement conduire à l'autodestruction cellulaire.⁵¹

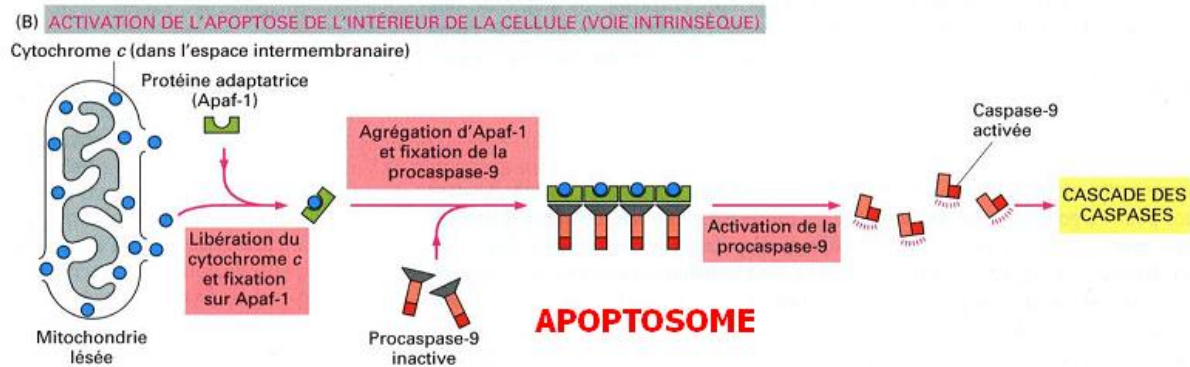


Figure 9 : Schéma de la voie intrinsèque de l'apoptose.⁵¹

IV.3 Conclusion

L'un des objectifs majeur de la recherche actuelle sur la MP consiste à identifier tous les facteurs impliqués dans la mort des neurones dopaminergiques et de déterminer l'ordre dans lequel ces facteurs interviennent dans cette cascade délétère. Une telle identification permettrait d'envisager des stratégies thérapeutiques adaptées à la MP.

V. Approches thérapeutiques

A ce jour, il existe deux grandes classes de médicaments utilisés pour traiter les personnes atteintes de la MP : les médicaments visant à combler le déficit en DA et ceux n'agissant pas par l'intermédiaire de la DA (Figure 10).

⁵²(a) Huerta S, Goulet EJ, Herta-Yepetz S, Livingston EH. *Res. Rev.* 2007; 139: 143-56. (b) Shen HM, Zhang Z, Zhang QF, Ong CN. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2001, **280**: L10-7.

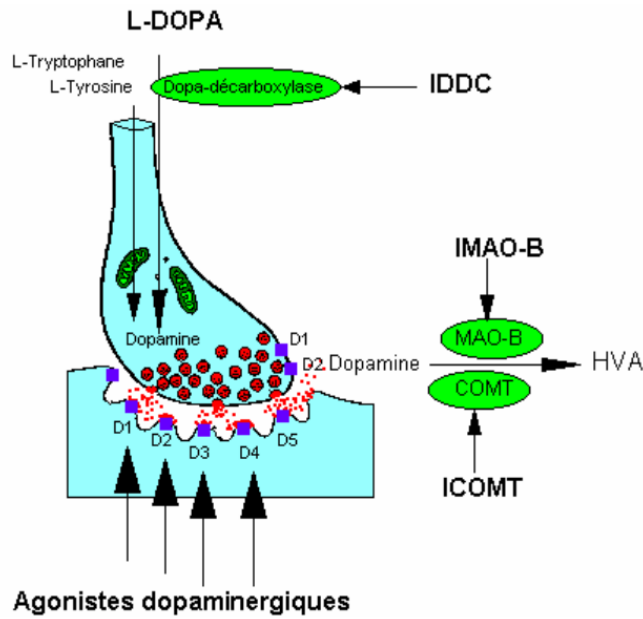


Figure 10 : Les sites d'action des principaux médicaments antiparkinsoniens.⁵³

V.1 Médicaments visant à combler le déficit en DA

V.1.1 La lévodopa

La Lévodopa (dihydroxyphenylalanine ou L-Dopa) est transformée en DA dans le cerveau (Figure 11).

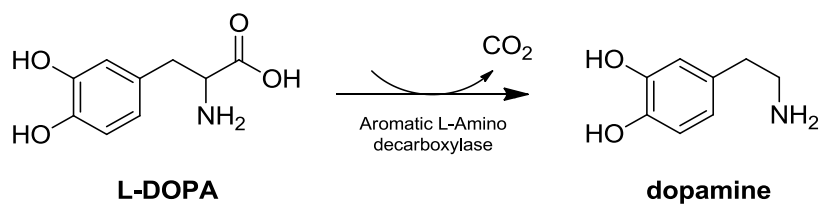


Figure 11 : Métabolisation de la L-Dopa en DA.

Cette molécule est utilisée comme précurseur biologique de la DA, cette dernière, moins lipophile, ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique (BHE). Son utilisation permet de freiner l'évolution de la maladie⁵⁴ et d'améliorer, bien que très légèrement, l'autonomie du

⁵³ Le Cavorzin P, Bentué-Ferrer D, Allain H. Les médicaments de la maladie de Parkinson en 1999. *La lettre du Pharmacologue* 1999; **13**: 76-88.

⁵⁴ Parkinson Study Group. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2498-508.

patient.⁵⁵ Il s'agit du médicament le plus puissant pour l'amélioration des troubles moteurs et peut rester efficace tout au long de la maladie, avec cependant la nécessité d'augmenter sensiblement les doses au fil de son évolution. Lorsque qu'elle est utilisée seule, 70 % de la L-Dopa est dégradée par la Dopa-décarboxylase périphérique, avant le passage de la BHE et induit de nombreux effets secondaires périphériques. C'est pourquoi, elle est toujours prescrite en association avec des inhibiteurs de la Dopa-décarboxylase périphérique (IDDC, Figure 10) afin de limiter sa dégradation dans le système nerveux périphérique et d'augmenter l'efficacité du traitement.

V.1.2 Les inhibiteurs de la dégradation de la DA

Comme mentionné précédemment, deux enzymes interviennent dans l'espace synaptique pour inactiver la DA : la COMT et la MAO (Figure 2). Certains inhibiteurs de ces enzymes sont prescrits pour traiter les personnes atteintes de la MP, empêchant ainsi la dégradation de la L-dopa et/ou de la DA synthétisée par le cerveau. On en distingue deux sortes (Figure 10) :

- les inhibiteurs de la COMT ou ICOMT, ex : Tolcapone et Entacapone,
- les inhibiteurs de la MAO-B ou IMAO-B, ex : Sélégiline et Rasagiline.

V.2 Médicaments n'agissant pas par l'intermédiaire de la DA

V.2.1 Les agonistes dopaminergiques

Un agoniste est une molécule capable de se fixer sur un récepteur membranaire, mimant ainsi l'effet de son ligand endogène. Les agonistes dopaminergiques (Figure 10) miment l'effet de la DA au niveau de la synapse en agissant directement sur les récepteurs post-synaptiques à DA. Ils ont toutefois un effet plus modéré sur la motricité que la DA elle-même (ex : Apomorphine, Bromocriptine et Piribédil).

⁵⁵PD MED Collaborative Group. Long-term effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase B inhibitors compared with levodopa as initial treatment for Parkinson's disease (PD MED): a large, open-label, pragmatic randomised trial. *Lancet* 2014; **384**: 1196-205.

V.2.2 Les antagonistes

Un antagoniste est une molécule capable d'interagir avec un récepteur membranaire en empêchant la fixation de son ligand endogène. Certains antagonistes utilisés dans le traitement de la MP bloquent les récepteurs de deux autres neurotransmetteurs également déréglés dans le cerveau des malades parkinsoniens : l'acétylcholine et le glutamate. La Trihexyphénydyle et le Parkinane bloquent les récepteurs de l'acétylcholine et possèdent par ce biais une efficacité modérée sur les signes moteurs de la maladie. Le Mantadix, quant à lui, bloque les récepteurs du glutamate.

V.3 Conclusions

Les traitements actuellement disponibles restent malheureusement symptomatiques et consistent principalement à compenser la perte en DA consécutive à la disparition des neurones dopaminergiques. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif, probablement faute d'outils efficaces permettant une étude mécanistique plus précise de la physiopathologie de la MP.

Chapitre II : Contexte et Problématique

I. Les modèles de la MP

I.1 Nécessité de modèles d'étude de la MP

Jusqu'à récemment, la plupart des connaissances sur la pathogenèse de la maladie étaient apportées par l'autopsie de cerveaux de sujets porteurs de la MP. Ces études *post-mortem*, bien qu'utiles, souffrent néanmoins d'importantes limitations comme une détérioration des tissus biologiques après la mort. Ainsi, en l'absence de modèles expérimentaux fidèles, il est souvent difficile de parvenir à des conclusions mécanistiques fiables et les scientifiques sont souvent face au dilemme de savoir si les modifications rapportées reflètent effectivement la cause ou ne sont que de simples conséquences du processus neurodégénératif.

Tous les êtres vivants présentent des similitudes biologiques que ce soit au niveau morphologique, génétique, biochimique et physiologique. Ce sont ces similitudes qui sont à l'origine de l'utilisation des animaux comme modèles d'étude de l'Homme. De fait, une grande partie de nos connaissances en biochimie, physiologie ou pharmacologie ont été acquises grâce à l'étude menée sur des modèles animaux et qui n'auraient pu être expérimentées sur l'homme pour d'évidentes raisons éthiques, légales voire religieuses.

Un « modèle animal » est un animal ayant une affection similaire à une maladie humaine et servant de modèle pour l'étude de cette affection. En l'absence de traitement curatif, l'utilisation de modèles animaux de la MP est donc indispensable afin d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie et le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Pour cela, la mise en place d'un « bon » modèle animal de la MP passe par la capacité de ce modèle à présenter de manière reproductible une lésion spécifique des neurones dopaminergiques, induisant les marqueurs biologiques spécifiques de cette maladie (agrégation de l' α -synucléine avec formation des corps de Lewy et inhibition du complexe I de CRM, *cf.* chap. I). Un « bon » modèle animal n'indurait également pas ou peu de mortalité précoce chez les sujets étudiés.

A ce jour, les modèles d'étude de la MP disponibles sont basés sur une administration systémique (rotenone, MPTP) ou intracérébrale (6-OHDA) de neurotoxines. Plus récemment, l'identification de mutations génétiques dans certaines formes de la MP a conduit au développement de nouveaux modèles animaux transgéniques de la MP. Ces modèles chimiques et génétiques ont chacun leurs spécificités et limitations : de ce fait ils sont susceptibles de révéler différemment des mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la MP et d'initier la mise en place de nouvelles approches traitement thérapeutiques.

1.2 Modèles génétiques

1.2.1 Gènes impliqués dans la MP

La MP est dans la plupart des cas une maladie sporadique et ne résulterait pas de causes génétiques évidentes. Néanmoins, comme nous l'avons mentionné précédemment, l'existence de facteurs de susceptibilité génétique est envisagée et dans 10 % des cas, la présence d'un antécédent familial est retrouvée. Ces formes héréditaires de la MP sont associées à une apparition précoce de la maladie. L'étude des formes familiales de cette pathologie a conduit à l'identification de 16 gènes (PARK 1 à 16) dont les mutations sont responsables de formes monogéniques (mutation d'un seul gène) de parkinsonisme.

Ces gènes codent pour des protéines telles que l' α -synucléine, l'ubiquitine hydrolase L1 (UCH-L1), la leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), la parkine, PINK-1 et DJ-1.⁵⁶ Les mutations des gènes PINK-1 et DJ-1, identifiées récemment dans des cas de MP à transmission autosomique récessive, sont beaucoup plus rares.^{57,58}

⁵⁶ Shimura H, Hattori N, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; **25**: 302-5.

⁵⁷ Bonifati V, Rizzu P, et al. DJ-1 (PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* 2003; **24**: 159-60.

⁵⁸ Healy DG, Abou-Sleiman PM, et al. DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; **75**: 144-5.

I.2.2 Modèles génétiques animaux de la MP

L'obtention de modèles transgéniques se fait par transfert du gène considéré dans les cellules cibles grâce à l'utilisation de vecteurs. Seuls les vecteurs de type viral sont capables de transférer du matériel génétique de façon efficace. Ces derniers peuvent être, par exemple, des adénovirus, des lentivirus ou des rétrovirus modifiés ou inactivés. Le résultat phénotypique du modèle transgénique dépend principalement du type de promoteur utilisé pour diriger le transfert du gène.

I.2.2.1 Modèles génétiques sur-exprimant l' α -synucléine

L' α -synucléine constitue le composant majoritaire des corps de Lewy. Dès lors, des modèles animaux transgéniques ont été développés afin de déterminer le rôle biologique de l' α -synucléine dans la pathogénèse de la maladie. Des modèles animaux sur-exprimant l' α -synucléine ont ainsi été mis au point.

I.2.2.1.1 Drosophiles transgéniques

Chez la drosophile, l'expression de l' α -synucléine humaine sauvage ou mutée engendre l'apparition de certaines caractéristiques de la maladie telles qu'une perte des neurones dopaminergiques, la formation d'inclusions filamenteuses intraneuronales et des troubles locomoteurs.⁵⁹ Ce modèle est le seul à présenter une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques. Il est à noter cependant que cet animal n'exprime pas naturellement l' α -synucléine ce qui en fait par conséquent un modèle imparfait. De plus, ce modèle ne développe pas les caractéristiques cliniques de la maladie telles que la bradykinésie ou les tremblements de repos.

I.2.2.1.2 Souris transgéniques

Chez la souris, la surexpression de l' α -synucléine humaine aboutit à un certain nombre de marqueurs de la MP, parmi lesquels une perte de terminaisons dopaminergiques nigrostriées, une déficience motrice et la formation d'inclusions cytoplasmiques.⁶⁰ Cependant, ces inclusions ne présentent pas l'organisation fibrillaire caractéristique des corps de Lewy

⁵⁹ Feany MB, Bender WW. A drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* 2000; **404**: 394-398.

⁶⁰ Masliah E, Rockenstein E, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 2000; **287**: 1265-1269.

observés dans la MP. De plus, certaines de ces inclusions sont également présentes dans le noyau ce qui n'est pas rencontré dans la MP. Il est à noter que les dysfonctionnements dopaminergiques et comportementaux ne sont observés que chez les lignées de souris transgéniques présentant un haut niveau de surexpression, ce qui suggère un seuil critique d'expression de l' α -synucléine requis pour observer ces anomalies. Récemment, il a été montré dans ces modèles un dysfonctionnement de la neurotransmission et une altération de la plasticité synaptique qui reflèteraient les premières modifications cellulaires avant même la neurodégénérescence.⁶¹

I.2.2.2 Modèles génétiques présentant des mutations du gène LRRK2

Il existe plus de 30 mutations touchant le gène LRRK2,⁶² dont 5 sont pathogènes (R1441C, R1441G, Y1699C, G2019S et I2020T).^{63,64} La substitution d'une glycine au codon 2019 par une sérine (G2019S) représente à elle seule la forme héréditaire la plus fréquente de la MP (4 %).^{65,66} Fait marquant, les patients présentant cette mutation développent les caractéristiques cliniques similaires à ceux des patients atteints de la MP sporadique.^{67,68} Dès lors, de nombreux modèles transgéniques reproduisant ces mutations ont été développés.

Néanmoins, ces modèles présentent un phénotype variable et sont difficiles à reproduire.⁶⁹ En effet, certains animaux présentent des lésions que d'autres ne développent pas, soulignant le manque de reproductibilité de ce modèle.

Par ailleurs, il a été démontré que les souris reproduisant ces mutations pathogènes (G2019S, R1441C ou R1441G) ne développent pas de neurodégénérescence, ni d'accumulation d' α -

⁶¹Kurz A, Double KL, Lastres-Becker I, et al. A53T- α -synuclein overexpression impairs dopamine signaling and striatal synaptic plasticity in old mice. *PLoS One* 2010; **5**(7): e11464.

⁶²Santpere G, Ferrer I. LRRK2 and neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 2009; **117**: 227-46.

⁶³Brice A. Genetics of Parkinson's disease: LRRK2 on the rise. *Brain* 2005; **128**: 2760-2.

⁶⁴Greggio E, Cookson MR. Leucine rich repeat kinase 2 mutations and Parkinson's disease: tree questions. *ASN Neuro* 2009; **14**: 13-24.

⁶⁵Mata IF, Wedemeyer WJ, Farrer MJ, Taylor JP, Gallo KA. LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insight. *Trend Neurosci* 2006; **29**: 286-93.

⁶⁶Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 2008; **7**: 583-90.

⁶⁷Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; **44**: 601-7.

⁶⁸Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; **44**: 595-600.

⁶⁹Yue Z. LRRK2 in Parkinson's disease: *in vivo* models and approaches for understanding pathogenic roles. *Febs J* 2009; **276**: 6445-54.

synucléine dans le cerveau.^{70,71,72} Ainsi, l'application de ces modèles dans l'étude mécaniste de la neurotoxicité et de la formation des corps de Lewy, ainsi que dans le développement de stratégies neuroprotectrices semble entravée.

Notons néanmoins qu'une déficience de la transmission de la DA striatale a été rapportée,⁷³ de même que l'apparition tardive (> 20 mois) des troubles moteurs chez 15 % des souris présentant la mutation G2019S.⁷⁴ Il convient de mentionner également que le déficit en DA striatale précède la perte des neurones dopaminergiques ainsi que les troubles de la fonction motrice chez les patients atteints de la mutation G2019S.⁶⁷ Par conséquent, ces modèles transgéniques semblent refléter les premiers stades de la maladie précédant la perte des neurones de la SN.

1.2.2.3 Conclusion

La création de modèles transgéniques a permis de mettre en évidence un certain nombre d'inconvénients, en effet ces modèles présentent un phénotype variable et sont difficiles à reproduire. Néanmoins, il est important de rappeler que la MP serait le résultat d'une interaction complexe de facteurs génétiques et environnementaux. Ainsi, même en présence d'une mutation d'un gène spécifique, l'apparition de la MP ne surviendrait que si la variante génétique coïncide également avec une exposition environnementale délétère. Ainsi, le manque d'exposition à un certain contexte environnemental lié à la maladie pourrait expliquer l'absence de symptômes parkinsoniens substantiels dans les modèles génétiques. De plus, ces modèles peuvent être utilisés pour explorer et mieux comprendre les interactions entre facteurs génétiques et facteurs environnementaux qui sous-tendent l'étiologie de la MP. Enfin, les modèles génétiques semblent refléter les premiers stades de la maladie précédant la perte des neurones dopaminergiques, ce qui confère à ce modèle un indéniable intérêt.

⁷⁰Tong Y, Pisani A, Martella G, et al. R1441C mutation in LRRK2 impairs dopaminergic neurotransmission in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 14622 -7.

⁷¹Melrose HL, Dachselt JC, Behrouz B, et al. Impaired dopaminergic neurotransmission and microtubule-associated protein tau alterations in human LRRK2 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2010; **40**: 503-17.

⁷²Lin X, Parisiadou L, Gu XL, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein. *Neuron* 2009; **64**: 807-27.

⁷³Yue Z, Lanchenmayer ML. Genetic LRRK2 models of Parkinson's disease: dissecting the pathogenic pathway and exploring clinical applications. *Mov Disord* 2011; **26**: 1386 -97.

⁷⁴Bezard E, Yue Z, Kirik DMD, Spillantini MG. Animal Models of Parkinson's Disease: Limits and Relevance to Neuroprotection Studies. *Mov Disord* 2013; **28**: 61-70.

I.3 Modèles chimiques

Certaines études épidémiologiques ont montré une corrélation entre l'exposition à des substances, en particulier des pesticides, et l'apparition de la MP.^{75,76,77,78}

Les biologistes ont depuis de nombreuses années à leur disposition différentes molécules capables d'induire chimiquement (*in vitro* ou *in vivo*) l'apparition des marqueurs de la MP. Ces molécules peuvent être des pesticides comme le paraquat ou la roténone ou encore des neurotoxines tels que la 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA) ou le couple MPTP/MPP⁺ (Figure 12). Ces réactifs sont couramment utilisés pour perturber la voie dopaminergique imitant ainsi le déficit en DA striatale observée chez les patients parkinsoniens.

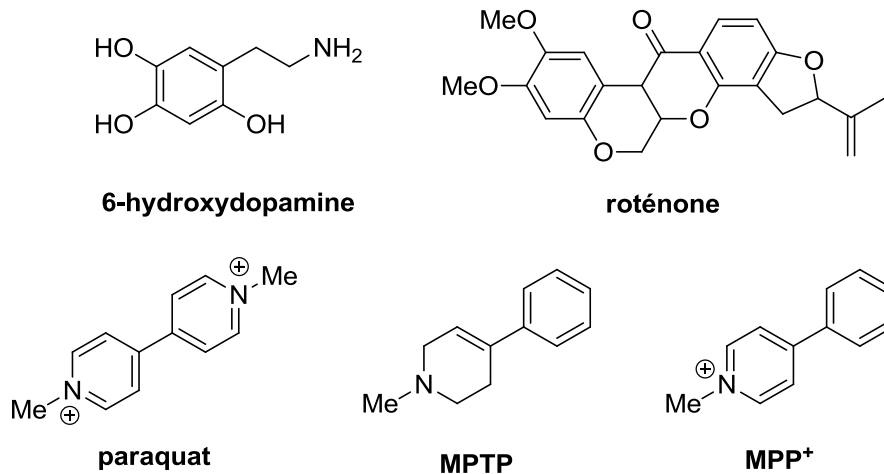


Figure 12 : Inducteurs chimiques usuels de la MP.

⁷⁵ Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience* 2000; **3**: 1301-1306.

⁷⁶ Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS. Pesticides and Parkinson's disease - is there a link? *Environmental Health Perspectives* 2006; **114**: 156-64.

⁷⁷ Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental Health Perspective* 2011; **119**: 866-872.

⁷⁸ Dhillon AS, Tarbutton GL, Levin JL, Plotkin GM, Lowry LK, Nalbone JT, et al. Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. *Journal of Agromedicine* 2008; **13**: 37-48.

Experimental Models in Parkinson Disease

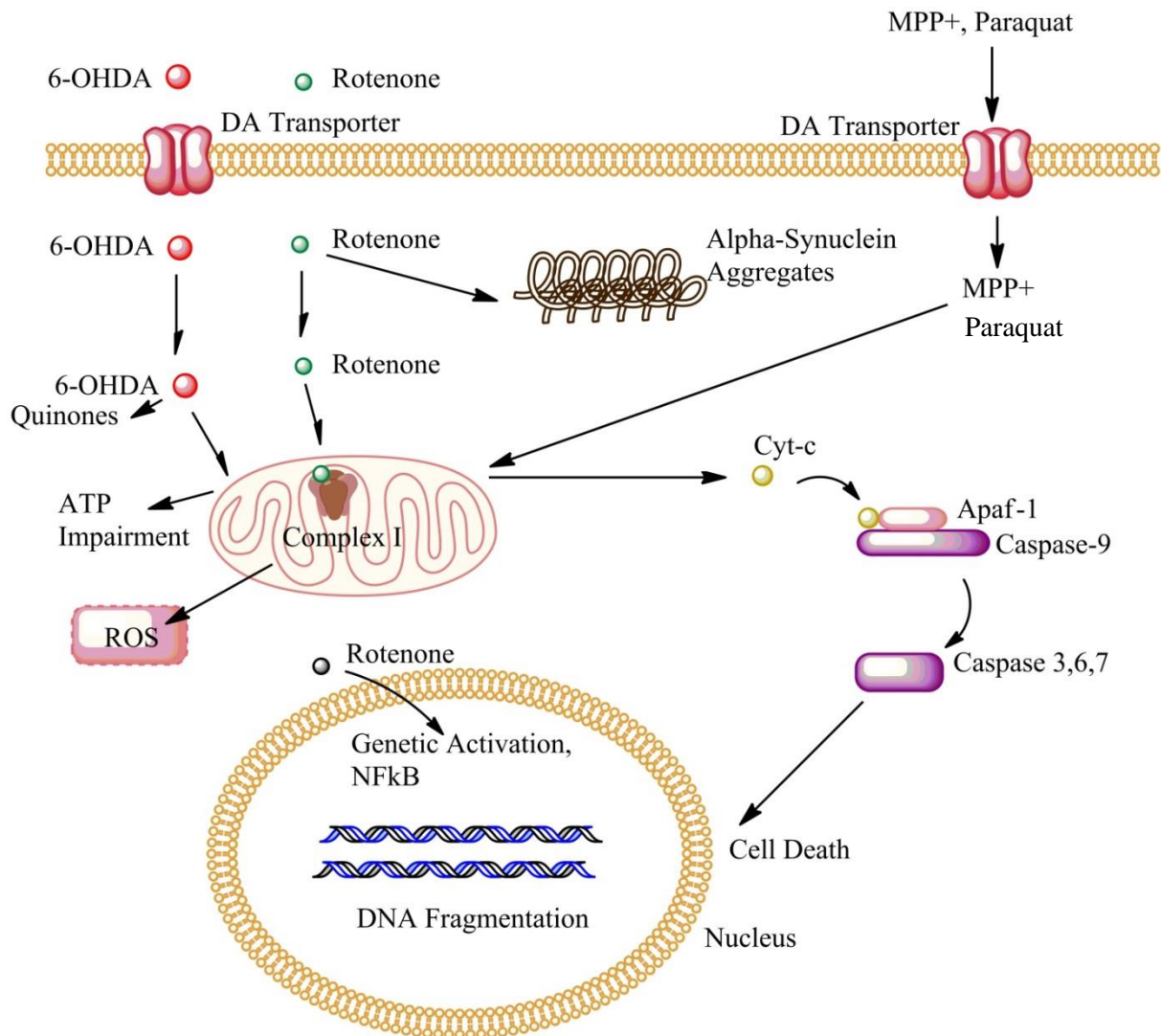


Figure 13 : Mécanismes d'induction des principales neurotoxines utilisées dans l'étude de la MP.⁷⁹

I.3.1 Modèles d'intoxication à la 6-OHDA

I.3.1.1 Description

La 6-OHDA (Figure 12) est l'analogue 6-hydroxylé de la DA présent naturellement dans l'urine humaine. Chez l'Homme, la production physiologique endogène de 6-OHDA est issue d'un mécanisme non-enzymatique d'oxydation de la DA par le H_2O_2 et des ions Fe^{2+} présents

⁷⁹Cabezas R, Fidel Avilla M, TorrenteD, et al. Astrocyte Role in Parkinson: A Double-Edged Sword. *Neurodegenerative diseases*, ISBN: 978-953-51-1088-0.

en grande quantité dans les neurones dopaminergiques. Chez les personnes atteintes par la MP, la production de 6-OHDA est accrue du fait de la production pathologique de radicaux libres et de Fe^{2+} , ce qui explique l'intérêt pour ce mode d'intoxication.

Il s'agit du premier agent chimique découvert ayant un effet neurotoxique spécifique de la voie catécholaminergique. En effet, en 1968, le premier modèle animal de la MP a été créé en injectant cette neurotoxine chez le rat. Comme la DA, la 6-OHDA ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (BHE) et doit donc être injectée par stéréotaxie dans le cerveau. Du fait de son analogie structurale avec la DA et la noradrénaline (Figure 14), elle utilise les systèmes de transport de ces catécholamines (Figure 13) et produit donc une dégénérescence spécifique des neurones catécholaminergiques. La dégénérescence neuronale induite par la 6-OHDA est principalement due à un stress oxydant de grande ampleur.

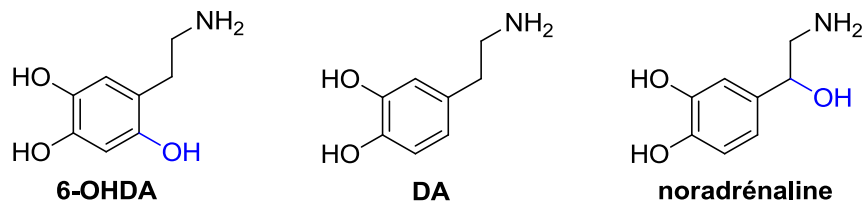


Figure 14 : Analogie structurale entre la 6-OHDA, la DA et la noradrénaline.

I.3.1.2 Mécanisme de toxicité

Il a été prouvé que la toxicité générée par la 6-OHDA était due à un stress oxydant. En effet, l'accumulation de 6-OHDA dans les neurones dopaminergiques conduit à une inhibition du complexe I de la CRM,⁸⁰ entraînant une diminution du taux d'ATP et une production d'EROs (Figure 13). Cette production a pour effet d'endommager les macromolécules et participe à la désorganisation de la structure cellulaire.⁸¹ Par ailleurs, l'injection intranigrale de fer produit des effets neurotoxiques similaires à ceux de la 6-OHDA, ce qui suggère un rôle du fer dans la dégénérescence induite par la 6-OHDA.⁸² De plus, des études ont montré que l'injection de 6-OHDA dans le cerveau de rats, réduisait l'activité du glutathion et de la superoxyde

⁸⁰ Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays* 2002; **24**: 308-318.

⁸¹ Sachs C, Jonsson G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol* 1975; **24**: 1-8.

⁸² Ben-Shachar D, Youdim MB. Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical "parkinsonism" in rats. *J Neurochem* 1991; **57**: 2133-2135.

dismutase, deux systèmes antioxydants intracellulaires, favorisant par conséquent le stress oxydant.⁸³

Notons qu'une oxydation de la 6-OHDA peut également avoir lieu à l'extérieur de la cellule, produisant alors du peroxyde d'hydrogène lequel diffuse dans la cellule et concourt à l'accroissement des taux d'EROs intracellulaires. Ces événements conjugués conduisent de manière inexorable à la mort des neurones dopaminergiques et au développement de certains marqueurs biologiques de la MP.

I.3.1.3 Limitations

La 6-OHDA ne mime pas toutes les caractéristiques pathologiques et cliniques de la MP. En effet, l'injection de 6-OHDA n'affecte pas d'autres régions du cerveau, comme le *locus coeruleus*, et n'aboutit pas à la formation de corps de Lewy comme ceux observés dans la MP. En outre, la rapidité d'action de cette toxine aboutit à un modèle expérimental différent de la dégénérescence lente et progressive observée dans la MP. Enfin, le principal défaut est que l'injection intrastriatale de 6-OHDA ne permet de créer une lésion qu'unilatérale, ne pouvant aboutir à une reproduction de la dégénérescence symétrique observée chez le malade atteint par la MP.

I.3.2 Modèle d'intoxication aux pesticides

I.3.2.1 Historique

Après la découverte du MPTP en 1982, des études épidémiologiques ont révélées un lien étroit entre l'utilisation / l'exposition à des pesticides et le développement de la MP. Depuis, la roténone et le paraquat sont couramment utilisés dans la mise en place de modèles chimiques de la MP.

⁸³Perumal AS, Gopal VB, Tordzro WK, Cooper TB, Cadet JL. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. *Brain Res Bull* 1992; **29**: 699-701.

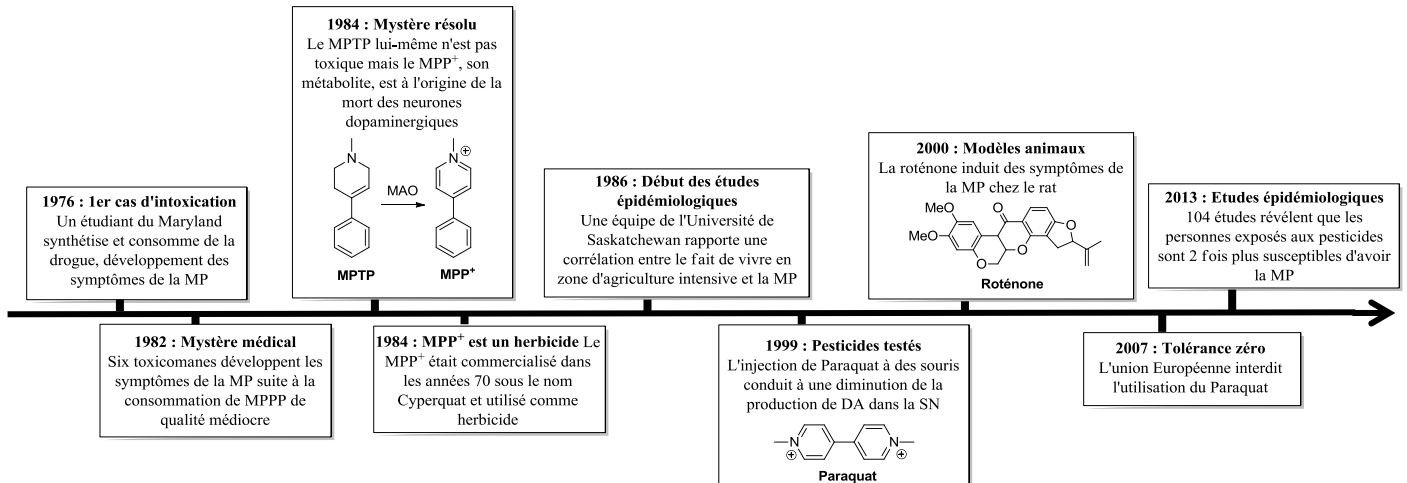


Figure 15 : Historique des modèles d'intoxication aux pesticides.⁸⁴

I.3.2.2 Roténone

I.3.2.2.1 Mécanisme de toxicité

La roténone (Figure 12) est une toxine naturelle extraite de plantes tropicales entrant dans la composition de très nombreux insecticides et pesticides. Lipophile, la roténone pénètre facilement la BHE ainsi que la membrane cellulaire des neurones et des astrocytes. Elle peut favoriser certains processus tels que la formation d'agrégats d' α -synucléine ou encore l'activation génétique par translocation vers le noyau du facteur de transcription NF-kB. En outre, la roténone s'accumule dans la mitochondrie où elle inhibe spécifiquement le complexe I de la chaîne respiratoire. Ceci a pour conséquence une déplétion en ATP, la génération d'un stress oxydant et la libération de molécules pro-apoptotiques, tels que le cytochrome c, qui activent la caspase 9 et *in fine*, la mort cellulaire (Figure 13). Puissant inhibiteur du complexe I de la CRM, la roténone est utilisée pour l'élaboration de modèles chimiques de la MP.⁸⁵

I.3.2.2.2 Administration

L'administration se fait principalement par injection intraveineuse ou sous-cutanée chronique pendant plusieurs semaines. Chez les animaux traités, on observe une dégénérescence sélective de la voie dopaminergique nigrostriée, des dommages oxydants au niveau du

⁸⁴ Wolf LK. The pesticide connection. *Chemical & Engineering New* 2013; **91**: 11-15.

⁸⁵ Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephens SE. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp* 1999; **66**:85-97.

striatum et la formation d'inclusions d' α -synucléine et d'ubiquitine ressemblants aux corps de Lewy.

I.3.2.2.3 Limitations

Alors que la MP atteint spécifiquement les neurones dopaminergiques, il a été montré que l'utilisation de la roténone induisait une inhibition uniforme du complexe I dans tout le cerveau des animaux traités. En effet, le passage de la roténone à travers la membrane cellulaire n'étant pas dépendant des DAT, cette molécule n'est donc pas spécifique des neurones dopaminergiques. D'autres limitations importantes sont à noter concernant l'utilisation du modèle chimiquement induit par la roténone pour l'étude la MP : la difficulté de mise en œuvre (administration de plusieurs semaines à plusieurs mois), une forte mortalité des animaux et surtout une variabilité importante.⁸⁶ Dans ce dernier cas en effet, certains animaux présentent des lésions que d'autres ne développent pas, soulignant le manque de reproductibilité de ce modèle.

I.3.2.3 Paraquat

I.3.2.3.1 Description

Le paraquat (Figure 12) est l'un des herbicides les plus utilisés au monde, vendu dans plus de 120 pays. En raison de son faible coût et sa facilité d'utilisation, il sert en agriculture et floriculture bien qu'il soit très toxique. Il est ainsi retrouvé fréquemment dans l'environnement et, tout comme la roténone, alimente clairement l'hypothèse selon laquelle la MP aurait une origine principalement environnementale. Bien que lentement, le paraquat traverse la BHE en utilisant le système de transport d'acides aminés neutres^{87,88} ainsi que la membrane cellulaire grâce aux DAT (Figure 13).

I.3.2.3.2 Mécanisme de toxicité

L'administration se fait principalement par voie systémique et conduit à une diminution des niveaux de DA dans le cerveau. A très forte dose, le paraquat inhibe, bien que faiblement, le complexe I de la CRM. Toutefois à plus faible dose, il provoque un dysfonctionnement des

⁸⁶ Pahwa R et Lyons KE. Handbook of Parkinson's disease, Fifth Edition. *CRC Edition* 2013.

⁸⁷ McCormack AL, Di Monte DA. Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration. *J Neurochem* 2003; **85**(1): 82-6.

⁸⁸ Berry C, La Vecchia C, et al. Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death Differ* 2010; **17**(7): 1115-25.

neurones dopaminergiques sans agir sur le complexe I de la CRM.⁸⁹ Il est intéressant de noter que cette dégénérescence neuronale est accompagnée par l'apparition d'inclusions contenant de l' α -synucléine et d'une augmentation du marquage de l' α -synucléine dans le cortex frontal.^{90,91} Ainsi, cette capacité à induire la perte des neurones dopaminergiques et la présence d'inclusions d' α -synucléine peuvent s'avérer utiles pour les études sur le rôle de l' α -synucléine dans les processus de neurodégénérescence.

I.3.2.3.3 Limitations

Le paraquat présente les mêmes limitations que la roténone, à savoir une mise en œuvre difficile et une variabilité importante.⁸⁷ De plus, la dégénérescence des neurones dopaminergiques observée est très faible (20-30 %), détectable seulement après plusieurs injections, ce qui rend la diminution du taux de DA également très faible. Il est à noter que ce modèle n'a pas atteint une large utilisation et se limite à des études en culture cellulaire et à quelques animaux.⁹²

I.3.3 Modèle d'intoxication au MPTP

Le MPTP (Figure 12) fut découvert en 1982, lorsque le cas de jeunes toxicomanes hospitalisés fut rapporté. Ils présentaient un tableau clinique extrêmement proche du syndrome parkinsonien aigu, lequel était consécutif à l'injection d'un produit de substitution de l'héroïne, le MPPP, contaminé par du MPTP (Cf.I.3.2.1).⁹³

Au vu de ces observations, le MPTP a représenté et continue de représenter un véritable outil pour le développement de modèles cellulaires et animaux de la MP. Sa découverte a constitué une étape fondamentale dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie.

⁸⁹ Richardson JR, Quan Y, et al. Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicol Sci* 2005; **88**(1): 193-201.

⁹⁰ Manning-Bog AB, McCormack AL, et al. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat ens alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2002; **277**(3): 1641-4.

⁹¹ Manning-Bog AB, McCormack AL, et al. Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *J Neurosci* 2003; **23**(8): 3095-9.

⁹² Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS Journal* 2012; **279**: 1156-66.

⁹³ Langston JW, Forno LS, et al. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Nrol* 1999; **46**: 598-605.

I.3.3.1 Métabolisation du MPTP en MPP⁺

Le MPTP lui-même n'est pas toxique et comme tout composé hautement lipophile, il traverse facilement la BHE. Ce n'est qu'une fois dans le cerveau qu'il est métabolisé en agent toxique, le *N*-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) (Figure 16). Pour cette raison, le MPTP est utilisé pour les modèles *vivo*, alors que le MPP⁺ est principalement réservé aux études *vitro*.

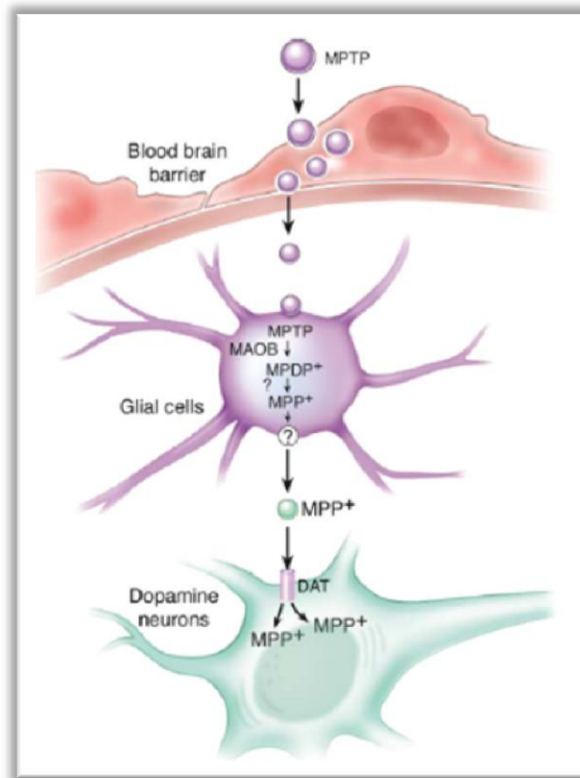


Figure 16: Métabolisation du MPTP en MPP⁺ et passages membranaires.

Après avoir passé la BHE, le MPTP est oxydé au sein des cellules astrogliales et des neurones sérotoninergiques, en *N*-méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium (MPDP⁺) par la MAO-B. Le MPDP⁺ se transforme ensuite en MPP⁺, le métabolite actif et toxique, probablement par oxydation spontanée, puis est libéré dans l'espace extracellulaire (Figure 16 et Figure 17).⁹⁴

⁹⁴Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*.2003; **39**(6):889-909

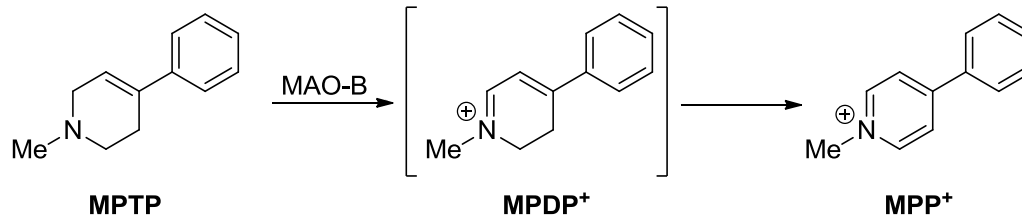


Figure 17 : Métabolisation du MPTP en MPP⁺.

En raison de sa polarité, le MPP⁺ n'est pas capable d'entrer librement à l'intérieur des neurones et sa capture est dépendante de systèmes actifs de transporteurs membranaires, et plus précisément des DAT, les transporteurs de la DA (Figure 16). En raison de cette dépendance, il diffère des autres inhibiteurs du complexe I de par sa spécificité vis-à-vis des neurones dopaminergiques.⁹⁵ Il exerce sa neurotoxicité sur le *striatum* où il existe une forte concentration de DAT au niveau des synapses dopaminergiques ; mais également dans les neurones noradrénergiques du *locus caeruleus* et dans les neurones sérotoninergiques où le MPP⁺ est aussi incorporé.

1.3.3.2 Mécanisme d'action du MPP⁺

Au sein du neurone, l'accumulation intra-cytoplasmique de MPP⁺ est régulée selon trois mécanismes (Figure 18).

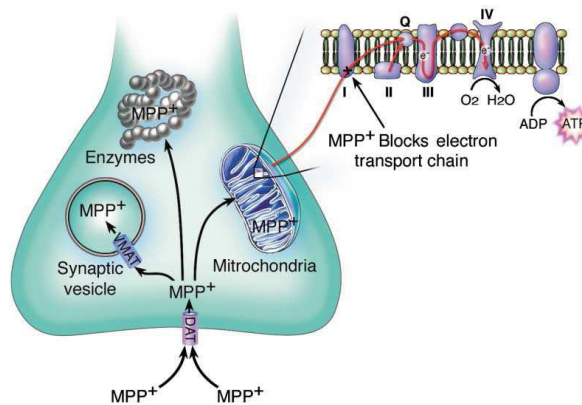


Figure 18 : Représentation des voies intracellulaires empruntées par le MPP⁺.

Ces trois mécanismes sont :

- sa séquestration dans des vésicules synaptiques via les transporteurs vésiculaires de la monoamine qui va retarder sa libération cytoplasmique (considéré comme un mécanisme de protection).

⁹⁵Javitch JA, D'Amato RJ, et al. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: up-take of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 2173-7.

- son interaction avec les enzymes cytosoliques (toxique).
- sa concentration dans les mitochondries où il va inhiber le fonctionnement du complexe I de la CRM (toxique).

L'interaction du MPP⁺ avec la neuromélanine cytoplasmique⁹⁶ ou encore avec le fer, présent en grande quantité dans les neurones dopaminergiques, conduit à une production de radicaux libres.⁹⁷ Dans les mitochondries, le MPP⁺ bloque le complexe I de la chaîne des transporteurs d'électrons, ce qui interrompt le transfert d'électrons du complexe I à l'ubiquinone. L'interruption de ce transfert induit un important déficit dans la production d'ATP et une production massive d'EROs. Tout ceci conduit à la mort des neurones dopaminergiques par apoptose (Cf. Chap1.IV.2.3).

I.3.3.3 Les différents modèles utilisant le MPTP

Depuis de nombreuses années, le couple MPTP/MPP⁺ est utilisé pour la mise au point de modèles cellulaires et animaux de la MP. Le MPTP est administré principalement de façon systémique par voie sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire ou intrapéritonéale et cette exposition entraîne une dégénérescence dopaminergique nigro-striatale chez un certain nombre d'espèces animales^{97,98} dont la souris, le chat et le singe. Il est important de noter que, selon l'espèce animale utilisée, une différence de sensibilité au MPTP est constatée. La biodistribution du MPTP, son taux de transformation en MPP⁺ ainsi que les différents sous-types de MAO selon les espèces pourraient être à l'origine de ce phénomène. Les deux espèces les plus sensibles au MPTP sont le singe et la souris.^{99,100}

I.3.3.3.1 Chez le singe

Chez le singe, le protocole d'intoxication au MPTP par infusion intracarotidienne aiguë a été très longtemps utilisé.⁹⁹ Il en résulte un syndrome hémiparkinsonien sévère et stable

⁹⁶D'Amato RJ, Alexander GM, et al. Neuromelanin: a role in MPTP-induced neurotoxicity. *Life Sci* 1987; **40**(8): 705-12.

⁹⁷Obata T. Effect of desferrioxamine, a strong iron (III) chelator, on a 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺)-induced hydroxyl radical generation in the rat *striatum*. *Eur J Pharmacol* 2006; **539**(1-2): 34-8.

⁹⁸Zigmond MJ, Stricker EM. Animals models of parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications. *Int Rev Neurobiol* 1989; **31**: 1-79.

⁹⁹Fox SH, Brotchie JM. The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. *Prog Brain Res* 2010; **184**: 133-57.

¹⁰⁰Serra PA, Pluchino S, Marchetti B, Desole MS, Miele E. The MPTP mouse model: cues on DA release and neural stem cell restorative role. *Parkinsonism Relat Disord* 2008; **14**(2):189-93.

répliquant un certain nombre des symptômes de la maladie. D'autres modèles plus progressifs ont été développés par injection répétées par voie intraveineuse^{101,102} sur plusieurs mois ou intramusculaire sur plusieurs semaines. Une dégénérescence spécifique des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée est observée avec 50 à 93 % de mort cellulaire dans la *substantia nigra pars compacta*, une diminution de plus de 99 % de la DA dans le *striatum* et l'apparition des troubles comportementaux observés dans la MP tels que l'akinésie et la rigidité musculaire (traitement chronique de 40 mg/kg repartis sur 21 mois).^{103,104} L'agrégation d' α -synucléine dans les cellules de la SN est également observée¹⁰⁵ mais ces agrégats sont différents des corps de Lewy rencontrés dans la MP pathologique. En définitive, l'intoxication au MPTP induit une dégénérescence plus rapide que celle observée chez l'humain, même lors d'une intoxication chronique. Par ailleurs, le singe est un modèle très couteux et incluant des contraintes éthiques.

I.3.3.3.2 Chez la souris

La souris est le second modèle d'intoxication par le MPTP le mieux caractérisé et le plus utilisé bien qu'il soit moins sensible que le singe.¹⁰⁶ Ce modèle nécessite l'injection d'une forte dose de MPTP pour observer une diminution significative des neurones dopaminergiques. L'intoxication par injection systémique intrapéritonéale reste le protocole le plus utilisé et entraîne un stress oxydant mis en évidence par une augmentation de la peroxydation lipidique.¹⁰⁷ La diminution des neurones dopaminergiques au niveau du *striatum* peut varier selon la dose de MPTP de 40 % à environ 90 %, 7 jours après l'intoxication (4 doses de 10 à 20 mg/kg). Une augmentation de la 3-nitrotyrosine et une diminution de la

¹⁰¹ Hantraye P, Varastet M, Peschanski M, et al. Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in baboons. *Neuroscience* 1993; **53**: 169-78.

¹⁰² Varastet M, Riche D, Maziere M, Hantraye P. Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 1994; **63**: 47-56.

¹⁰³ Hantraye P, Varastet M, Peschanski M, et al. Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in baboons. *Neuroscience* 1993; **53**: 169-78.

¹⁰⁴ Russ H, Mihatsch W, Gerlach M, Riederer P, Przuntek H. Neurochemical and behavioral features induced by chronic low dose treatment with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the common marmoset: implications for Parkinson's disease? *Neurosci Lett* 1991; **123**: 115-8.

¹⁰⁵ Kowall NW, Hantraye P, Brouillet E, et al. MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport* 2000; **11**: 211-3.

¹⁰⁶ Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 1984; **224**: 1451-3.

¹⁰⁷ Rios C, Tapia R. Changes in lipid peroxidation induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium in mouse brain homogenates. *Neurosci Lett* 1987; **77**: 321-6.

concentration en antioxydants tels que le glutathion sont également observées.¹⁰⁸ Cependant, aucune structure apparentée aux corps de Lewy n'est observée et ce modèle se révèle peu fiable pour les études comportementales.¹⁰⁹ De plus, ce modèle est peu reproductible et, d'une expérience à l'autre, les effets varient en fonction notamment du genre, de l'âge et du poids de la souris.

I.3.3.3 Limitations

Le modèle d'intoxication au MPTP a été d'une aide inestimable pour l'étude et la compréhension de la MP. En effet, grâce à ce modèle, un dysfonctionnement mitochondrial a pu être suggéré et un rôle étiologique de l'exposition à des toxines environnementales tels que les pesticides a pu être identifié. Cependant, la rapidité d'action de cette toxine aboutit à un modèle expérimental différent de la dégénérescence lente et progressive observée dans la MP. En ce sens, les études anatomo-pathologiques *post-mortem* des cerveaux des toxicomanes accidentellement intoxiqués au MPTP ont révélé l'absence des marqueurs histo-pathologiques caractéristiques de la MP que sont les corps de Lewy. Ceci pourrait s'expliquer par la nature aiguë de l'intoxication au MPTP qui induit une dégénérescence trop soudaine pour permettre la formation de corps de Lewy. En effet il est suggéré que ces derniers se développeraient très progressivement sur le long terme.¹¹⁰ Les modèles *in vitro* souffrent des mêmes limitations, la mort cellulaire étant observée après seulement 24 h d'exposition.

En définitive, la cinétique d'action rapide voire brutale de cette toxine rend le modèle MPTP/MPP⁺ chez la souris peu fidèle à la MP et inadapté, d'une part, à l'étude des mécanismes biochimiques et moléculaires lents qui sont probablement impliqués lors de l'apparition de la maladie, et d'autre part à l'évaluation prédictive d'agents thérapeutiques, potentiellement antiparkinsoniens.

¹⁰⁸ Sriam K, Pai KS, Boyd MR, Ravindranath V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res* 1997; **749**: 44-52.

¹⁰⁹ Luchtman DW, Shao D, Song C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in threeregimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Physiol Behav* 2009; **98**: 130-8.

¹¹⁰ Betarbet R, Sherer TB, et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; **3**: 1301-6.

II. Propriétés et utilisations des pyridiniums

Au cours de notre recherche bibliographique, il nous est apparu que les composés de type pyridinium entraient dans la composition de produits de consommation relativement courante, pour des utilisations dans domaines d'application très divers. Sans prétendre qu'il s'agit à chaque fois d'inducteurs parkinsoniens potentiels, il nous a toutefois semblé intéressant de montrer combien l'exposition humaine à ce type de composés pouvait être significative.

Les sels de *N*-alkyle pyridinium sont essentiellement utilisés pour leur propriété tensioactive. Cette propriété trouve des applications tant dans le secteur industriel (pour des finalités médicales, cosmétiques, ou encore pour la désinfection) qu'en recherche académique.

II.1 Propriété tensioactive

II.1.1 Utilisation en tant qu'agents antimicrobiens

II.1.1.1 Propriété antimicrobienne

Les sels de *N*-alkyle pyridinium limitent ou empêchent la croissance d'une grande variété de virus ou de microorganismes tels que les bactéries, les champignons ou les protozoaires. Par adsorption à la surface des membranes, ils induisent divers changements dans l'organisation de ces microorganismes telle qu'une altération de leur structure ou encore une perturbation des processus cellulaires, conduisant ainsi à l'arrêt de la croissance microbienne et donc à la mort cellulaire.

L'activité antimicrobienne des sels de *N*-alkyle pyridinium augmente généralement avec la longueur de la chaîne alkyle mais aussi, dans le cas de pyridiniums substitués sur d'autres positions de l'hétérocycle, de la nature et de la position de ces substituants. L'activité antimicrobienne de chlorures de *N*-alcoxyméthyle pyridinium diversement substitués en position 3 a été évaluée (Figure 19).¹¹¹

¹¹¹Pernak J, Branicka M. The properties of 1-alkoxymethyl 3-hydroxypyridinium and 1-alkoxymethyl 3-methylamino pyridinium chlorides. *J Surfactants Deterg* 2003; **6**: 119-23.

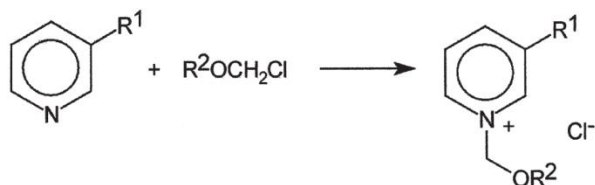


Figure 19 : Synthèse de sels de chlorure de 1-alcoxyméthyle pyridinium diversement substitués.¹¹¹

Cette étude a montré que les sels de pyridinium substitués par un groupement diméthylamino avaient une activité antimicrobienne supérieure à celle observée avec les composés substitués par un groupement hydroxyle.

Une autre étude a montré que les structures amphiphiles de type pyridinium (Figure 20) étaient plus actives que leurs homologues triméthylammoniums.¹¹²

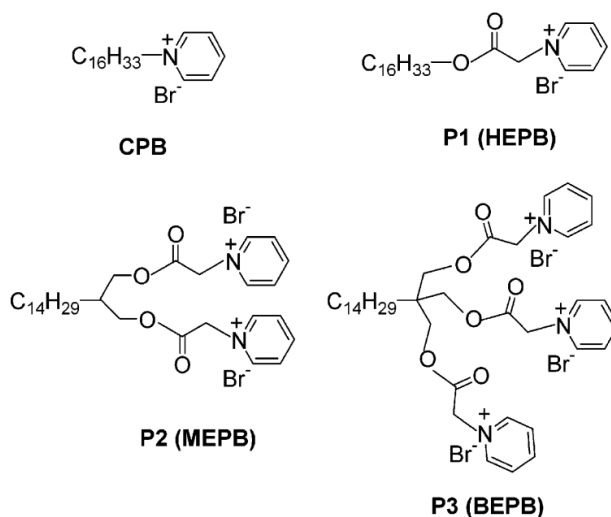


Figure 20 : Pyridiniums amphiphiles développés par Haldar *et al.*¹¹²

Fujimoto *et al.* ont évalué *in vitro* l'activité antipaludique de dérivés de bromures de 4-carbamoyl-1-alkylpyridinium (Figure 21) contre la souche de plasmodium *falciparum* FCR-3. Ils ont démontré que le pyridinium amphiphile offrant la meilleure activité était celui possédant une chaîne alkyle à huit atomes de carbone.¹¹³

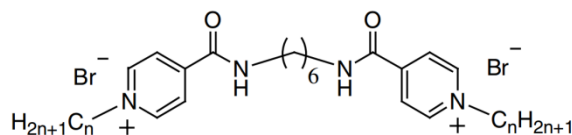


Figure 21 : Sels de bis-pyridinium développés par Fujimoto *et al.*¹¹³

¹¹² Haldar J, Kondaiah P, Bhattacharya S. Synthesis and antibacterial properties of novel hydrolyzable cationic amphiphiles. Incorporation of multiple headgroups leads to impressive antibacterial activity. *J Med Chem* 2005; **48**: 3823-31.

¹¹³ Fujimoto K, Morisaki D, Yoshida M, et al. Antimalarial effect of bis-pyridinium salts, N, N'-Hexamethylene bis(4-carbamoyl-1-alkyl pyridinium bromide). *Bioorg Med Chem Lett* 2006; **16**: 2758-60.

II.1.1.2 Applications

Les sels de pyridinium étant très efficaces contre un grand nombre de microorganismes, ils trouvent donc de nombreuses applications comme agents antimicrobiens.

II.1.1.2.1 Applications chirurgicales

Les sels de pyridinium sont utilisés pour stériliser et éliminer le sang coagulé des instruments chirurgicaux. De plus, leur utilisation permet l'irrigation efficace des plaies avec récupération rapide et réduction des risques d'infection.

II.1.1.2.2 Usage médical

Le chlorure de *N*-cétypyridinium est présent dans la formulation certains médicaments telle que la Griséoflavine (antibiotique) afin d'augmenter l'efficacité du médicament.¹¹⁴ Il est également utilisé dans les bains de bouche et les dentifrices afin de lutter contre la plaque dentaire et les gingivites. Des mélanges équimolaires de chlorure de *N*-dodécypyridinium et de laurylsulfate de sodium ont été utilisés pour la formulation de médicaments transdermiques afin d'augmenter la perméabilité de la peau et par suite, l'action et l'efficacité du médicament.¹¹⁵ Enfin, certains sels de pyridiniums sont également utilisés pour le traitement d'infections urinaires.

II.1.1.2.3 Désinfectants

Les sels de pyridinium peuvent être utilisés en tant que désinfectant d'ustensiles de cuisine et d'équipement de transformation alimentaire. De plus, leur propriété germicide est également utilisée dans l'industrie laitière pour la désinfection des bidons de lait et des machines à traire.¹¹⁶

II.1.1.2.4 Cosmétique

L'action antiseptique des sels de pyridinium en fait des constituants de choix pour la formulation de produits cosmétiques. Ils sont ajoutés à un certain nombre de produits cosmétiques tels que des lotions après-rasage, crèmes de rasage, crème pour la peau,

¹¹⁴ Said S, Mahrous H, Kassem A. Clinical study on the antifungal activity of griseofulvin in the presence of surfactants. *Infection* 1976; **4**: 49-50.

¹¹⁵ Karande P, Mitragotri S. High throughput screening of transdermal formulations. *Pharm Res* 2002; **19**: 655-60.

¹¹⁶ Madaan P, Tyagi VK. Quaternary pyridinium salts: a review. *Journal of Oleo Science* 2008; **57**: 197-215.

shampoings et lotion pour le corps. Nakamura *et al.* ont développé un procédé de fabrication de brosses antimicrobiennes capables de prévenir certains problèmes de peau. Pour ce faire, des poils d'animaux sont trempés dans une solution contenant 0,2-7,5 % de sel d'alkylpyridinium sous chauffage.

II.1.2 Autres utilisations

Des études décrivent l'utilisation de *N*-alkyle pyridiniums pour la réalisation de lipofection (ou transfection par liposome).^{117,118} Cette technique est utilisée pour injecter du matériel génétique dans une cellule au moyen de liposomes, ces derniers pouvant facilement fusionner avec la membrane cellulaire.

Les sels de *N*-alkyle pyridinium peuvent également être utilisés afin d'éliminer les traces d'eau des huiles usagées,¹¹⁹ en tant qu'inhibiteurs de corrosion,^{120,121} dans la préparation d'émulsion de bitume,¹²² dans l'extraction liquide-liquide,^{123,124,125} dans la polymérisation du styrène,^{126,127} dans le traitement des textiles¹²⁸ et en électrodialyse.¹²⁹

¹¹⁷ Ilies MA, Johnson BH, Makori F, et al. Pyridinium cationic lipids in gene delivery: an in vitro and in vivo comparison of transfection efficiency versus a tetraalkylammonium congener. *Arch Biochem Biophys* 2005; **435**: 217-26.

¹¹⁸ Van der Woude I, Wagenaar A, Meekel AAP, et al. Novel pyridinium surfactants for efficient, nontoxic in vitro gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 1160-5.

¹¹⁹ Spei B, Jonke H. Method of removing water from waste oil using cationic amino compounds. WO/1994/027703.

¹²⁰ Free ML. Understanding the effect of surfactant aggregation on corrosion inhibition of mild steel in acidic medium. *Corros Sci* 2002; **44**: 2865-70.

¹²¹ Shah SS, Fahey WF, Qude ABA. Corrosion inhibition in highly acidic environments by use of pyridine salts in combination with certain cationic surfactants. *US Pat* 1992; **53**, 36, 441.

¹²² Stupakova LF, Poletav AV. Use of surfactant E-I in the construction of road surfaces. *Akt Veshchestu* 1974; 203-204.

¹²³ Naader A, Shabnam S, Ali J. Liquid-liquid extraction of Palladium (II) from hydrobromic acid media by hexadecylpyridinium bromide. *Anal Sci* 2002; **18**: 307-11.

¹²⁴ Serrat FB, Bosch GM. Colorimetric method for the determination of vanadium with tannic acid in water and oils. *Fresenius' J Anal Chem* 1994; **349**: 717-21.

¹²⁵ Purkait MK, Das GS, De S. Removal of dye from wastewater using micellar-enhanced ultrafiltration and recovery of surfactant. *Sep Purif Technol* 2004; **37**: 81-92.

¹²⁶ Montoya-Goni A, Sherington DC, Schoonbrood HAS, Asua JM. Reactive surfactants in heterophase polymerization XXIV. Emulsion polymerization of styrene with maleate- and succinate- containing cationic surfactants. *Polymer* 1999; **40**: 1359-66.

¹²⁷ Zaragoza-Contreras EA, Rodriguez-Gonzalez RJ, Navarro-Rodriguez D. Emulsion polymerization of styrene using Series of rigid rod-like cationic surfactants. *Macromol Chem Phys* 1999; **200**: 828-33.

¹²⁸ Price AK, Sukomick B. Polyfluoroalkoxyalkyl pyridinium salts. *US Pat* 1972; **36**, 74, 798.

¹²⁹ Sata T, Izuo R, Mizutani Y, Yamane R. Transport properties ion exchange membranes in the presence of surface active agents. *J Colloid Interface Sci* 1972; **40**: 317-28.

II.2 Autres propriétés

II.2.1 Transport de principes actifs

L'industrie pharmaceutique a développé différentes techniques afin d'améliorer l'absorption et la libération de composés bioactifs au sein de l'organisme. Des dérivés de la pénicilline ont pu être transportés à travers les membranes biologiques, vers le cerveau, en utilisant un transporteur chimique basé sur le système redox dihydropyridine/pyridinium (Figure 22).¹³⁰ Pour ce faire, le principe actif est accroché à une dihydropyridine. Une fois la BHE traversée, la dihydropyridine est oxydée en sel de pyridinium, ce qui bloque le système transporteur-pénicilline à l'intérieur du cerveau et augmente ainsi l'effet du principe actif tout en diminuant considérablement les effets secondaires. Le même système redox dihydropyridine/pyridinium a été utilisé afin de transporter le chlorambucil, un agent alkylant anti-tumoral, jusqu'au SNC.¹³¹

¹³⁰ Pop E. Targeting penicillins to the central nervous system: chemical delivery systems and redox analogs. *Adv Drug Delivery Rev* 1994; **14**: 211-26.

¹³¹ Bodor N, Venkatraghavan V, Winwood D, et al. Improved delivery through biological membranes XLI. Brain-enhanced delivery of chlorambucil. *Int J Pharm* 1989; **53**: 195-208.

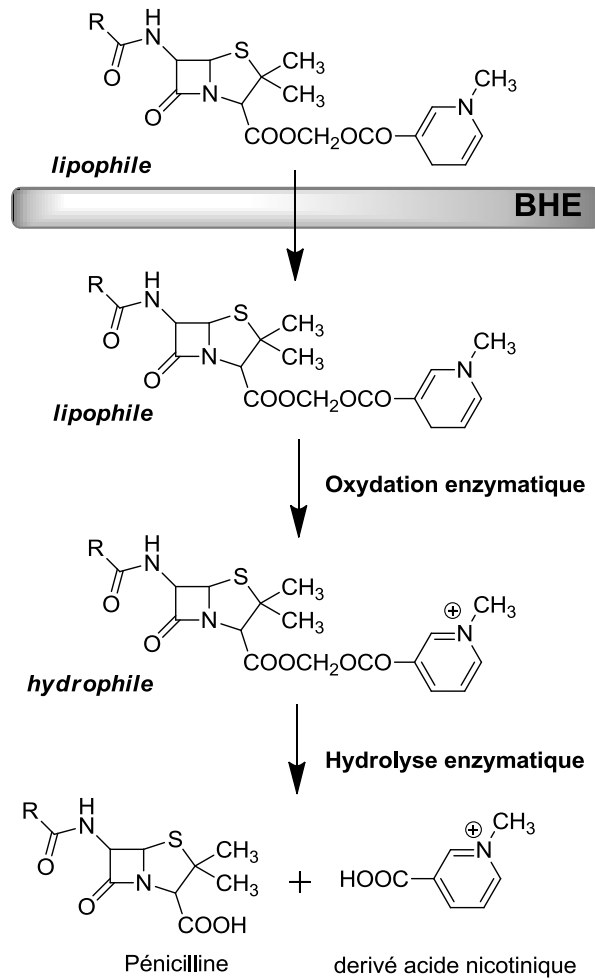


Figure 22 : Transport de dérivés de la pénicilline jusqu'au SNC. Utilisation du système redox dihydropyridine/pyridinium.¹³⁰

II.2.2 Additifs alimentaires

Villard *et al.* ont décrit la synthèse d'un exhausteur de goût, l'alapyridaïne (Figure 23).¹³² Bien que totalement insipide, ce pyridinium permet d'augmenter l'intensité du goût sucré du glucose et du sucrose.

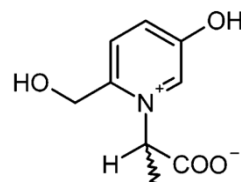


Figure 23 : Structure de l'alapyridaïne ou N-(1-Carboxyethyl)-6-(hydroxyméthyl)pyridinium-3-ol.

¹³²Villard R, Robert F, Blank I, Bernardinelli G, et al. Racemic and enantiopure synthesis and physicochemical characterization of the novel taste enhancer N-(1-carboxyethyl)-6-(hydroxymethyl)pyridinium-3-ol inner salt. *J Agric Food Chem* 2003; **51**: 4040-5.

Par la suite, Soldo *et al.* se sont inspiré de ces travaux et ont décrit la synthèse de dérivés de l'alapyridaine étudiés comme supprimeurs d'amertume.¹³³

II.2.3 Electrolyte pour batterie lithium

Certains sels de pyridinium peuvent être utilisés comme électrolytes liquides dans les batteries au lithium. En effet, ils permettent de conduire le courant électrique et assurent ainsi le transport des ions lithium entre la cathode et l'anode.¹³⁴

III. Analogues du MPP⁺ et étude de la MP

III.1 Historique

C'est consécutivement à la découverte du MPP⁺, métabolite actif du MPTP, et de son implication dans l'induction de symptômes similaires à ceux de la MP, que l'étude sur les dérivés de type pyridinium a pris son essor. Par la suite, les chercheurs ont tenté d'améliorer et de comprendre l'activité biologique de cette toxine en synthétisant des dérivés du MPP⁺.

Initialement, il avait été proposé que les propriétés redox du MPP⁺ étaient à l'origine de sa toxicité et de son interaction avec le complexe I de la CRM. Alimentant cette hypothèse, des mesures de potentiels de réduction d'analogues du MPP⁺ semblaient confirmer cette corrélation.^{135,136} Par la suite, d'autres études vinrent cependant contredire cette théorie.

¹³³ Soldo T, Hofmann R. Application of hydrophilic interaction liquid chromatography/Comparative taste dilution analysis for identification of a bitter inhibitor by a combinatorial approach based on Maillard reaction chemistry. *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 9165-71.

¹³⁴ Diaw M, Chagnes A, Carre B, Willmann P, Lemordant D. Mixed ionic liquid as electrolyte for lithium batteries. *J Power Sources* 2005; **146**: 682-4.

¹³⁵ Sayre LM, Arora PK, Feke SC, Urbach FL. Mechanism of induction of Parkinson's disease by 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Chemical and electrochemical characterization of a geminal-dimethyl-blocked analogue of a postulated toxic metabolite. *J Am Chem Soc* 1986; **108**: 2464-6.

¹³⁶ Franck DM, Arora PK, Blumer JL, Sayre LM. Model study on the bioreduction of paraquat against a « redox cycling » mechanism in MPTP neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **147**: 1095-104.

Ainsi, alors qu'une première étude avait permis de déterminer l'ordre décroissant de neurotoxicité (Figure 24),¹³⁷ une autre étude avait quant à elle mis en évidence un ordre décroissant de potentiel de réduction (E^{0} vs NHE dans l'acétonitrile) **M2Py-MPP⁺** (-1,05 V) > **4'-F-MPP⁺** (-1,18 V) > **MPP⁺** (-1,20 V) > **4'-MeO-MPP⁺** (-1,24 V).¹³⁵

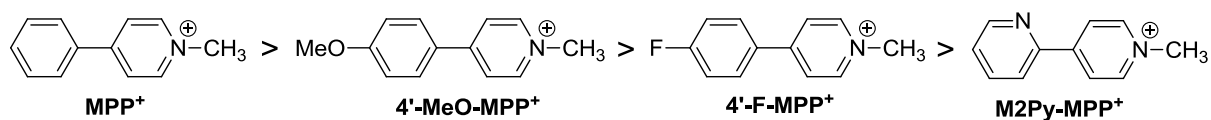


Figure 24 : Ordre de neurotoxicité établi par Arora et al.¹³⁷

Ainsi, s'il existe une corrélation entre les différents analogues du MPP⁺ et leur toxicité, elle semble davantage impliquer leur structure chimique que leurs propriétés redox. Des variations autour de la structure du MPP⁺ ont donc été réalisées par la suite et corrélées à l'activité toxicologique des composés ainsi obtenus.

III.2 Modifications structurales du MPP⁺

Une très abondante littérature rend compte des modifications structurales apportées au MPP⁺ pour non seulement permettre l'obtention de nouveaux inducteurs chimiques parkinsoniens mais également, comprendre leur mécanisme d'action. Pour l'essentiel, ces modifications structurales correspondent à l'un des quatre types présentés sur la Figure 25.

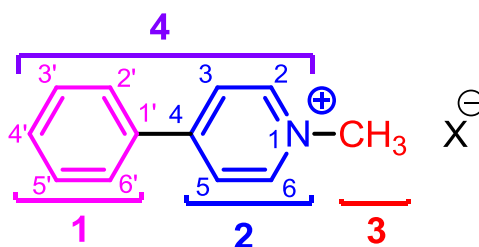


Figure 25 : Les 4 types de modifications structurales du MPP⁺.

Parmi les différents types de modification structurale, l'on peut ainsi distinguer :

- Modification de type 1 : substitution du phényle ou remplacement par un autre groupement ou cycle.

¹³⁷ Arora PK, Riachi NJ, Fiedler GC, et al. Structure-neurotoxicity trends of analogues of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) the cytotoxic metabolite of the dopaminergic neurotoxin MPTP. *Life Sc* 1990; **46**: 379-90.

- Modification de type 2 : déplacement du phényle autour du noyau pyridinium (position 2 ou 3), addition d'un autre substituant sur le noyau pyridinium ou remplacement du noyau pyridinium par un autre cycle.
- Modification de type 3 : remplacement du groupement méthyle.
- Modification de type 4 : remplacement du noyau pyridinium et du noyau phényle.

III.3 Etude des propriétés inductrices des analogues du MPP⁺

Afin d'inhiber (*in vitro* ou *in vivo*) la respiration mitochondriale et ainsi induire une toxicité dopaminergique, les analogues du MPP⁺ doivent être, successivement, en mesure de (Figure 26) :

- 1) bénéficier du transport actif par les DAT (et donc d'avoir une affinité avec ces transporteurs) pour pénétrer les neurones dopaminergiques,
- 2) traverser la membrane mitochondriale grâce au gradient électrochimique,
- 3) présenter une affinité pour le(s) site(s) d'inhibition du complexe I.

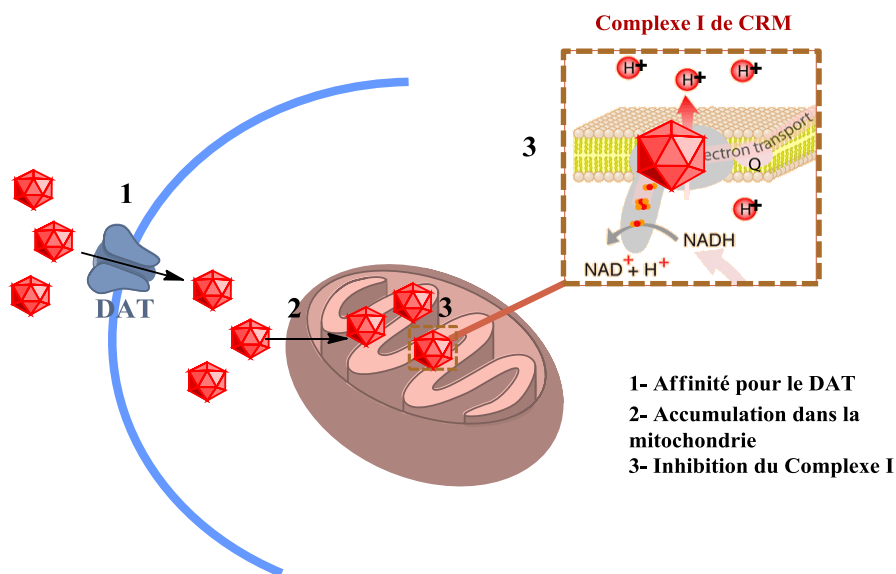


Figure 26 : Les différentes étapes à franchir par le MPP⁺ et ses analogues afin d'inhiber le complexe I de la CRM.

III.3.1 Inhibition du complexe I de la CRM

III.3.1.1 Connaissances acquises sur le complexe I

III.3.1.1.1 Nature des sites d'inhibition du complexe I

Des travaux ont suggéré l'existence de deux sites d'inhibition du complexe I accessibles au MPP⁺ et à ses dérivés.¹³⁸ L'un de ces sites serait hydrophile (site **A**) et de ce fait *a priori* accessible aux composés cationiques que sont les pyridiniums. L'autre site (site **B**) serait quant à lui protégé par une barrière hydrophobe, compliquant donc l'approche de composés tels que les pyridiniums. L'occupation des deux sites serait par ailleurs requise pour avoir une inhibition totale du complexe I.

III.3.1.1.2 Localisation du site d'inhibition hydrophobe

L'anion lipophile tétraphénylborate (TPB⁻) est connu pour faciliter l'accès des dérivés du MPP⁺ au site d'inhibition hydrophobe (*vide infra*). Une expérience a été réalisée avec un inhibiteur de type MPP⁺ en présence de TPB⁻ sur le complexe I préalablement isolé de la membrane interne mitochondriale et des autres complexes de la CRM. Dans ces conditions, il a été constaté que l'effet du TPB⁻ était perdu, aucune augmentation de l'inhibition étant alors observée. Il en fut conclu que le site d'inhibition hydrophobe avait été perdu avec l'isolement du complexe I et que selon toute vraisemblance, celui-ci devait donc être présent dans la membrane interne mitochondriale.¹³⁹

Dans une autre expérience, également menée en présence de TPB⁻, il a été constaté que l'inhibition ne variait pas lorsque la température augmentait. Néanmoins, en absence de TPB⁻, une augmentation de l'inhibition a été observée lorsque la température passait de 10 à 40 °C.¹³⁹ Ainsi, l'augmentation de la température semble avoir le même effet que le TPB⁻. Cette augmentation de l'inhibition, interprétée donc comme une facilité accrue d'accès au site hydrophobe, a conduit à suggérer l'idée selon laquelle ce site hydrophobe ne devait pas être profondément ancré dans la membrane interne de la mitochondrie mais au contraire, situé à proximité de sa surface.

¹³⁸ Krueger MJ, Sablin SO, Ramsay RR, Singer TP. Reactivation of NADH dehydrogenase (complex I) inhibited by 1-methyl-4-(4'-alkylphenyl)pyridinium analogues: a clue to the nature of the inhibition site. *J Neurochem* 1993; **61**: 1546-8.

¹³⁹ Gluck MR, Krueger MJ, Ramsay RR, Sablin SO, et al. Characterization of the inhibitory mechanism of 1-methyl-4-phenylpyridine analogs in inner membrane preparations. *J Biol Chem* 1994; **269**: 3167-74.

III.3.1.1.3 Localisation du site d'inhibition du MPP⁺ par rapport à celui d'autres inhibiteurs

Il a été démontré que le MPP⁺ et certains de ses analogues (Tableau 5, entrées 1-4) empêchaient la fixation et l'inhibition de la respiration mitochondriale par la roténone¹⁴⁰ et la piericidine A.^{141,142} Il en fut tiré que le MPP⁺ et ses analogues devaient se lier au même site spécifique ou tout du moins, à des sites suffisamment proches pour empêcher la fixation de la roténone et de piericidine A.

III.3.1.1.4 Complexe I dans la chaîne de transport d'électron isolé (CTEI) ou au sein de la mitochondrie entière (ME)

Pour tous les analogues testés du MPP⁺, il a été constaté que l'inhibition induite par ces composés était différente selon qu'elle était mesurée sur le complexe I présent au sein de la chaîne de transport d'électrons isolée (CTEI) ou au sein de la mitochondrie entière (ME) extraite de cellules. En l'occurrence, il a été montré que l'inhibition était plus importante sur le complexe I dans la ME que dans la CTEI.^{143,144,145,146,147}

Alors que les mesures faites sur le complexe I dans la CTEI reflètent l'affinité des composés testés pour les sites d'inhibition, cet accroissement de l'inhibition du complexe I dans la ME peut quant à lui être interprété comme étant le résultat d'une accumulation de l'inhibiteur au sein de la matrice mitochondriale.

¹⁴⁰Ramsay RR, Krueger MJ, Youngster SK, et al. Interaction of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) and its analogs with the rotenone/pieridicin binding site of NADH dehydrogenase. *J Neurochem* 1991; **56**: 1184-90.

¹⁴¹Ramsay RR, Krueger MJ, Youngster SK, Singer TP. Evidence that the inhibition sites of neurotoxic amine 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) and of the respiratory chain inhibitor piericidin A are the same. *Biochem J* 1991; **273**: 481-4.

¹⁴²Ramsay RR and Singer TP. Relation of superoxide generation and lipid peroxidation to the inhibition of NADH-Q oxidoreductase by rotenone, pieridicin A, and MPP⁺. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189**: 47-52.

¹⁴³Hoppel CL, Greenblatt D, Kwok H, Arora PK, Singh MP, Sayre LM. Inhibition of mitochondrial respiration by analogs of 4-phenylpyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium cation (MPP⁺), the neurotoxic metabolite of MPTP. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **148**: 684-93.

¹⁴⁴Sayre LM, Singh MP, Arora PK, Wang F, et al. Inhibition of mitochondrial respiration by analogues of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium: Structural requirements for accumulation-dependent enhanced inhibitory potency on intact mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1990; **280**: 274-83.

¹⁴⁵Tian YM and Griffiths DE. N-alkyl pyridiniums as inhibitors of complex I. *Biochem Soc Transact* 1993; **22**: 71.

¹⁴⁶Murphy MP, Krueger MJ, Sablin SO, Ramsay RR, Singer TP. Inhibition of complex I by hydrophobic analogues of N-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) and the use of an ion-selective electrode to measure their accumulation by mitochondria and electron-transport particles. *Biochem J* 1995; **306**: 359-65.

¹⁴⁷Sablin SO, Krueger MJ, Yankovskaya VL, Tkachenko SE, et al. Inhibition of NADH oxidation by 1-methyl-4-phenylpyridinium analogs as the basis for the prediction of the inhibition potency of novel compounds. *J Biochem Toxicol* 1996; **11**: 33-43.

III.3.1.2 Etude structure-activité sur le complexe I dans la CTEI

Les études d'inhibition du complexe I de CRM par les analogues du MPP⁺ ont montré l'influence de 2 principaux facteurs qui sont : la lipophilie et la présence (ou non) d'une charge positive éventuellement délocalisable et portée par l'atome d'azote.

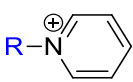
III.3.1.2.1 Influence de la lipophilie

Plusieurs études ont montré l'influence de la lipophilie sur l'inhibition du complexe I. Elle faciliterait l'accès au site d'inhibition hydrophobe du complexe I (l'accès au site hydrophile étant quant à lui assuré par la nature cationique du pyridinium). Cette lipophilie peut être modulée soit en ajoutant des substituants carbonés dans la structure initiale du MPP⁺, soit en lui adjoignant un contre-ion lipophile.

❖ Augmentation de la lipophilie par greffage de substituants carbonés

Tian et Griffiths ont étudié l'inhibition du complexe I par une série de *N*-alkyle pyridiniums (Tableau 1).¹⁴⁵

Tableau 1 : Influence du greffage de substituants carbonés sur l'inhibition du complexe I dans la CTEI.¹⁴⁵

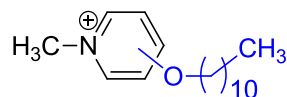


entrée	R	IC ₅₀ (μM)
1	méthyle (C1)	> 10 000
2	hékyle (C6)	3 600
3	octyle (C8)	580
4	dodécyle (C12)	24
5	hexadécyle (C16)	3,6

Cette étude a permis de mettre en évidence une inhibition du complexe I d'autant plus grande que le pyridinium était porteur sur son atome d'azote d'une longue chaîne carbonée. Ainsi, une concentration supérieure à 10 mM est-elle nécessaire pour constater une inhibition de 50 % avec le *N*-méthyle pyridinium (entrée 1), quand une concentration de seulement 3,6 μM suffit avec le *N*-hexadécyle pyridinium (entrée 5).

Plus récemment, Miyoshi *et al.* ont synthétisé une série de *N*-méthyl(undecyloxy) pyridiniums et ont testé leurs effets sur le complexe I (Tableau 2).¹⁴⁸

Tableau 2 : Inhibition du complexe I dans la CTEI d'une série de *N*-méthyl(undecyloxy) pyridiniums.¹⁴⁸



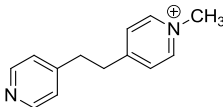
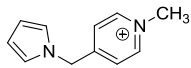
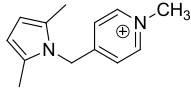
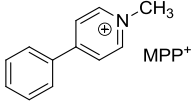
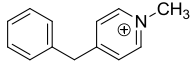
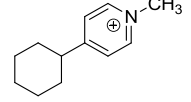
entrée	position	IC ₅₀ (μM)
1	MPP ⁺	2000
2	ortho	2,8
3	méta	1,9
4	para	1,9

Ces composés très lipophiles se sont révélés être de bons inhibiteurs du complexe I, nettement plus puissants que le MPP⁺. Fait intéressant, la position sur le noyau pyridinium de la chaîne undecyloxy ne semble pas jouer significativement sur les propriétés inhibitrices de ces pyridiniums (entrées 2-4).

Une autre façon de jouer sur la lipophilie des pyridiniums consiste à introduire dans leur structure, des éléments polaires (tels que des hétéroatomes) ou au contraire, apolaires (chaîne ou cycle aliphatique). Des effets sur l'inhibition du complexe I ont ainsi été constatés après remplacement du noyau phényle en position 4 du pyridinium du MPP⁺ par de tels substituants (Tableau 3).¹⁴⁴

¹⁴⁸Miyoshi H, Inoue M, Okamoto S, Ohshima M, Sakamoto K, Iwamura H. Probing the ubiquinone reduction site of mitochondrial complex I using novel cationic inhibitors. *J Biol Chem* 1997; **272**: 16176-83.

Tableau 3 : Influence de l'insertion de groupements polaires ou apolaires sur l'inhibition du complexe I dans la CTEL.^{143,144}

entrée	composés	IC ₅₀ (mM)
1		35,0 ¹⁴⁴
2		14,5 ¹⁴⁴
3		12,5 ¹⁴⁴
4		9,5 ¹⁴⁴
5		1,3 ¹⁴⁴ - 2,1 ¹⁴³
6		0,75 ¹⁴⁴

❖ Augmentation de la lipophilie par ajout d'un anion lipophile

Il a été montré que la co-administration d'un dérivé du MPP⁺ et d'un sel de tétraphénylborate (TPB⁻) permettait d'augmenter et d'accélérer l'inhibition du complexe I par formation d'une paire d'ions plus lipophile, facilitant ainsi l'accès au site d'inhibition hydrophobe (Figure 27).^{139,149}

¹⁴⁹ Sayre LM, Wang F, Hoppel CL. Tetraphenylborate potentiates the respiratory inhibition by the dopaminergic neurotoxin MPP⁺ in both electron transport particles and intact mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **161**: 809-18.

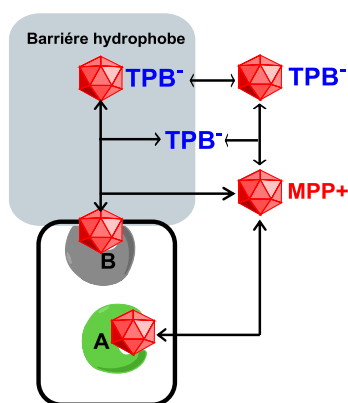
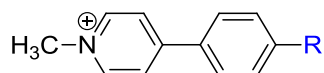


Figure 27 : Représentation schématique des 2 hypothétiques sites d'inhibition du complexe I de la CRM : A = site hydrophile et B = site hydrophobe (inspiré de Gluck *et al.*).¹³⁹

Il ressort toutefois de ces études que l'effet de ce contre-ion est d'autant plus sensible que le pyridinium lui-même est peu lipophile (Tableau 4).¹³⁸⁻¹⁴⁰

Tableau 4 : Influence de l'ajout du contre-ion TPB⁻ sur l'inhibition du complexe I dans la CTEI d'une série de 4'alkyle phénylpyridiniums.¹³⁸⁻¹⁴⁰



entrée	R	références	IC ₅₀ (μM)		IC ₅₀ (sans TPB ⁻)/ IC ₅₀ (avec TPB ⁻)
			Sans TPB ⁻	Avec TPB ^{-a}	
1	H (MPP ⁺)	140	5000	700	7,1
2		138, 139	3300	825	4,0
3	Méthyle	140	680	190	3,6
4		138, 139	580	130	4,5
5	Propyle	140	200	30	6,7
6		138, 139	150	30	5,0
7	Pentyle	140	45	12	3,8
8		138, 139	8,2	5,6	3,2
9	Heptyle	140	6,0	6,0	1
10		138, 139	5,0	5,5	0,9
11	Decyle	138, 139	1,7	8,0	0,2

a : Incubation avec 10 μM de TPB⁻

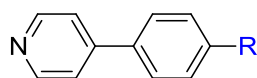
Ainsi qu'il apparaît clairement, l'effet du TPB⁻ sur l'inhibition du complexe I pour une série homologue du MPP⁺, est le plus favorable (ratio IC₅₀(sans TPB⁻)/ IC₅₀(avec TPB⁻) le plus élevé) pour les sels à courte chaîne carbonée (entrées 1-6). Pour les pyridiniums à chaîne carbonée plus

longue, la présence du TPB⁻ améliore de façon moins significative l'inhibition du complexe I (entrées 7 et 8) voire n'apporte rien (ratio approximativement égal à 1, entrées 9 et 10). Dans le cas des pyridiniums à longue chaîne carbonée, l'utilisation du TPB⁻ devient même contre-productive (entrée 11). Dans ce dernier cas, la diminution de l'inhibition peut s'expliquer par difficulté accrue à se fixer à l'autre site – hydrophile – du complexe I.

On notera par ailleurs que pour une série de sels homologues, les valeurs d'IC₅₀ diminuent avec le nombre de carbones, conformément à ce qui a été évoqué au paragraphe précédent. Ainsi, les valeurs d'IC₅₀ pour les pyridiniums sans TPB⁻, passent de 3300-5000 µM pour le MPP⁺ (entrées 1-2) à 1,7 µM pour son dérivé 4'-décyle (entrée 11).

Il est à noter que le rôle du TPB⁻, utilisé comme contre-ion de pyridiniums quaternaires afin de faciliter l'accès au site d'inhibition hydrophobe, a pu être confirmé *a contrario* sur une série de pyridines 4'-alkylées inhibitrices du complexe I (Tableau 5).¹³⁹

Tableau 5 : Influence de l'ajout du contre-ion TPB⁻ sur l'inhibition du complexe I dans la CTEI d'une série de 4'-alkyle phénylpyridines.¹³⁹



entrée	R	IC ₅₀ (mM)		IC ₅₀ (sans TPB ⁻) / IC ₅₀ (avec TPB ⁻)
		Sans TPB ⁻	Avec TPB ^{-a}	
1	Méthyle	39	36	1,1
2	Propyle	7,4	7,5	1,1
3	Pentyle	2,2	2,3	0,9
4	Heptyle	1,7	1,9	0,9
5	Decyle	4,5	5,7	0,8

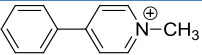
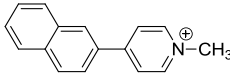
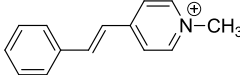
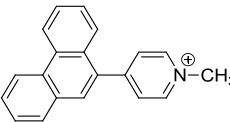
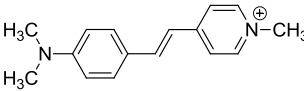
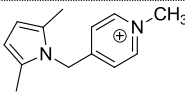
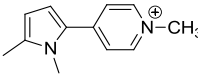
a : Incubation avec 10 µM de TPB⁻

Comme l'indique le ratio IC₅₀(sans TPB⁻) / IC₅₀(avec TPB⁻) dont la valeur est à chaque fois proche de 1, l'ajout de TPB⁻ n'induit pas une meilleure inhibition du complexe I pour ces dérivés de la pyridine. Cette étude a ainsi permis de mettre en évidence le fait que cet anion agissait bien par un effet de paire d'ions vis-à-vis d'entités cationiques (en l'occurrence, les pyridiniums quaternaires tel que le MPP⁺) et que son rôle consistait à faciliter l'accès de ces entités à l'un des deux sites d'inhibition du complexe I (en l'occurrence, le site lipophile).

III.3.1.2.2 Influence de l'extension de la conjugaison au-delà du noyau pyridinium

Outre la lipophilie il apparaît que l'extension du système conjugué au-delà du noyau pyridinium (possiblement afin de permettre une plus large distribution de la charge positive au sein de la molécule) constitue également un élément favorable dans le processus d'inhibition du complexe I (Tableau 6).

Tableau 6 : Effet de l'extension de la conjugaison au-delà du noyau pyridinium sur l'inhibition du complexe I dans la CTEI.^{143,144,147}

entrée	composés	IC ₅₀ (mM)
1	 MPP ⁺	9,5 ¹⁴⁴
2		0,25 ¹⁴³
3		0,14 ^{147,a}
4		0,13 ¹⁴⁴
5		0,0025 ¹⁴⁷
6		12,55 ¹⁴⁴
7		6,85 ¹⁴⁴

a : il est à noter que dans le cas de cette étude, le MPP⁺ a présenté une IC₅₀ de 3,3 mM.

Ces travaux ont ainsi montré que le remplacement du noyau phényle du MPP⁺ par un groupe 2-naphtyle ou 9-phénanthryle permettait de diminuer l'IC₅₀ de plus d'un ordre de grandeur (entrées 1, 2 et 4). Le même effet se constate en comparant les IC₅₀ du MPP⁺ et de son vinylogue (entrées 1 et 3). Il est intéressant de noter que dans cette série vinylogue, la présence d'un groupement polaire (diméthylamino) loin de diminuer l'activité du pyridinium sur le complexe I, l'augmente au contraire très significativement (entrée 5).

Cet effet lié à la possibilité d'étendre la conjugaison est également observée pour les substituants hétérocycliques, selon qu'ils soient ou non directement liés au noyau pyridinium (entrées 6 et 7).

III.3.2 Accumulation dans la mitochondrie

Comme mentionné précédemment, les mesures faites sur le complexe I dans la CTEI reflètent l'affinité des composés testés pour les sites d'inhibition, alors que l'inhibition du complexe I dans la ME tient compte d'un paramètre supplémentaire qui est l'accumulation de l'inhibiteur au sein de la matrice mitochondriale. Dans ce dernier cas, il est intéressant de noter que cette inhibition (et donc cette accumulation dans la mitochondrie) est accrue en présence du contre-ion TPB¹⁴⁴⁻¹⁴⁷.

Par ailleurs, il a été démontré que cette aptitude à s'accumuler à l'intérieur de la mitochondrie variait selon l'inhibiteur. Ceci se traduisait par un ratio $IC_{50(CTEI)}/IC_{50(ME)}$ variant de 2 à 170, un ratio d'autant plus élevé, traduisant une facilité d'autant grande pour le composé considéré à traverser la membrane mitochondriale. Il a été constaté que cette facilité de pénétration mitochondriale était dépendante de deux paramètres qui sont : la présence (ou non) d'une charge positive portée par l'atome d'azote du noyau pyridinium et la possibilité de délocaliser cette charge positive.

III.3.2.1 Présence de la charge positive

Il a été démontré que les espèces cationiques s'accumulaient facilement à l'intérieur de la mitochondrie en réponse au gradient électrochimique existant entre l'extérieur et l'intérieur de la mitochondrie (Figure 28).¹⁵⁰ Ainsi la présence d'une charge positive au sein de la structure de l'inhibiteur apparaît-elle comme un élément indispensable à son passage de la membrane mitochondriale.

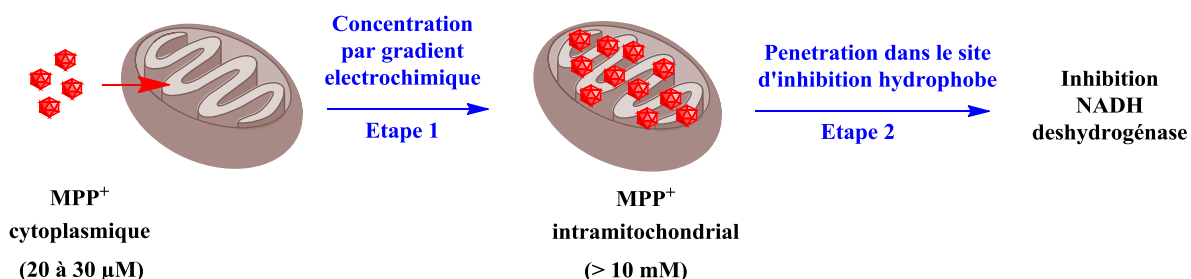


Figure 28 : Devenir du MPP⁺ après pénétration dans les neurones dopaminergiques (valeurs tirées de Singer *et al.*).¹⁵⁰

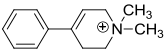
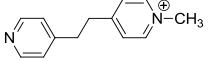
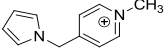
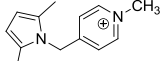
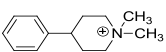
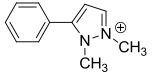
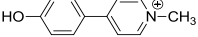
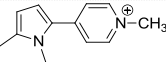
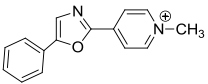
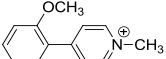
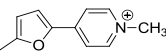
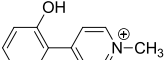
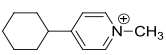
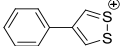
¹⁵⁰ Singer TP, Ramsay RR. Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. *Febs Lett* 1990; **274**: 1-8.

Il est intéressant de noter que si la 4-phenylpyridine, homologue non quaternarisé du MPP⁺, induit une certaine inhibition du complexe I dans la CTEI, son activité est dramatiquement diminuée vis-à-vis du complexe I dans la ME.^{143,145} De même, d'autres analogues non chargés du MPP⁺ ont présenté le même comportement, alors que leurs équivalents pyridiniums s'accumulaient dans la mitochondrie.¹⁴³

III.3.2.2 Extension de la conjugaison au-delà du noyau pyridinium

Sayre *et al.* ont évalué l'influence que pouvait avoir la possibilité de délocaliser la charge positive sur la capacité d'une série d'analogues du MPP⁺ à s'accumuler dans la mitochondrie (Tableau 7).¹⁴⁴

Tableau 7 : Influence de la délocalisation de la charge positive sur l'accumulation mitochondriale. ¹⁴⁴

entrée	composés	IC ₅₀ (mM)		IC ₅₀ (CTEI)/IC ₅₀ (ME)
		dans CTEI	dans ME	
1		13	2,2	6,4
2		35,0	11,0	3,2
3		14,5	5,0	2,9
4		12,5	4,85	2,6
5		19	9	2,1
6		13	0,33	39
7		10,4	0,28	37,1
8		6,8	0,04	170
9		5,0	0,075	67
10		2,3	0,038	60,5
11		2,0	0,04	50
12		5,8	0,33	17,6
13		0,75	0,07	11
14		1,1	0,11	10

De cette étude, il ressort que pour tous les composés testés, le ratio $IC_{50}(CTEI)/IC_{50}(ME)$ est toujours supérieur à 1, qu'il s'agisse de mauvais inhibiteurs ($IC_{50}(CTEI) > 10$, entrées 1-7) ou de bons inhibiteurs ($IC_{50}(CTEI) < 10$, entrées 8-14) du complexe I dans la CTEI. Ayant à chaque fois affaire à des entités cationiques, ce ratio peut s'expliquer par l'accumulation à l'intérieur de la mitochondrie sous l'effet du gradient électrochimique.

Pour certains des mauvais inhibiteurs, le gain lié à cette accumulation reste toutefois modeste (ratio < 10 , entrées 1-5), traduisant une pénétration limitée dans la mitochondrie. Il s'agit à chaque fois de composés pour lesquels la charge positive est peu/pas délocalisable. A d'aussi mauvais inhibiteurs en revanche, correspondent des ratios beaucoup plus élevés (entrées 6-7),

traduisant un phénomène d'accumulation dans la mitochondrie plus important. Il s'agit alors de composés dont le système conjugué permet une plus grande délocalisation de la charge positive.

Pour les bons inhibiteurs, le ratio indique une bonne pénétration mais en particulier pour les composés présentant cette même capacité à délocaliser la charge positive (entrées 8-11).

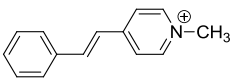
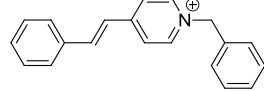
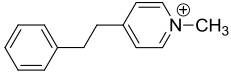
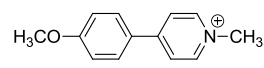
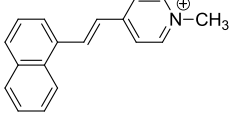
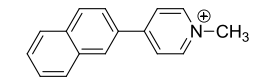
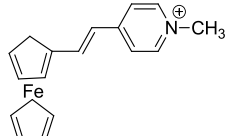
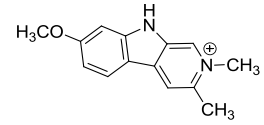
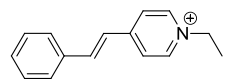
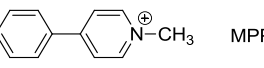
III.3.3 Affinité pour le DAT

III.3.3.1 Importance de l'affinité pour le DAT

III.3.3.1.1 Composés ne pouvant pas traverser la membrane cellulaire

Sur des cultures de neurones dopaminergiques, il a été démontré que certains composés étaient inactifs, alors même qu'ils s'étaient révélés être de bons inhibiteurs du complexe I (Tableau 8). Cette absence d'effet *in vitro* s'expliquerait par l'incapacité de ces composés à traverser la membrane cellulaire et donc – si l'on exclut toute éventualité de passage passif – leur faible affinité pour cet élément permettant l'accès spécifique aux neurones dopaminergiques que sont les transporteurs actifs de la dopamine (DAT).

Tableau 8 : Inhibition du complexe I dans la CTEI des composés ne présentant pas d'activité *in vitro*. ^{143,146,147}

entrée	composé	IC ₅₀ (mM) ^a	entrée	composé	IC ₅₀ (mM) ^a
1		0,14 ¹⁴⁷	6		0,33 ¹⁴⁶
2		0,40 ^{147,b}	7		1,10 ¹⁴³
3		0,09 ¹⁴⁷	8		0,25 ¹⁴³
4		0,60 ¹⁴⁷	9		0,55 ¹⁴³
5		0,70 ^{146,147}	10	 MPP ⁺	2,20 ¹⁴³ -3,30 ¹⁴⁷

a : sur complexe I dans CTEI. b : en présence de 10 µM de TPB⁻

Certains styrylpyridiniums (entrées 1, 3-6) inhibiteurs du complexe I ont montré une faible affinité pour le DAT¹⁵¹ pouvant expliquer, au moins en partie, la faible neurotoxicité dopaminergique *in vivo* de leurs précurseurs tetrahydropyridines.¹⁴⁷ Dans la série des 4-arylpyridiniums (entrées 7-8), de meilleurs inhibiteurs de la respiration mitochondriale que le MPP⁺ (entrée 10) ont présenté une neurotoxicité dopaminergique moindre.¹³⁷ Ceci peut être expliqué par le fait que ces composés, étant de mauvais substrats du DAT se révèlent également moins neurotoxiques que le MPP⁺. Enfin, un dérivé de type β -carbolinium (entrée 9) s'est révélé beaucoup moins neurotoxique qu'attendu¹³⁷ malgré son inhibition importante du complexe I.¹⁴³

III.3.3.1.2 Composés traversant la membrane cellulaire de façon passive

Il a été démontré que le 1,2,2-triméthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium (Tableau 9, entrée 1) était plus neurotoxique que son isomère de position (entrée 2)¹⁵² alors même qu'il présentait peu d'affinité pour le DAT.¹³⁷ Un accès direct au travers de la membrane cellulaire, que la forme énamine non chargée (entrée 1) pourrait promouvoir, est vraisemblablement à l'origine de cette toxicité.

Tableau 9 : Composés traversant la membrane cellulaire de façon passive.

entrée	composés
1	
2	
3	

Le 4-benzyl-*N*-méthylpyridinium (entrée 3) semble également posséder cette faculté de passage membranaire passif : alors même qu'il n'a démontré qu'une très faible affinité pour le

¹⁵¹Bachurin SO, Lermontova NN, Sablin SO, Solyakov LS, Tkachenko SE. Biochemical basis of structural electivity of MPTP-like neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1992; **648**: 248-50.

¹⁵²Harik SI, Schmidley JW, Iacofano LA, Blue P, et al. On the mechanisms underlying 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity: the effect of perinigral infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, its metabolite and their analogs in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; **241**: 669-76.

DAT,¹³⁷ il s'est en effet révélé être un puissant inhibiteur de la respiration mitochondriale^{143,144} et un remarquable inducteur de neurotoxicité *in vivo*.¹⁵³

Il est intéressant de noter que, dès lors que des analogues du MPP⁺ présentent les caractéristiques précédemment énoncées (une charge positive délocalisable ajoutée à un certain degré de lipophilie), ceux-ci deviennent capables d'entrer dans les cellules même en absence de spécificité pour le DAT, pour peu qu'ils soient utilisés à des concentrations suffisamment importantes. Par conséquent, la spécificité pour le DAT est nécessaire à faible concentration et assure une spécificité dopaminergique, alors qu'à plus forte concentration cette spécificité ne fait que compléter l'entrée passive des composés à l'intérieur de la cellule.

III.3.3.1.3 Conclusion

L'aptitude des analogues du MPP⁺ à inhiber le complexe I n'est pas suffisante pour garantir une neurotoxicité, qui plus est spécifique des neurones dopaminergiques. L'affinité pour le DAT apparaît comme un paramètre crucial et incontournable pour assurer à la fois un passage membranaire et une toxicité spécifique, à faible concentration, sur les neurones dopaminergiques.

III.3.3.2 Facteurs influençant l'affinité pour le DAT

Les études d'affinité pour le DAT des analogues du MPP⁺ ont montré l'influence de trois principaux facteurs qui sont : la flexibilité structurale, la présence (ou non) de la charge positive portée par l'atome d'azote du noyau pyridinium et sa délocalisation.

III.3.3.2.1 Influence de la flexibilité structurale

Il a été proposée l'idée selon laquelle la forte affinité du MPP⁺ pour le DAT s'expliquait par une certaine analogie structurale (isostérie) avec la DA, le noyau phényle et l'atome d'azote du pyridinium du MPP⁺ pouvant respectivement se superposer au noyau aromatique et à l'atome d'azote du groupement amino de la DA (Figure 29).¹³⁷

¹⁵³Rollema H, Johnson EA, Booth RG, Caldera P, Lampen P, et al. In vivo intracerebral microdialysis studies in rats of MPP⁺ analogs and related charged species. *J Med Chem* 1990; **33**: 2221-30.

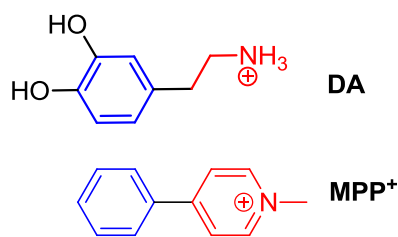


Figure 29 : Structure chimique de la DA et du MPP⁺.

Fait intéressant, la substitution du phényle du MPP⁺ par un benzyle (Tableau 10, entrée 1) en faisant perdre cette analogie structurale, entraîne également une perte d'affinité pour le DAT.¹³⁷

Tableau 10 : Analogues flexibles du MPP⁺.

entrée	composés	entrée	composés
1		4	
2		5	
3		6	

Probablement pour les mêmes raisons, les autres dérivés benzyles du MPP⁺ (entrées 2-3) ont montré une toxicité mais non spécifique des neurones dopaminergique.¹⁵⁴ Les auteurs suggèrent donc que toute flexibilité structurale aurait pour conséquence une perte de reconnaissance par le DAT, expliquant vraisemblablement la perte de sélectivité dopaminergique des analogues en entrées 4 et 5 comparés à celui en entrée 6.^{147,154}

III.3.3.2.2 Influence de la présence de la charge positive

A pH physiologique, l'atome d'azote de la DA est protoné : la présence d'une charge positive constitue un élément important de la reconnaissance d'un composé par le DAT. Il a été

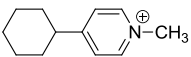
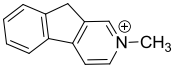
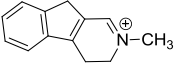
¹⁵⁴ Michel PP, Dandapani BK, Efrange SMN, Hefti F. Potential environmental neurotoxins related to 1-methyl-4-phenylpyridinium: selective toxicity of 1-methyl-4-(4'-acetamidophenyl)-pyridinium and 1-methyl-4-cyclohexylpyridinium for dopaminergic neurons in culture. *Experiment Neurol* 1990; **108**: 141-50.

montré que certains analogues du MPDP⁺ (Tableau 9, entrées 1-2) n'ont pas la même affinité pour le DAT.¹³⁷ Le composé en entrée 1 est en équilibre avec l'énamine correspondante ce qui entraîne une absence de charge positive. Les auteurs suggèrent que cette absence de charge positive est probablement à l'origine de sa plus faible affinité pour le DAT comparée à celle de son isomère (entrée 2).¹³⁷

III.3.3.2.3 Influence de la délocalisation de la charge positive

Des études ont montré que la délocalisation de la charge positive portée par l'atome d'azote des analogues du MPP⁺ augmentait l'affinité des composés pour le DAT (Tableau 11).¹⁵⁵

Tableau 11 : Influence de la délocalisation de la charge positive sur l'affinité pour le DAT.¹⁵⁵

entrée	composés	IC ₅₀ (μM) ^a
1	MPP ⁺	2,7
2		14,5
3		51,5
4		144,0

a : Inhibition de la recapture de [³H]DA reflétant l'affinité d'un composé pour le DAT

Il a également été montré que le remplacement du phényle du MPP⁺ par un cyclohexyle (entrée 2), en altérant également cette délocalisation, entraînait une diminution de l'affinité pour le DAT.¹⁵⁵ De même, le fait qu'un dérivé dihydropyridinium (entrée 4) ait une plus faible affinité pour le DAT que son équivalent pyridinium (entrée 3) – et plus généralement, présente l'affinité la plus faible de toute une série d'inhibiteurs potentiels – soutient l'idée que pour avoir un bon substrat du DAT, la charge positive de l'inhibiteur doit être incluse dans un système conjugué relativement étendu et puisse se délocaliser.¹⁵⁵

Enfin, Michel *et al.* ont montré que le 4-(4-acetamidophenyl)-1-methylpyridinium (Tableau 10, entrée 6) possédait une grande affinité pour le DAT et induisait une toxicité spécifique des neurones dopaminergiques.¹⁵⁴ A nouveau, cette affinité pour le DAT peut être expliquée par la présence d'un groupement dont les propriétés électroniques, de même que la position au

¹⁵⁵ Johnson EA, Wu EY, Rollema H, Booth RG, et al. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) analogs: in vivo neurotoxicity and inhibition of striatal synaptosomal dopamine uptake. *Eur J Pharmacol* 1989; **166**: 65-74.

sein de la molécule, permettent une délocalisation de la charge positive au sein d'un système conjugué plus étendu.

III.3.4 Conclusions

Il ressort des travaux précédemment cités que la structure des inhibiteurs joue un rôle essentiel sur leur activité biologique, qu'il s'agisse en l'occurrence de leur activité sur le complexe I, de leur accumulation à l'intérieur de la mitochondrie ou encore de leur affinité pour le DAT (Figure 30).

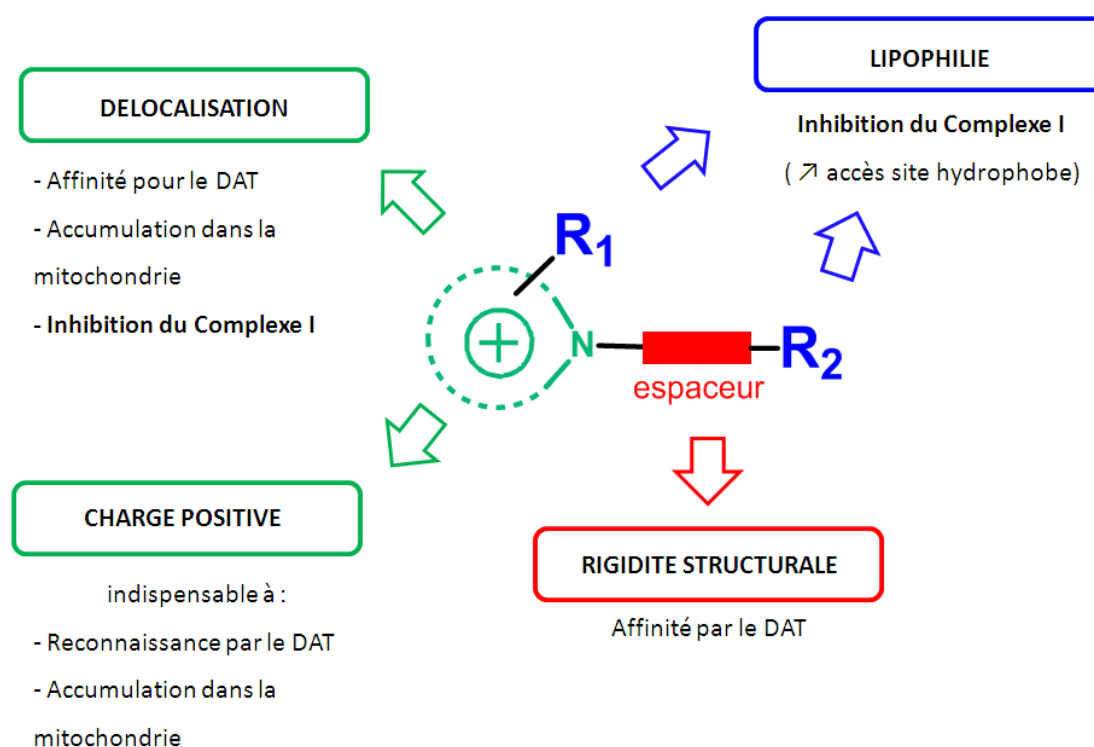


Figure 30 : Etude structure-activité des analogues du MPP⁺.

En conclusion, un bon inhibiteur du complexe I doit être chargé positivement à pH physiologique et être inséré dans un système conjugué, ce qui lui garantit à la fois une reconnaissance par le DAT mais également une entrée dans la mitochondrie et une plus grande affinité pour le(s) site(s) d'inhibition du complexe I.

Par ailleurs, l'analogue doit être suffisamment hydrophobe pour pouvoir pénétrer et se fixer au site hydrophobe du complexe I. Ainsi, toute substitution par des groupements hydrophobes

est favorable, à l'inverse les groupements polaires sont déconseillés, sauf s'ils permettent d'étendre la délocalisation de la charge positive.

Enfin, le composé doit avoir une structure suffisamment rigide pour pouvoir être reconnu par le DAT. Ainsi toute variation structurale entraînant une flexibilité entre les deux systèmes aromatiques semble défavorable à l'activité des composés.

Fait intéressant, une étude qui s'est intéressée à la neurotoxicité dopaminergique d'une série d'analogues du MPP⁺, administrés par perfusion dans le *striatum* de rats, a permis de confirmer *in vivo* l'ensemble de ces pré-requis structuraux.¹⁵³

IV. Résultats préliminaires

IV.1 Contexte

La pollution de l'eau par des contaminants émergents constitue actuellement une préoccupation majeure et fait l'objet d'une réglementation de plus en plus sévère. Elle est due à l'utilisation massive de composés organiques qui sont relargués dans l'environnement sans que leur devenir n'ait, pendant longtemps, fait l'objet d'étude. Les composés pharmaceutiques font partie de ces substances retrouvées dans les divers systèmes aquatiques et font l'objet de questionnement dans le domaine environnemental et en santé publique.

Dans le cadre d'une étude portant sur le devenir des médicaments dans l'environnement, le Dr. Céline Laurencé s'est intéressée au Furosémide[®] (Figure 31). Ce dernier est un médicament fréquemment utilisé pour le traitement des maladies cardiovasculaires et rénales. Il fait partie de la classe des diurétiques dont la particularité est d'inhiber la réabsorption des ions sodium et chlorure au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé du rein.

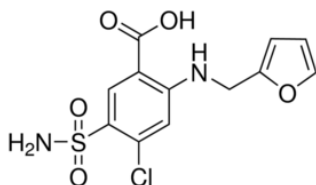


Figure 31 : Structure chimique du Furosémide[®].

La principale toxicité du furosémide connue à ce jour est directement liée à ses propriétés diurétiques : déséquilibre de la balance hydroélectrolytique (hyponatrémie notamment) et hypotension. C'est le 36^e médicament le plus prescrit en France depuis 2002 soit 40 tonnes produites par an. On a pu constater qu'il n'était pas métabolisé par l'organisme et était éliminé dans les urines à 90 % sans transformation. Des études récentes ont confirmé qu'il était retrouvé dans l'environnement¹⁵⁶ notamment à plusieurs reprises dans les rivières d'Italie et du Danemark. Etant donné sa consommation chez l'Homme et sa concentration dans l'environnement il a été classé parmi les 10 molécules les plus à risque retrouvées dans l'environnement et dans les eaux usées.¹⁵⁶

Dans le cadre de ses travaux de thèse, le Dr. Céline Laurencé avait pu mettre en place des outils permettant l'accès aux produits de transformations de ce composé par oxydation électrochimique, et effectuer leur évaluation toxicologique.

IV.2 Accès au pyridinium du Furosémide® (PF)

IV.2.1 Oxydation électrochimique

Deux sites d'oxydation du Furosémide® ont été mis en évidence lors d'études voltampérométrique puis exploités en électrosynthèse (Figure 32).¹⁵⁷ L'oxydation directe du Furosémide® (i) conduit, par oxydation de la fonction amine puis coupure oxydante, à la formation de l'aniline correspondante. L'oxydation indirecte (ii), par ajout de bromure d'ammonium (NH₄Br), conduit à la formation d'un composé diméthoxylé, obtenu sous la forme de deux diastéréoisomères par oxydation du noyau furane.

¹⁵⁶ Ocampo-Duque W, Osorio C, Piamba C, Schuhmacher M, Domingo JL. Water quality analysis in rivers with non-parametric probability distributions and fuzzy inference systems: application to the Cauca River, Colombia. *Environ Int* 2012; **52**: 17-28.

¹⁵⁷ Laurencé C, Rivard M, Lachaise I, Bensemhoun J, Martens T. Preparative access to transformation products (TPs) of furosemide: a versatile application of anodic oxidation. *Tetrahedron* 2011; **67**: 9518-21.

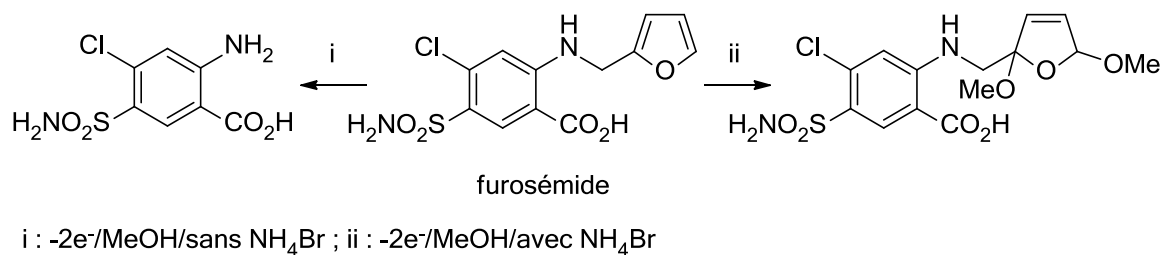


Figure 32 : Oxydation directe et indirecte du Furosémide®.

IV.2.2 Hydrolyse acide

L'hydrolyse en milieu acide (MeCN/TFA pH = 2 : 40/60, 40 °C) du composé diméthoxylé conduit à la formation du pyridinium du Furosémide® (PF, Figure 33).¹⁵⁷

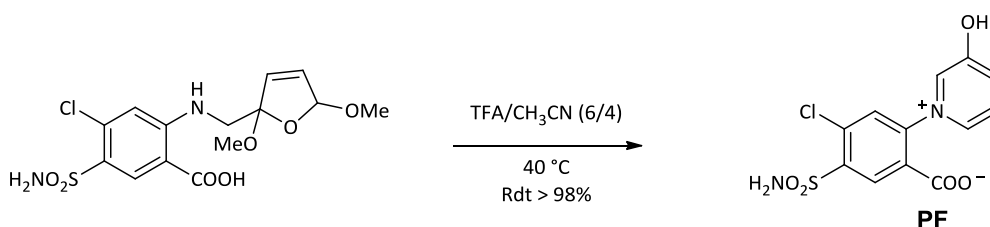


Figure 33 : Formation du pyridinium du Furosémide® (PF).

Le mécanisme proposé pour la formation de ce composé suggère tout d'abord le passage par le céto-aldéhyde. Puis, après une réaction de type Mannich intramoléculaire et un réarrangement, le **PF** est obtenu sous forme d'un zwitterion (Figure 34).

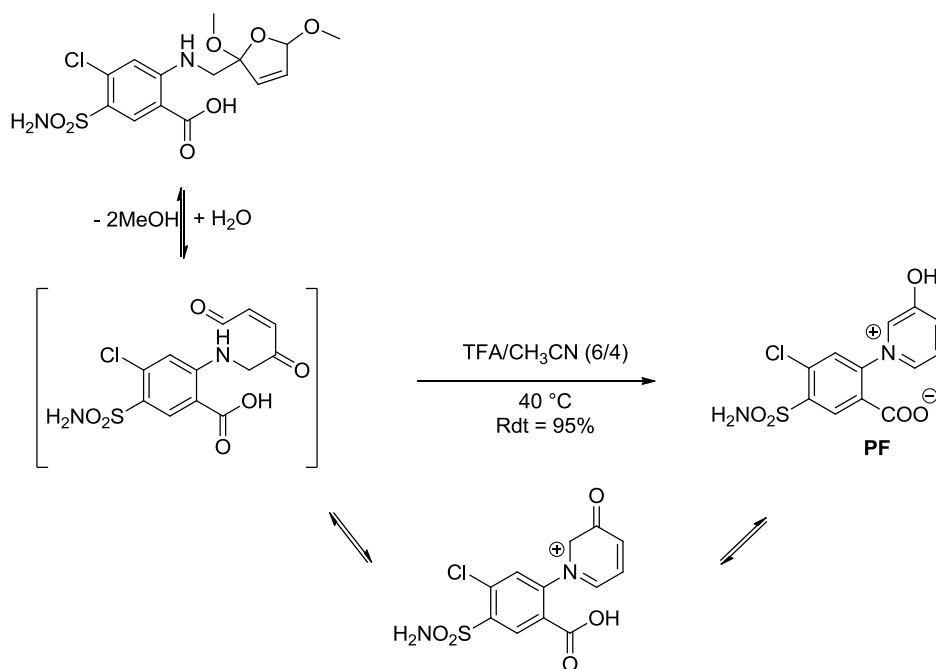


Figure 34 : Mécanisme de formation du PF.

IV.3 Etudes toxicologiques du PF

Avant les travaux du Dr. Céline Laurencé, le **PF** n'avait jamais été synthétisé à l'échelle préparative et sa cytotoxicité n'avait par conséquent jamais pu être évaluée. Il présente une structure chimique assez semblable, de par la présence d'un cycle pyridinium, au **MPP⁺** (Figure 35) qui est, comme détaillé précédemment, un inducteur chimique de la MP par inhibition du complexe I de la CRM.

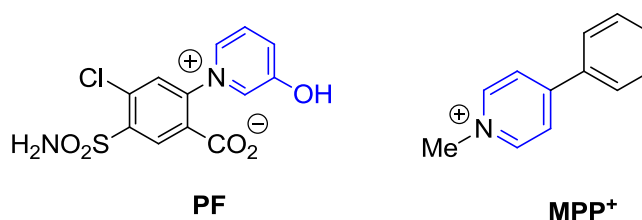


Figure 35 : Analogie structurale entre le PF et le MPP⁺.

Ainsi, cette évidente analogie structurale a conduit le Dr. Céline Laurencé à effectuer l'étude des marqueurs cellulaires de la MP afin d'évaluer le potentiel de ce nouveau composé en tant qu'inducteur de la MP et ainsi voir si cette analogie structurale coïncide avec une analogie toxicologique.

IV.3.1 Etudes *in vitro*

IV.3.1.1 Survie cellulaire

La toxicité du **PF** a été testée sur une lignée de cellules de neuroblastomes humains (SH-SY5Y) (Figure 36).

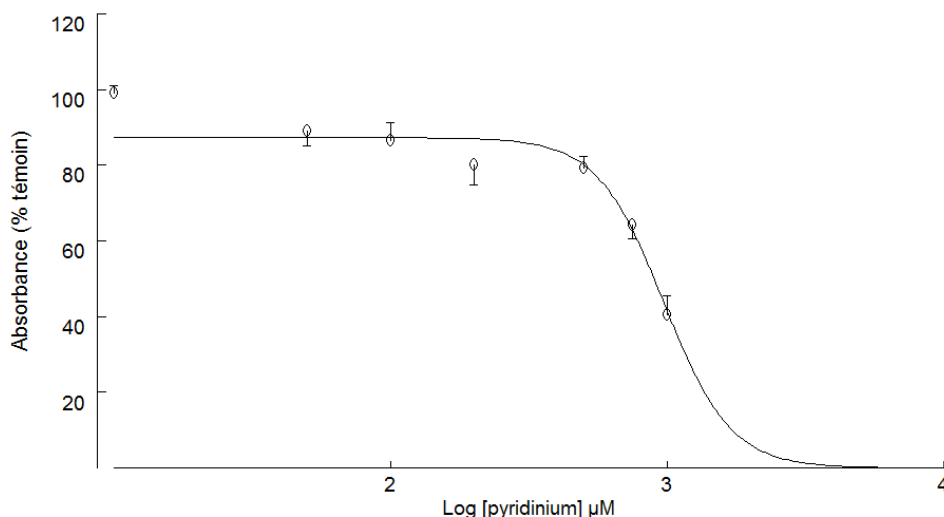


Figure 36 : Effet du PF sur la viabilité cellulaire (test MTT) après 96 h d'incubation.

Après 96 h d'incubation, les concentrations de **PF** testées supérieures à 500 µM ont montré un effet significatif en induisant une diminution de plus de 60 % de la survie cellulaire. Ce premier résultat a amené le Dr. Céline Laurencé à effectuer d'autres tests permettant de confirmer et de caractériser cette mort cellulaire.

IV.3.1.2 Apoptose

Afin de mettre en évidence l'apoptose, des études permettant de doser l'activité des caspases ont été réalisées. Les caspases impliquées dans l'apoptose sont généralement classées en deux catégories, les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10) et les caspases effectrices (3, 6 et 7).

L'activité enzymatique des caspases 3 et 9 est significativement augmentée dans les cellules traitées avec le **PF** (Figure 37).

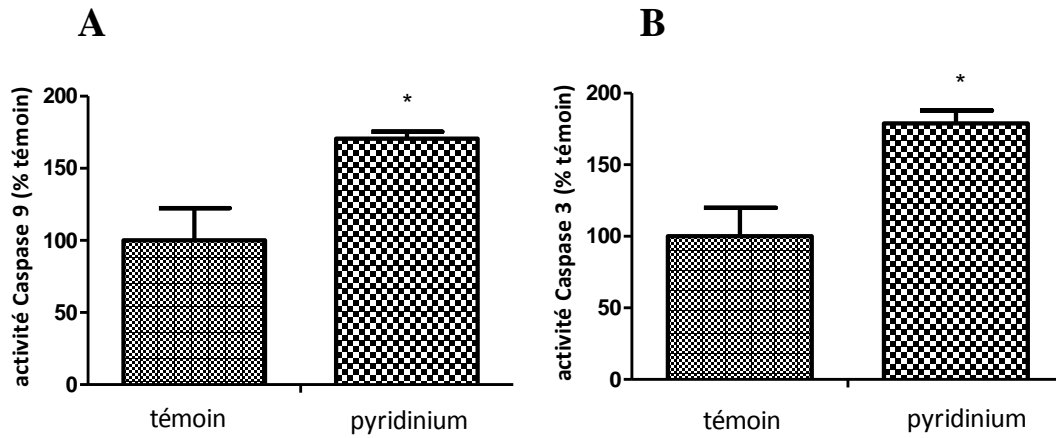


Figure 37 : Activation des caspase 9 (A) et 3 (B) (mesurée à l'aide d'un substrat spécifique Ac-LEHD-AFC).

Cette augmentation laisse supposer que c'est la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose qui est activée (Cf. Chap1.IV.2.4).

IV.3.1.3 Stress oxydant

Il a été montré que, dans différents modèles cellulaires apoptotiques, des modifications de l'état redox de la cellule avaient lieu avant l'activation des caspases.¹⁵⁸ Afin d'approfondir le mécanisme de toxicité du PF, la production d'EROs a été évaluée. Après exposition au PF, il a été observé une augmentation de 57 % de la production d'EROs (Figure 38A) et notamment de 52 % de la génération d'anion superoxyde (Figure 38B).

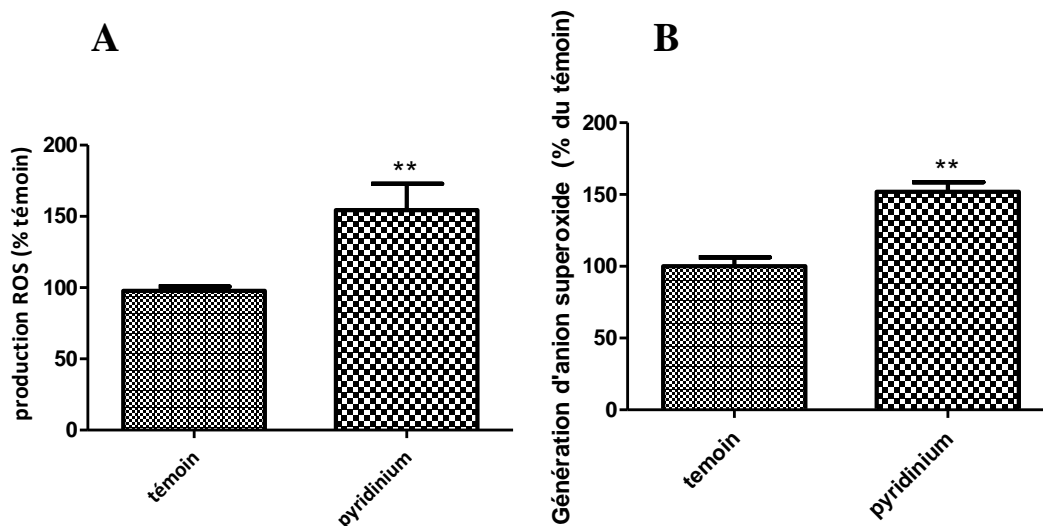


Figure 38 : Production d'EROs (A, test DCFH-DA) et d'anion superoxyde (B, ajout de malate-pyruvate et dosage de la réduction du bleu de nitrotétrazolium).

¹⁵⁸ Kannan K., Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiol*2000; 7: 153-163.

Cette augmentation de la production d'EROs dans les cellules traitées a confirmé la présence d'un stress oxydant intracellulaire pouvant être à l'origine de l'apoptose.

Afin de vérifier si ce stress oxydant résultait bien d'une inhibition du complexe I de la CRM, son activité a été évaluée. Pour cela, le **PF** a été directement administré à des extraits mitochondriaux issus de cortex de souris. Cette expérience a montré une inhibition dose-dépendante du complexe I de la CRM (Figure 39).

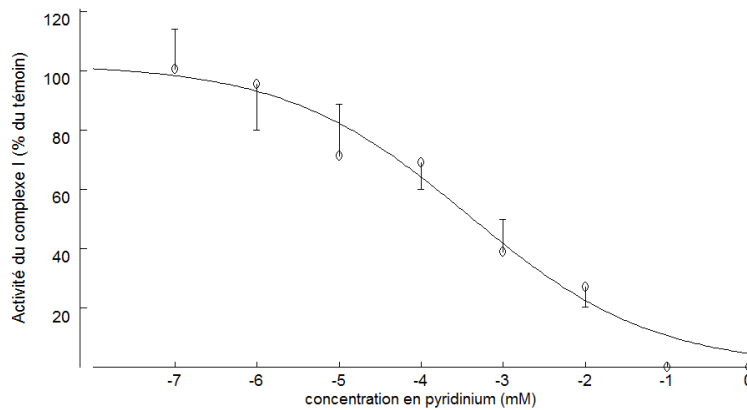


Figure 39 : Effet du PF sur l'activité du complexe I de la CRM d'extraits mitochondriaux issus de cortex de souris.

Par ailleurs, il a été démontré par polarographie sur mitochondries entières issues de cortex de souris, que le **PF** inhibait le complexe I de la CRM de façon dose-dépendante (Figure 40A). Néanmoins, il n'a montré aucune activité sur l'activité des complexes II à V (B). Ainsi ce composé semble être spécifique du complexe I de la CRM.

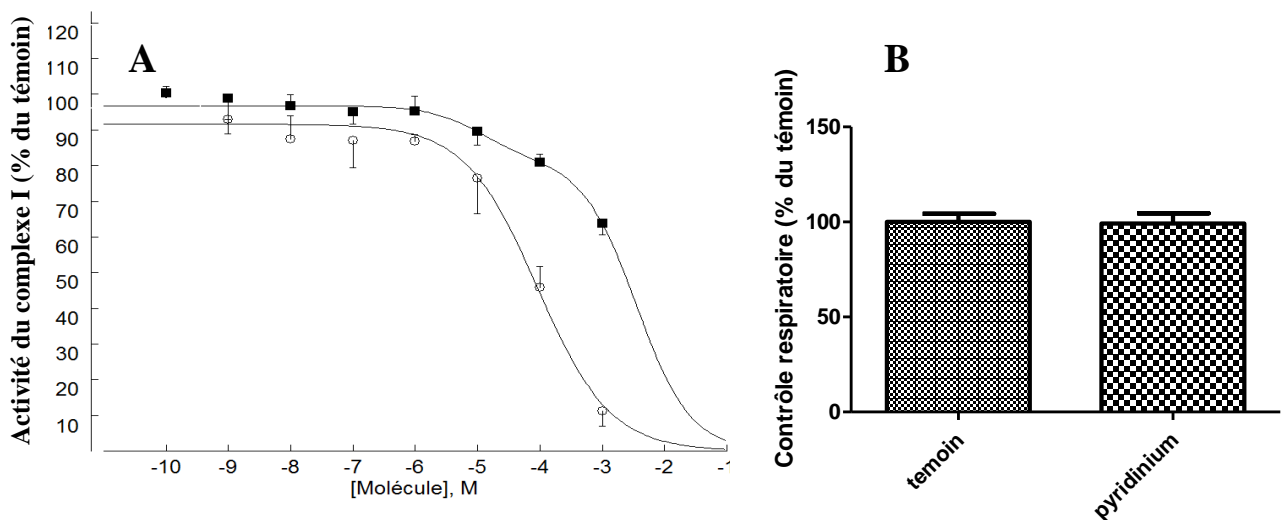


Figure 40 : Effet du PF sur l'activité du complexe I (A) et des complexes II à V (B) de la CRM de mitochondries entières issues de cortex de souris.

IV.3.1.4 α -synucléine

Après 96 h d'incubation en présence du **PF**, la quantité totale d' α -synucléine a été déterminée par une technique d'immunotransfert (western blot) permettant la séparation et l'identification de la protéine d'intérêt par un anticorps spécifique. Une augmentation significative de la quantité d' α -synucléine totale de 40 % a été constatée dans les cellules traitées (Figure 41).

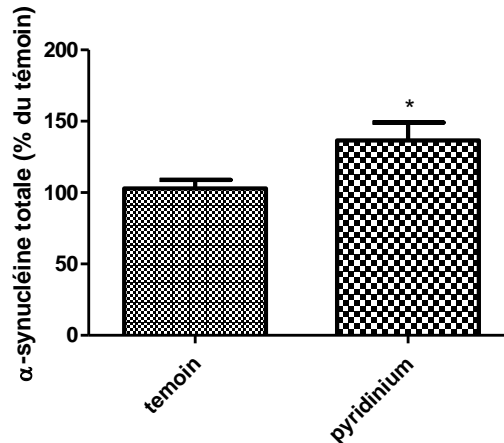


Figure 41 : Quantité d' α -synucléine totale (quantification grâce au logiciel ImageJ).

IV.3.2 Etudes *in vivo*

Fait marquant, de part sa forme zwitterionique, le **PF** a pu être administré par voie orale à des souris (20 mg/kg/jour pendant 7 jours). Ainsi, il possède la faculté de traverser la BHE. Ces études *in vivo* ont révélé une inhibition du complexe I de la CRM. En effet, les souris traitées ont présenté une inhibition de 50 % du complexe I dans les extraits mitochondriaux de *striatum* (Figure 42).

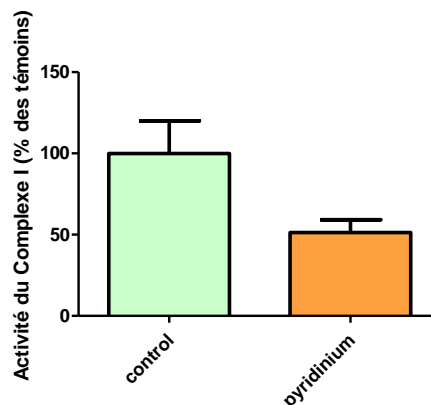


Figure 42 : Effet du PF sur l'activité du complexe I de la CRM dans les extraits mitochondriaux de *striatum* de souris traitées pendant 7 jours (20 mg/kg/jour).

IV.4 Conclusion

L'oxydation électrochimique du Furosémide[®] a donc permis d'obtenir un composé de type pyridinium et l'ensemble des résultats toxicologiques montre que ce composé est actif aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Les résultats obtenus *in vitro* montrent un effet significatif sur la lignée cellulaire SH-SY5Y du **PF** sur l'induction des marqueurs cellulaires de la MP (diminution de 60 % de la survie cellulaire après 96 h d'incubation, augmentation de l'activité cytosolique des caspases 3 et 9, production importante d'EROs dont notamment d'anion superoxyde, inhibition dose-dépendante et spécifique du complexe I de la CRM et accumulation d' α -synucléine).

Ces résultats *in vitro* ont été confirmés *in vivo* puisque une inhibition du complexe I de la CRM été constatée chez les souris traitées au **PF** (20 mg/kg/jour pendant 7 jours).

Ainsi, ce nouveau composé a montré un réel potentiel en tant qu'inducteur chimique de la MP puisque son administration *in vitro* et *in vivo* a permis l'apparition des marqueurs cellulaires caractéristiques de la MP. Il est à noter toutefois que cette apparition suit une cinétique beaucoup plus lente : ce n'est qu'après 96 h d'exposition qu'un effet significatif est observé. Alors que le MPP⁺, classiquement utilisé pour induire les mêmes effets, agit en seulement 24 h. S'agissant par conséquent d'induire chimiquement la MP, pathologie dont l'apparition et le développement chez l'Homme sont connus pour survenir de manière extrêmement lente, le **PF** apparait donc comme un composé beaucoup plus approprié que le MPP⁺. De plus, son administration aux animaux n'a pas entraîné de mortalité contrairement au MPTP (protoxine du MPP⁺) qui conduit à une mortalité très importante. Enfin, il est administré par voie orale contrairement aux autres inducteurs de la MP, ce qui d'un point de vue expérimental est un réel avantage. Ainsi, ce type de composé semble être plus adapté à l'étude la MP. On notera cependant qu'en raison de la présence du groupement sulfonamide déjà présent sur le Furosémide[®], le **PF** présente également une activité diurétique, héritée de la molécule mère.

V. Objectifs

Les travaux préliminaires menés sur le **PF** ont suggéré l'existence d'un lien entre le motif *N*-aryle pyridinium et la capacité pour la molécule qui le porte, à induire chimiquement la MP. Ceci a dès lors laissé envisager la possibilité de préparer des composés structurellement

inspirés, capables de mimer plus fidèlement les mécanismes biochimiques impliqués lors de l'apparition de la MP. L'accès à des composés diversement fonctionnalisés laisse envisager l'entame d'une étude de relation structure-toxicité en lien avec la MP et l'identification de structures à risques.

Pour ce faire, deux voies de synthèse ont été suivies conduisant à des composés portant (A) ou non (B) de groupement hydroxyle sur le noyau pyridinium (Figure 43). Le résultat de ces travaux de synthèse est présenté dans la partie II.

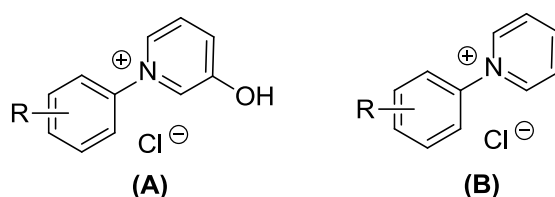
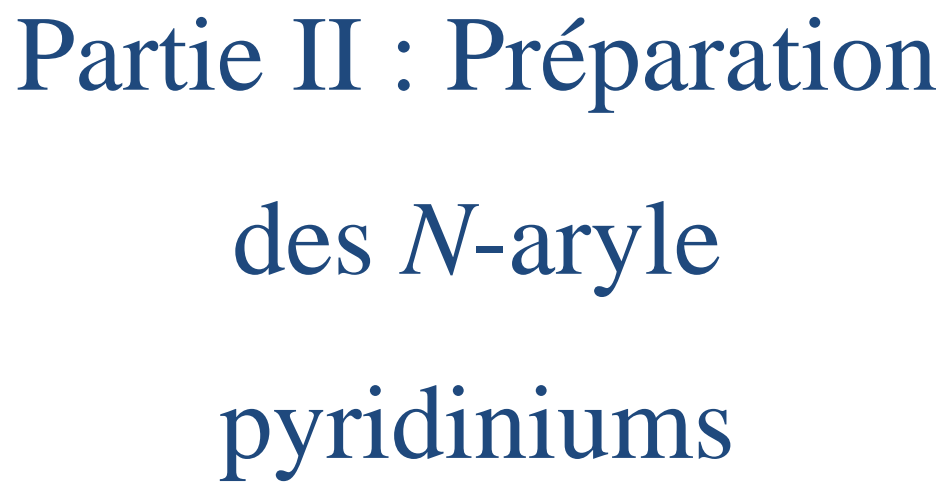


Figure 43 : N-Aryle pyridiniums synthétisés.

Une fois les N-aryle pyridiniums synthétisés, leur évaluation toxicologique a été effectuée. Les résultats de ces études ont permis d'avoir une meilleure compréhension du mécanisme d'action et l'étude relation structure/activité a pu être réalisée et est exposée dans la partie III.

Partie II : Préparation
des *N*-aryle
pyridiniums



Partie II : Préparation des *N*-aryle pyridiniums

Le travail exposé dans la suite de ce manuscrit, s'attache à décrire la synthèse de chlorure de *N*-aryle pyridiniums diversement fonctionnalisés. Pour ce faire, deux voies de synthèse ont été suivies (Figure 44).

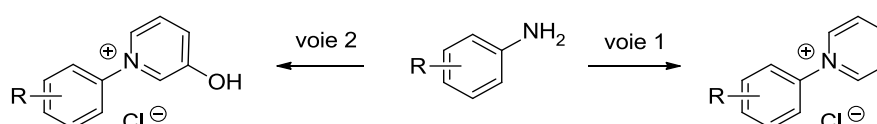


Figure 44 : Voies d'accès aux *N*-aryle pyridiniums diversement fonctionnalisés.

La première voie d'accès exploite la réaction de Zincke et permet d'aboutir à des composés ne portant pas de groupement hydroxyle sur le noyau pyridinium (voie 1, chap I). La deuxième voie d'accès est directement inspirée de la préparation du **PF**. Elle compte une étape-clé d'électro-oxydation et aboutit à des *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés (voie 2, chap II). On notera que les deux voies de synthèse choisies sont parfaitement complémentaires puisqu'elles partent du même composé de départ, en l'occurrence d'un dérivé de l'aniline.

Comme il en sera démontré dans la partie bibliographique, un nombre limité de réaction permettent la synthèse de *N*-aryle pyridiniums et celles qui existent conduisent à des rendements modérés voire faibles. Tout ceci contribue à l'originalité de l'enchaînement *N*-aryle pyridinium en synthèse organique.

Chapitre I : Préparation des N-aryle pyridiniums non hydroxylés

I. Préparation des N-aryle pyridiniums non hydroxylés à partir de pyryliums

I.1 Historique

En 1910, Bayer constate que la réaction entre le sulfate de diméthyle et le composé **B1** à 50 °C conduit, après traitement par l'acide perchlorique, à la formation d'un sel de pyrylium insoluble **B2**. Ce dernier réagit avec le carbonate d'ammonium pour former la 4-methoxy-2,6-diméthylpyridine **B3** (Figure 45).¹⁵⁹

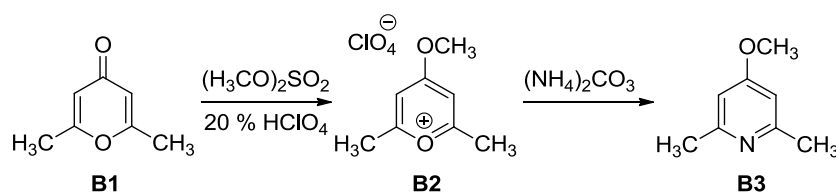


Figure 45 : Synthèse de pyridine à partir de pyrone selon Baeyer (1910).¹⁵⁹

Plus tard, en 1912, Baeyer et Piccard décrivent la préparation du perchlorate de 2,4,6-triméthylpyrylium **B4**, par réaction entre la 2,6-diméthylpyrone **B1** et l'iodure de méthylmagnésium et traitement à l'acide perchlorique.¹⁶⁰ De l'ammoniac est ensuite ajoutée au mélange réactionnel et conduit à la formation de la 2,4,6-triméthylpyridine **B5** (Figure 46).

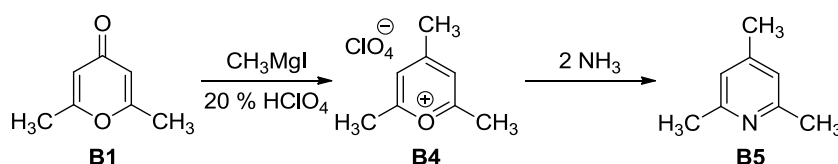


Figure 46 : Synthèse de pyridines à partir de pyrones selon Baeyer et Piccard (1912).¹⁶⁰

¹⁵⁹ Baeyer A. Concerning the effect of dimethyl sulfate on dimethyl-pyrone. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 1910; **43**: 2337-43.

¹⁶⁰ Baeyer A, Piccard J. Examinations on dimethylpyron. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 1915; **407**: 332-69.

1.2 Synthèse des *N*-aryle pyridiniums

Par la suite, de nombreux auteurs ont décrit la synthèse de *N*-aryle pyridiniums à partir de sels de pyrylium, augmentant de ce fait le champ d'application de la réaction de Baeyer, telle qu'elle a été décrite dans sa version initiale. Ainsi, la réaction entre un sel de pyrylium et un dérivé de l'aniline conduit à la formation du sel de *N*-aryle pyridinium correspondant.

1.2.1 Mécanisme réactionnel

Le mécanisme proposé¹⁶¹ suggère une attaque nucléophile de l'amine sur le carbone en *alpha* de l'oxonium ayant le plus petit substituant. Après déprotonation, le cycle s'ouvre et, après perte d'une molécule d'eau, conduit à la formation du pyridinium correspondant (Figure 47).

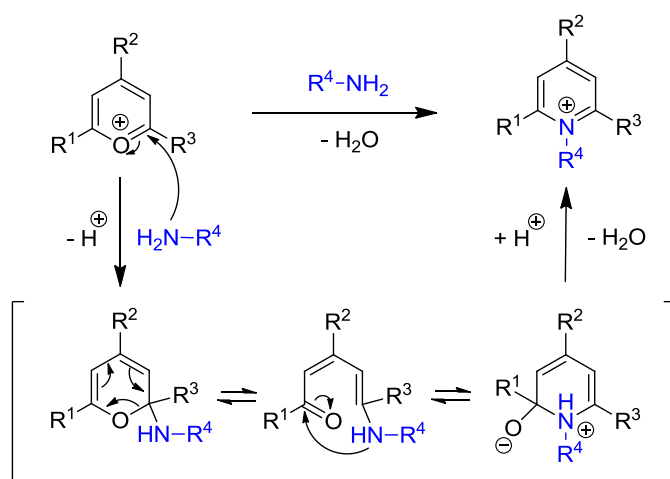


Figure 47 : Mécanisme de transformation d'un pyrylium en pyridinium.¹⁶¹

1.2.2 Synthèse

La synthèse de *N*-aryle pyridiniums se fait en partant de pyryliums trisubstitués en positions 2, 4 et 6, généralement par des groupements méthyles^{161,162,163,164,165} ou

¹⁶¹Toma C, Balaban AT. Reactions of pyrylium salts with nucleophiles. V. Reaction of 2,4,6-trimethylpyrylium perchlorate with primary amines. *Tetrahedron* 1966; **S**: 9-25.

¹⁶²Katritzky AR, Ramsden CA, Zuriati Z. Heterocycles in organic synthesis. Part 40. Oxidation of 2,4,6-triarylpyridinium betaines and 2,4,6-triarylpyridinium perchlorate by hydrogen peroxide. *J Chem Soc Perkin I* 1980; 1870-8.

¹⁶³Salman SR, Hassan AH, Khayat MAR. Carbon-13 NMR of *N*-substituted 2,4,6-trimethylpyridinium salts. *Bull Chem Soc Jpn* 1988; **61**: 2271-3.

phényles^{162,165a),165c),166,167} (Figure 48). Typiquement, la réaction s'opère dans l'éthanol ou le méthanol à reflux avec une quantité stœchiométrique d'aniline et conduit à des rendements souvent très bons.

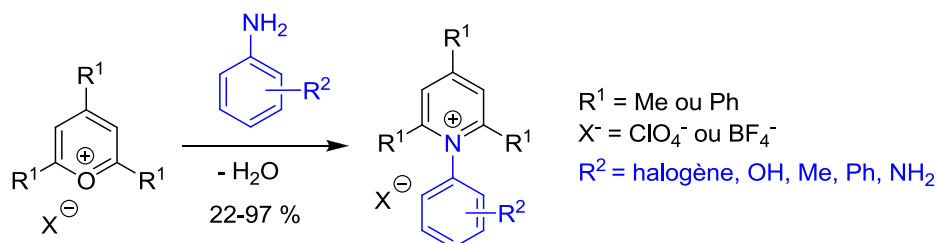


Figure 48 : Synthèse de sel de *N*-aryle pyridinium à partir de sels de pyrylium.

Plus récemment, des sels de pyrylium substitués par des fonctions esters,^{168,169} des méthoxy,^{170,171} des phénols,¹⁷² des tolyles,¹⁶² ou par d'autres groupements^{162,164,165,167,168,173,174,175} ont été synthétisés et utilisés dans la synthèse de *N*-aryle

¹⁶⁴Carta F, Vullo D, Maresca A, Scozzafava A, Supuran CT. Mono-/dihydroxybenzoic acid esters and phenol pyridinium derivatives as inhibitors of the mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, VII, IX, XII and XIV. *Bioorg Med Chem* 2013; **21**: 1564-9.

¹⁶⁵(a) Dinculescu A, Balaban AT. Reaction of pyrylium salts with nucleophiles. XIV. New pyridinium salts with potential biological activity. *Revue Roumaine de Chimie* 1980; **25**: 1505-28. (b) Dinculescu A, Fahmy M, Chiraleu F, Balaban AT. Reaction of pyrylium salts with nucleophiles. XVI. New *N*-substituted 2,4,6-trimethylpyridinium salts and their proton NMR spectra. *Revue Roumaine de Chimie* 1983; **28**: 699-705. (c) Balaban AT, Stephan E. Reaction of pyrylium salts with nucleophiles. XIX. Novel bispyridinium salts with potential biological activity. *Revue Roumaine de Chimie* 1987; **32**: 155-77. (d) Balaban AT, Il C. Reaction of pyrylium salts with nucleophiles. XX. Synthesis of 4-(*N*-pyridinium)-4'-dialkylaminoazobenzene and of 4-(4-dialkylaminophenylazo)-4'-(*N*-pyridinium) biphenyl derivatives. *Revue Roumaine de Chimie* 1988; **33**: 377-83.

¹⁶⁶Katritzky AR, Chermprapai A, Patel RC. Preparation of alkyl and benzyl fluorides from corresponding primary amines. *J Chem Soc Chem Comm* 1979; 238.

¹⁶⁷Katritzky AR, Langthorne RT, Muathin HA, Patel RC. Nucleophilic displacements of *N*-Aryl and heteroaryl groups. Part 1. Pyrylium-mediated transformation of anilines into phenol. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1983; 2601-4.

¹⁶⁸Katritzky AR, Agha BJ, Awartani R, Patel RC. Nucleophilic displacements of *N*-Aryl and heteroaryl groups. Part 4. Pyrylium-mediated transformations of heteroarylamines into pyridinium salts and their inter- and intra-molecular displacement. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1983; 2617-21.

¹⁶⁹Katritzky AR, Cozens AJ. Nucleophilic displacements of *N*-Aryl and heteroaryl groups. Part 3. Pyrylium-mediated synthesis of unsymmetrical diarylamines from anilines. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1983; 2611-5.

¹⁷⁰Sammes MP, Yip KL. The reaction between 4-methoxy-2,6-dimethylpyrylium perchlorate and amines. Isolation of both 4-iminiopyran salts and pyridinium salts in the reaction with primary amines. *J Chem Soc Perkin I* 1978; 1373-8.

¹⁷¹Ponte-Sucre A, Gulder T, Wegehaupt A, Albert C, Rikanovic C, et al. Structure-activity relationship and studies on the molecular mechanism of Leishmanicidal *N,C*-coupled arylisoquinolinium salts. *J Med Chem* 2009; **52**: 626-36.

¹⁷²Aliaga C, Galdames JS, Rezende MC. On the solvatochromic reversal of merocyanine dyes. Part 2. An experimental and semi-empirical study of the solvachromism of α - and γ -vinyllogous pyridones. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1997; 1055-8.

¹⁷³King LC, Ozog FJ, Moffat J. Preparation of substituted mercaptoprylium salts. *J Amer Chem Soc* 1951; **78**: 300-2.

¹⁷⁴Anker RM, Cook AH. The reactivity of γ -pyrone quaternary salts. *J chem Soc* 1946; 117-20.

pyridiniums. A l'inverse, aucune synthèse utilisant des pyryliums non substitués et donnant accès à des *N*-alkyle ou *N*-aryle pyridiniums non substitués sur le noyau pyridinium, n'est décrite. De ce fait, l'utilisation de cette voie d'accès aux *N*-aryle pyridiniums n'a pas été envisagée compte tenu des molécules ciblées (Figure 44).

II. Préparation des *N*-arylepyridiniums non hydroxylés à partir de quinones

La réaction entre un dérivé de la pyridine et une benzoquinone **B6** en milieu acide chlorhydrique conduit à la formation du *N*-(2,5-dihydroxyphényle) pyridinium **B7** correspondant avec d'assez bons rendements (Tableau 12).^{176,177,178,179} Néanmoins, des rendements plus faibles (20-30 %) sont observés lors de l'utilisation de benzoquinones **B6** macrocycliques.¹⁸⁰

¹⁷⁵Katritzky AR, Langthorne RT. Nucleophilic displacements of *N*-Aryl and heteroaryl groups. Part 2.Pyrylium-mediated transformations of anilines into aryl-sulfur functionality. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1983; 2605-9.

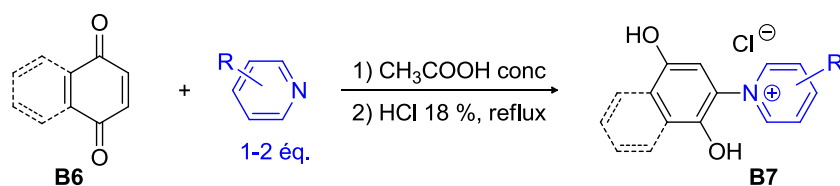
¹⁷⁶Schmidt A, Mordhorst T. Conjugated, cross-conjugated, and pseudo-cross-conjugated derivatives of a pyridinium alkaloid from *Punica granatum* *Arkivoc* 2003; **14**: 233-45.

¹⁷⁷Albrecht M, Gjickaj M, Schmidt A. Intermolecular interactions of punicinderivatives. *Tetrahedron* 2010; **66**: 7149-54.

¹⁷⁸Schmidt A, Mordhorst T, Fleischhauer H, Jeschke G. Coupled photocatalytic electron-transfers with 4,4'-bipyridinium derivatives of a betaine alkaloid from *Punica granatum*. *Arkivoc* 2005; **10**: 150-64.

¹⁷⁹Schmidt A, Topp M, Mordhorst T, Schneider O. Redoxactive derivatives of the betaine-alkaloid punicin from *Punica granatum*.Synthesis and cyclovoltammetry. *Tetrahedron* 2007; **63**: 1842-8.

¹⁸⁰ Bartolucci C, Cellai L, Cerrini S, Lamba D, Segre AN. Synthesis, Reactivity studies, and X-ray crystal structure of (11*R*)-25-*O*-Deacetyl-11-deoxo-11-hydroxy-21,23-*O*-isopropylidenerifamycin S. *Helvetica Chimica Acta* 1990; **73**: 185-97.

Tableau 12 : Synthèse de *N*-aryle pyridinium à partir de quinones.

		R	rendement (%)	référence
		<i>m</i> -Cl	10	176
		<i>o</i> -Me	86	177
		<i>p</i> -Me	72 ¹⁷⁶ -79 ¹⁷⁷	176, 177
		<i>m</i> -OH	58	176
		<i>p</i> -COOH	82	176
		<i>p</i> -NMe ₂	48	176
				26
		51-84	176, 178, 179	
			63	179
			44	179

III. Préparation des *N*-aryle pyridiniums non hydroxylés par la réaction de Zincke

III.1 Historique

En 1904, Zincke décrit la réaction entre le chlorure de *N*-(2,4-dinitrophényle) pyridinium **1** et l'aniline **2** conduisant, après ouverture et refermeture du cycle pyridinium, à la formation du chlorure de *N*-phényle pyridinium **3** (Figure 49).¹⁸¹

¹⁸¹(a) Zincke T. Dinitro phenyl pyridinium chloride and its conversion products. *Justus Liebigs Ann Chem* 1904; **330**: 361-374.(b) Zincke T. Dinitro phenyl pyridinium chloride and its conversion products. *Justus Liebigs Ann Chem* 1904; **333**: 296-345.

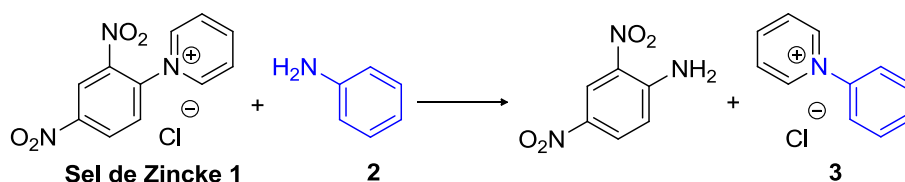


Figure 49 : Préparation du chlorure de *N*-phényle pyridinium décrit par Zincke en 1904.¹⁸¹

Cette réaction constitue une approche efficace et originale pour la synthèse de sels de pyridinium. Par la suite, de nombreux auteurs ont décrit la synthèse de *N*-alkyle et de *N*-aryle pyridiniums à partir d'amines primaires (aliphatiques ou dérivées de l'aniline) en utilisant cette méthode de préparation connue désormais sous la dénomination de « réaction de Zincke ». Le sel de *N*-(2,4-dinitrophényle) pyridinium **1** est quant à lui généralement appelé « sel de Zincke ».

III.2 Mécanisme réactionnel

La réaction de Zincke consiste formellement en une réaction de transannélation, procédant par transfert de la chaîne carbonée du noyau pyridinium du sel de Zincke **1**, vers l'atome d'azote de l'amine primaire (Figure 49). La réaction de Zincke suit un mécanisme de type S_N (ANRORC) (Nucleophilic Substitution by Adding the Nucleophile, Ring Opening, and Ring Closure) que l'on peut donc décrire comme la succession des étapes suivantes : (i) addition du nucléophile, (ii) ouverture du cycle, (iii) interconversions *cis-trans*, et (iv) fermeture du cycle (Figure 50).

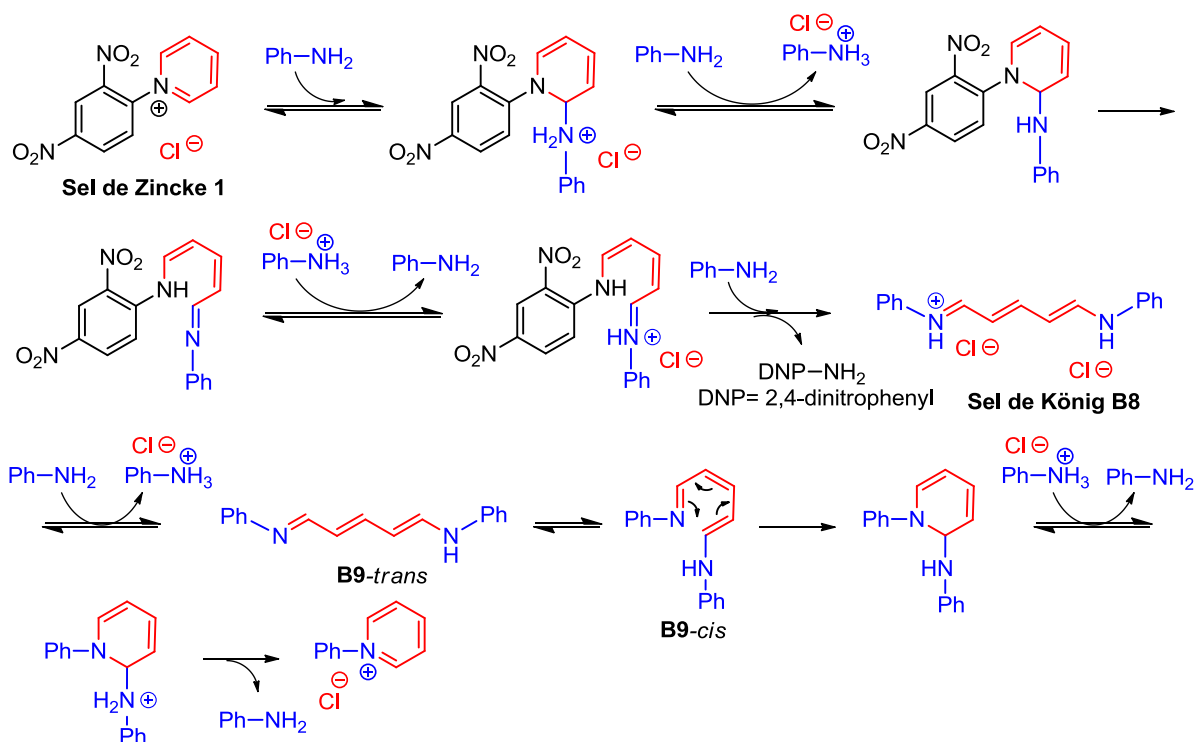


Figure 50 : Mécanisme réactionnel proposé pour la réaction de Zincke.

Sous activation thermique, la réaction entre le sel de Zincke **1** et l'aniline conduit après addition du nucléophile à l'ouverture du cycle pyridinium. L'addition d'une seconde aniline aboutit au départ de la 2,4-dinitroaniline ainsi qu'à la formation du chlorure de 5-anilino-*N*-phenyl-2,4-pentadienylideneiminium **B8**, appelé « sel de König ». D'après des études de spectroscopie ultraviolette,¹⁸² ce dernier est en équilibre avec le composé **B9**.¹⁸³ En présence d'un excès de triéthylamine, le composé **B8** est converti en **B9**. Bien que le composé *trans* soit plus stable,¹⁸⁴ une interconversion rapide du composé **B9-trans** en **B9-cis** est requise avant l'étape de fermeture du cycle qui s'opère suivant une réaction électrocyclique disrotatoire.¹⁸⁴ Cette étape est décrite comme étant l'étape cinétiquement déterminante.^{185,186} Le chlorure de *N*-phénylpyridinium est ensuite obtenu après protonation et départ d'une aniline.

¹⁸² Marvell EN, Caple G, Shahidi I. Mechanism of the formation of phenylpyridinium chloride from 1,7-diphenyl-1,7-diazahepta-1,3,5-triene. *Tetrahedron Lett* 1967; 277-80.

¹⁸³ König W. Über eine neue, vom Pyridin derivierende Klasse von Farbstoffen. *Journal für Praktische Chemie* 1904; **69**: 105-37.

¹⁸⁴ Marvell EN, Caple G, Shahidi I. Formation of phenylpyridinium chloride from 5-anilino-*N*-phenyl-2,4-pentadienylideneiminium chloride. Kinetics in basic media. *J Am Chem Soc* 1970; **92**: 5641-5.

¹⁸⁵ Kunugi S, Okubo T, Ise N. A study on the mechanism of the reaction of *N*-(2,4-dinitrophenyl)-3-carbamoylpyridinium chloride with amines and amino acids with reference to effect of polyelectrolyte addition. *J Am Chem Soc* 1976; **98**: 2282-7.

¹⁸⁶ Marvell EN, Shahidi I. Influence of para substituents on the rate of cyclization of 5-anilino-*N*-phenyl-2,4-pentadienylideneimine. *J Am Chem Soc* 1970; **92**: 5646-9.

III.3 Synthèse des N-aryle pyridiniums

La facilité de mise en œuvre de la réaction de Zincke, ainsi que la large gamme d'application des sels de pyridinium, utilisés en tant que tels ou préparés comme intermédiaires en chimie hétérocyclique, explique l'abondante littérature sur cette réaction.

III.3.1 Préparation du sel de Zincke

Cette voie de synthèse requiert la préparation préalable du sel de Zincke **1**, réactif de cette approche. Ce dernier s'obtient par action de la pyridine sur le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène, par substitution nucléophile aromatique (S_NAr) selon un mécanisme de type Addition/Élimination (Figure 51).

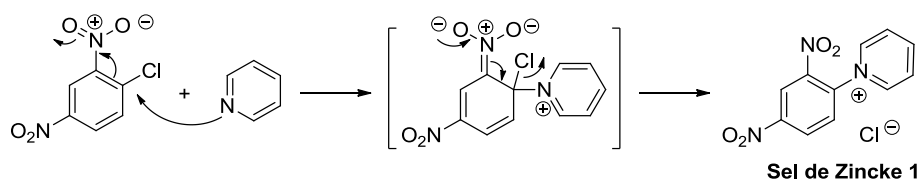


Figure 51 : Formation du sel de Zincke 1.

Cette réaction est menée au reflux de l'acétone.¹⁸⁷ Après 30 h, elle conduit quantitativement au sel attendu qui précipite dans le solvant et est obtenu pur après filtration sur fritté puis lavage à l'éther diéthylique.

Par la suite, de nombreux dérivés du sel de Zincke, ont été synthétisés à partir de pyridines diversement fonctionnalisées,^{188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209}

¹⁸⁷ Delpéch B. Formation and Reactivity of 5-aminopenta-2,4-dienals: Useful Intermediates for Nitrogen Heterocycles Synthesis. *Adv Heter Chem* 2014; **111**: 1-41.

¹⁸⁸ Eda M, Kurth MJ, Nantz MH. The solid-phase zincke reaction: preparation of ω -hydroxy pyridinium salts in the search for CFTR activation. *J Org Chem* 2000; **65**: 5131-5.

¹⁸⁹ Kunugi S, Okubo T, Ise N. A study on the mechanism of the reaction of N-(2,4-dinitrophenyl)-3-carbamoylpyridinium chloride with amine and amino acids with reference to effect of polyelectrolyte addition. *J Am Chem Soc* 1976; **98**: 2282-7.

¹⁹⁰ Park KK, Lee J, Han D. Synthesis and 1H-nmr of N-arylated nitrogen-containing aromatic heterocycles. *Bull Korean Chem Soc* 1985; **6**: 141-4.

¹⁹¹ Van der Aa LJ, Vader P, Storm G, Schiffelers RM, Engbersen JFJ. Intercalating quaternary nicotinamide-based poly(amido amine)s for gene delivery. *J Controlled Released* 2014; **195**: 11-20.

¹⁹² Viana GHR, dos Santos IC, Alves RB, Gil L, Marazano C, Gil RPF. Microwave-promoted synthesis of chiral pyridinium salts. *Tetrahedron Lett* 2005; **46**: 7773-6.

¹⁹³ Viana GHR, dos Santos IC, de Freitas RP, Gil L, Alves RB. Rapid microwave-promoted solvent-free synthesis of Zincke's salts and their conversion into chiral pyridinium salts in water. *Lett Org Chem* 2008; **5**: 396-8.

et utilisés dans la synthèse de sels de *N*-alkyle ou *N*-aryle pyridinium ; quelques-uns de ces dérivés sont répertoriés dans le Tableau 13.

¹⁹⁴Alves RB, de Freitas RP, Ventura CP, Santos LJ. Microwave-assisted classic reactions in organic chemistry. *Rev Virtual Quim* 2010; **2**: 214-24.

¹⁹⁵Coe B, Harris JA, Asselberghs I, Persoons A, Jeffery JC, Rees LH, Gelbrich T, Hursthouse MB. Tuning of charge-transfer absorption and molecular quadratic non-linear optical properties in ruthenium(II) ammine complexes. *J Chem Soc Dalton Trans* 1999; 3617-25.

¹⁹⁶Coe B, Harris JA, Harrington LJ, Jeffery JC, Rees LH, Houbrechts S, Persoons A. Enhancement of molecular quadratic hyperpolarizabilities in ruthenium(II) 4,4'-bipyridinium complexes by *N*-phenylation. *Inorg Chem* 1998; **37**: 3391-9.

¹⁹⁷Génisson Y, Marazano C, Das BC. A stereocontrolled alkylation of chiral pyridinium salts with Grignard reagents: synthesis of (+)-Normetazocine and (+)-Nordextrorphan. *J Org Chem* 1993; **58**: 2052-7.

¹⁹⁸Yamaguchi I, Higashi H, Shigesue S, Shingai S, Sato M. *N*-arylated pyridinium salts having reactive groups. *Tetrahedron Lett* 2007; **48**: 7778-81.

¹⁹⁹Lopez-Vidal EM, Blanco V, Garcia MD, Peinador C, Quintela JM. Synthesis of platinum(II) metallocycles using microwaves-assisted heating. *Org Lett* 2012; **14**: 580-3.

²⁰⁰Bongard D, Möler M, Rao SN, Corr D, Walder L. Synthesis of nonsymmetrically *N,N'*-diaryl-substituted 4,4'-bipyridinium salts with redox-tunable and titanium dioxide (TiO₂)-anchoring properties. *Helv Chim Acta* 2005; **88**: 3200-9.

²⁰¹Yamaguchi I, Higashi H, Shunsuke K, Sato M. Synthesis and chemical properties of diacetylenes with pyridinium and 4,4'-bipyridinium groups. *Helv Chim Acta* 2010; **93**: 819-28.

²⁰²Rezende MC, Ponce I, Onate R, Almodovar I, Aliaga C. Change of mechanism with a change of substituents for a Zincke reaction. *Tetrahedron Lett* 2014; **55**: 3097-9.

²⁰³Barbier D, Marazano C, Das BC, Potier P. New chiral isoquinolinium salt derivatives from chiral primary amines via Zincke reaction. *J Org Chem* 1996; **61**: 9596-8.

²⁰⁴Kaiser A, Billot X, Gateau-Olesker A, Marazano C, Das BC. Selective entry to the dimeric or oligomeric pyridinium sponge macrocycles via aminopentadienal derivatives. Possible biogenetic relevance with manzamine alkaloids. *J Am Chem Soc* 1998; **120**: 8026-34.

²⁰⁵Colquhoun HM, Greenland BW, Zhu Z, Shaw JS, Cardin CJ, Burattini S, Elliott JM, Basu S, GAsa TB, Stoddart JF. A general synthesis of macrocyclic π -electron-acceptor systems. *Org Lett* 2009; **11**: 5238-41.

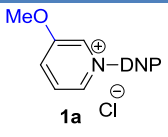
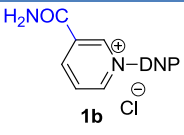
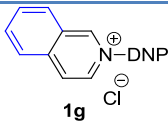
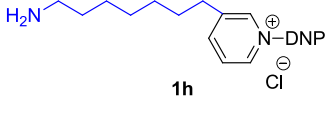
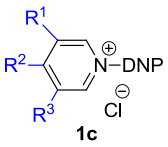
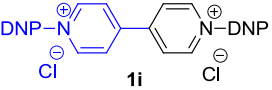
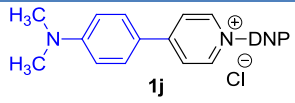
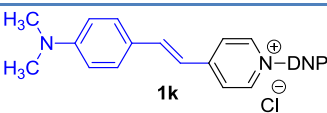
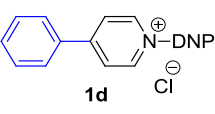

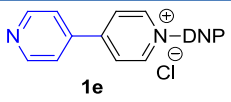
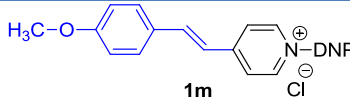
²⁰⁶Hutchings MG. Structure-colour relationships of some new *N*-arylpyridinium hemicyanine dyes. *Tetrahedron* 1984; **40**: 2061-8.

²⁰⁷Coe B, Harris JA, Clays K, Persoons A, Wostyn K, Brunschwig BS. A comparison of the pentaammine(pyridyl)ruthenium(II) and 4-(dimethylamino)phenyl groups as electron donors for quadratic non-linear optics. *Chem Commun* 2001; 1548-9.

²⁰⁸Coe B, Harris JA, Asselberghs I, Wostyn K, Clays K, Persoons A, Brunschwig BS, Coles SJ, Gelbrich T, Light ME, Hursthouse MB, Nakatani K. Quadratic optical nonlinearities of *N*-methyl and *N*-aryl pyridinium salts. *Adv Funct Mater* 2003; **13**: 347-57.

²⁰⁹Coe B, Harris JA, Asselberghs I, Clays K, Olbrechts G, Persoons A, Hupp JT, Johnson RC, Coles SJ, Hursthouse MB, Nakatani K. Quadratic nonlinear optical of *N*-aryl stilbazolium dyes. *Adv Funct Mater* 2002; **12**: 110-6.

Tableau 13 : Quelques exemples de dérivés du sel de Zincke (DNP = 2,4-dinitrophényle).

	Références		Références
	188		
	189, 190, 191		
	$R^1 = R^2 = H, R^3 = Me$ 192, 193, 194		203
	$R^1 = R^2 = H, R^3 = Et$ 193, 194		204
	$R^1 = R^3 = Me, R^2 = H$ 193, 194		205
	$R^1 = R^3 = H, R^2 = Me$ 195, 196		206, 207, 208
	$R^1 = R^2 = Me, R^3 = H$ 197		208, 209
	188, 198		208
	190, 196, 198, 199, 200, 201, 202		208

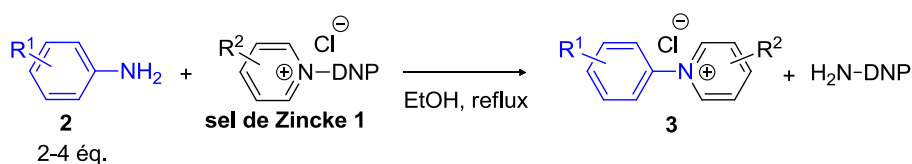
Ces sels de Zincke vont ensuite être engagés dans une seconde étape de transannélation afin d'aboutir au sel de pyridinium désiré.

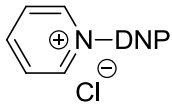
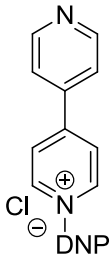
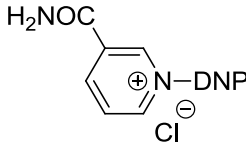
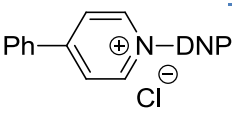
III.3.2 Accès aux sels de pyridinium par la réaction de Zincke

III.3.2.1 Rappels bibliographiques

La seconde étape est une réaction de transannélation entre le sel de Zincke et une amine primaire pour conduire au sel de pyridinium correspondant. Cette étape procède couramment avec de bons, voire d'excellents rendements, en particulier lors de l'utilisation d'amines primaires aliphatiques. La littérature indique l'application efficace de cette réaction y compris pour les dérivés de l'aniline **2** (Tableau 14). Typiquement, la réaction de transannélation est menée dans l'éthanol et procède sous activation thermique, au reflux du solvant (80 °C),^{190,198} avec des durées pouvant parfois atteindre plusieurs jours.²¹⁰

²¹⁰Roberston L, Hartley RC. Synthesis of N-arylpyridinium salts bearing a nitron spin trap as potential mitochondrial-targeted antioxidants. *Tetrahedron* 2009; **65**: 5284-92.

Tableau 14 : Quelques exemples de synthèses de *N*-aryle pyridiniums 3 à partir de dérivés de l'aniline 2.


Sel de Zincke	R ¹	Rendement (%)	Sel de Zincke	R ¹	Rendement (%)
	H	83 ¹⁹⁰		H	61, ¹⁹⁰ 86 ¹⁹⁶
	<i>p</i> -Me	75 ¹⁹⁰		<i>p</i> -Me	58 ¹⁹⁰
	<i>p</i> -Et	80 ¹⁹⁰		<i>p</i> -Et	63, ¹⁹⁰ 70 ²⁰⁰
	<i>p</i> -Cl	71 ¹⁹⁰		<i>p</i> -Cl	61, ¹⁹⁰ 89 ¹⁹⁸
	<i>p</i> -CN	68 ¹⁹⁰		<i>p</i> -CN	62 ¹⁹⁰
	<i>p</i> -OMe	78 ¹⁹⁰		<i>p</i> -OMe	55, ¹⁹⁰ 77 ¹⁹⁸
	<i>p</i> -OH	66 ¹⁹⁰		<i>p</i> -OH	61, ¹⁹⁰ 88 ²⁰⁰
	<i>m</i> -Me	68 ¹⁹⁰		<i>m</i> -Me	77 ¹⁹⁰
	H	58 ¹⁹⁰		<i>p</i> -F	91 ¹⁹⁸
	<i>p</i> -Me	73 ¹⁹⁰		<i>p</i> -Br	97 ¹⁹⁸
	<i>p</i> -Et	61 ¹⁹⁰	<i>p</i> -I	69 ¹⁹⁸	
	<i>p</i> -Cl	70 ¹⁹⁰	<i>p</i> -CH ₂ OH	83 ²⁰⁰	
	<i>p</i> -CN	78 ¹⁹⁰	<i>p</i> -COOH	84 ²⁰⁰	
	<i>p</i> -OMe	79 ¹⁹⁰	<i>p</i> -SO ₃ H	62 ²⁰⁰	
	<i>p</i> -OH	78 ¹⁹⁰	<i>p</i> -OEt	88 ²⁰⁰	
	<i>m</i> -Me	76 ¹⁹⁰	<i>p</i> -OMe	96 ¹⁹⁸	
<i>o</i> -Cl	35 ¹⁹⁰	<i>p</i> -F	94 ¹⁹⁸		
			<i>p</i> -Br	64 ¹⁹⁸	

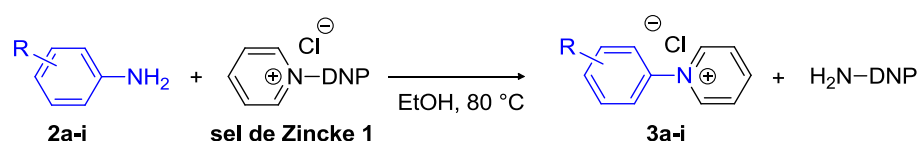
Cependant, un aperçu de la littérature permet d'identifier les conditions menant à des rendements modérés, voire faibles. De telles situations sont généralement associées à la formation de macrocycles^{204,205} et/ou l'utilisation de certains dérivés d'aniline comme amines primaires.^{199,208,209,211,212} Il est important de noter que très peu d'articles relatent l'utilisation de dérivés d'aniline électriquement désactivés et/ou stériquement encombrés.

²¹¹ Yamagushi, Shingai S. Turn-on chemosensors for silver ions based on oligomers with diaza-16-crown-6-ether receptors and aromatic fluorophore end groups. *Polym Int* 2012; **61**: 307-13.

III.3.2.2 Résultats et discussion

Une série d'anilines monosubstituées **2a-i** (Tableau 15) a été engagée dans des réactions de Zincke en suivant pour ce faire, les conditions généralement décrites pour cette transformation : activation thermique conventionnelle à 80 °C dans l'éthanol. De premiers essais ayant permis de mettre en évidence le caractère peu nucléophile de certaines de nos anilines, celles-ci ont toutes été engagées en excès (6 équivalents).

Tableau 15 : Transformation d'anilines par la réaction de Zincke (activation thermique).



entrée	R	aniline	durée	rendement isolé (%)
1	<i>p</i> -CH ₃	2a	18 h	82
2	H	2b	96 h	63
3	<i>m</i> -Cl	2c	96 h	79
4	<i>p</i> -Cl	2d	96 h	70
5	<i>o</i> -OH	2e	96 h	non isolé ^a
6	<i>m</i> -OH	2f	96 h	non isolé ^a
7	<i>p</i> -OH	2g	96 h	non isolé ^a
8	<i>o</i> -Cl	2h	3 semaines	conversion incomplète ^b
9	<i>o</i> -CF ₃	2i	18 semaines	conversion incomplète ^c

Conditions : ethanol, activation thermique (80 °C), sel de Zincke (0.1 M), **2a-i** (6 éq.). a : consommation complète du sel de Zincke **1** constatée par RMN ¹H. b : ratio (sel de Zincke **1**/ sel **3h**) estimé à 82 % par RMN ¹H. c : ratio (sel de Zincke **1**/ sel **3i**) estimé à 78 % par RMN ¹H

Les sels de pyridinium **3a-d** (entrées 1 à 4) ont pu être isolés avec d'assez bons rendements après purification par lavages successifs à l'acétate d'éthyle. Transposée aux sels **3e-g** (entrées 5-7) cette même méthode de purification n'a cependant pas donné de résultats satisfaisants : ne disposant alors pas d'autres techniques séparatives efficaces (par chromatographie notamment), ces composés étaient donc restés partiellement contaminés d'aniline de départ.

²¹²Zhang KD, Tian J, Hanifi D, Zhang Y, Sue ACH, Zhou TY, Zhang L, Zhao X, Liu Y, Li ZT. Toward a single-layer two-dimensional honeycomb supramolecular organic framework in water. *J Am Chem Soc* 2013; **135**: 17913-8.

La transformation par la réaction de Zincke des anilines **2h-i** (entrées 8-9), électroniquement désactivées et stériquement encombrées, s'est révélée quant à elle clairement insatisfaisante. Pour ces composés, un mélange inséparable (et donc inexploitable) de sel de Zincke **1** et de sel attendu **3** a en effet été obtenu après plusieurs semaines de réaction (jusqu'à 18 semaines pour l'aniline **2i**, entrée 9). Une explication raisonnable à ces conversions incomplètes pourrait être l'instauration en solution d'un équilibre (du fait des nucléophilies proches des anilines de départ **2** et de la dinitroaniline) ; équilibre que même l'excès d'aniline **2** (6 équivalents) n'a pas permis de déplacer totalement (Figure 52).

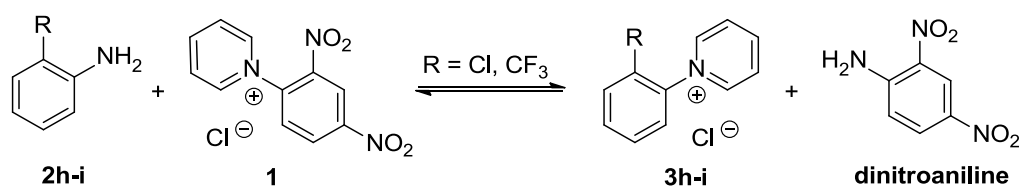


Figure 52 : Limitations de la réaction de Zincke par activation thermique dans le cas d'anilines désactivées.

Ces résultats ont clairement mis en évidence la nécessité de mettre au point un protocole à la fois applicable à tout type d'aniline – y compris les plus désactivées – et raisonnable de par sa mise en œuvre (en l'occurrence, sans temps de réaction excessivement prolongé).

III.3.3 Variantes à la réaction de Zincke

III.3.3.1 Rappels bibliographiques

Une étude de la bibliographie nous indique que dans un certain nombre de cas, l'utilisation de formes dites « ouvertes » permet de lever certains des verrous liés à la réaction de Zincke. Un aperçu de la littérature permet d'identifier trois analogues réactionnels du sel de Zincke **1** pouvant, sous l'action d'une amine primaire, donner accès au sel de pyridinium correspondant : l'aminopentadiène **B10**, l'aldéhyde de Zincke **B11** et le glutaconaldéhyde **B12** (Figure 53).

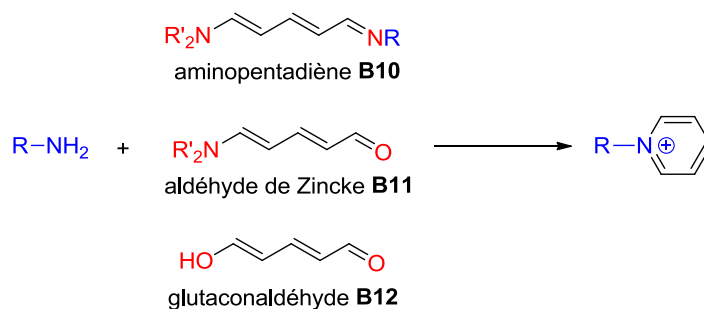


Figure 53 : Synthèse de sels de pyridinium à partir de formes ouvertes B10-12.

III.3.3.1.1 Synthèse de sels de pyridinium à partir d'un aminopentadiène

Mis en présence du chlorure de 2-(2,4-dinitrophenyl) isoquinolin-2-ium **1g**, la (*R*)-(+)-1-phényléthylamine (1,2 éq.) ne conduit après 3 jours de réaction à température ambiante qu'à des traces du sel de pyridinium **B14** correspondant (Figure 54).²⁰³ Cependant, lorsque la réaction est menée dans les mêmes conditions mais avec un ajout initial de diéthylamine (1,2 éq.), la conversion devient complète au bout de 2 jours.²¹³ Selon les auteurs, cet ajout d'amine secondaire permettrait l'accès au sel de pyridinium attendu *via* une forme ouverte de type aminopentadiène **B13**.

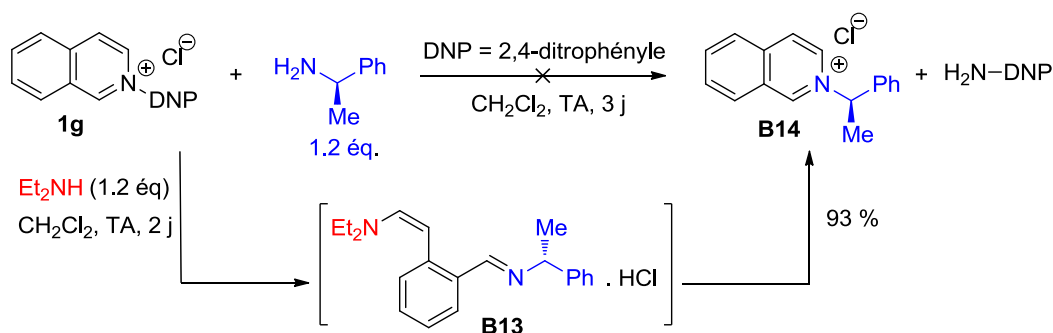


Figure 54 : Synthèse du chlorure de (+)-2-[(1*R*)-1-phényléthyl] isoquinolinium **B14 à température ambiante.²¹³**

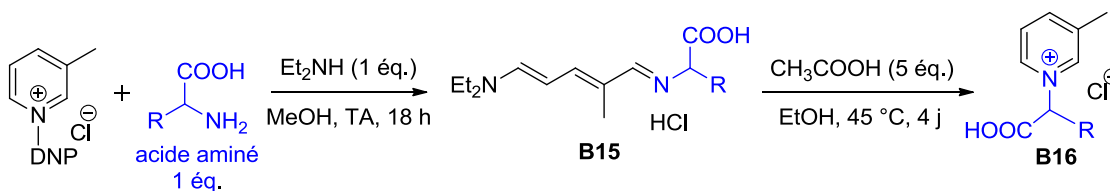
Une stratégie de synthèse comparable (mais cette fois avec isolement de l'espèce intermédiaire ouverte) a été efficacement appliquée à la préparation de pyridiniums à partir d'acides aminés libres (Tableau 16),²¹³ ce que ne permet pas la réaction de Zincke classique.²¹⁴ Il est à noter que si les dérivés estérifiés d'acides aminés peuvent être convertis selon les conditions classiques au reflux du butan-1-ol, cette conversion s'accompagne toutefois d'une racémisation. En revanche et outre le fait qu'il permette l'utilisation des acides

²¹³Nguyen TM, Rayo Sanchez-Salvatori M, Wypych JC, Marazano C. Aminopentadiene imines from Zincke salts of 3-alkylpyridines. Application to a synthesis of pyridinium salts from amino acids. *J Org Chem* 2007; **72**: 5916-9.

²¹⁴Hockova D, Holy A. Synthesis of some "abbreviated" NAD(+) analogues. *Collect Czech Chem Commun* 1997; **62**: 948-56.

aminés sous forme libre, le passage par le dérivé aminopentadiène **B15** procède sans perte d'activité optique (Tableau 16).

Tableau 16 : Synthèse de sels de pyridinium via le dérivé aminopentadiène d'après Nguyen *et al.*²¹³



Acide aminé	Rendement isolé (%)	
	B15	B16
L-leucine	72	29
L-isoleucine	65	29
L-phenylalanine	62	30
L-sérine	68	27
L-tryptophane	55	28
D-phenylglycine	68	26

L'on notera la formation régiosélective de l'aminopentadiène **B15** à partir d'un sel de Zincke non symétrique. Dans une seconde étape, la cyclisation du dérivé aminopentadiène **B15** procède en milieu acide acétique dans l'éthanol pour conduire à la formation des sels de pyridinium attendus. Néanmoins, la température à laquelle se déroule cette étape semble être importante pour ce type de substrat. En effet, travailler au reflux de l'éthanol conduit à une décarboxylation du sel de pyridinium **B16**. A l'inverse, lorsque la température n'excède pas $45\text{ }^\circ\text{C}$, la formation du sel de pyridinium **B16** se fait sans décarboxylation (Tableau 16). Cependant, après 4 jours de réaction, seuls environ 40 % de l'aminopentadiène **B15** avaient réagi, expliquant ainsi les mauvais rendements obtenus pour cette étape.

III.3.3.1.2 Synthèse de sels de pyridinium à partir de l'aldéhyde de Zincke

Au début du 20^{ème} siècle, Zincke et König découvrent indépendamment que le traitement de sels de pyridinium quaternaires par des amines secondaires conduit à la formation de produits d'ouverture de cycle obtenus sous la forme de sels d'aminopentadiéniminium **B8** (Figure 55).^{181,183,215} En 1905, Zincke décrit le traitement de ces sels en milieu basique et la formation

²¹⁵(a) Zincke T. Dinitro phenyl pyridinium chloride and its conversion products. *Justus Liebigs Ann Chem* 1904; **338**: 107-41. (b) Zincke T. Dinitro phenyl pyridinium chloride and its conversion products. *Justus Liebigs*

consécutive de 5-aminopenta-2,4-diénals **B11**.^{215(c)} Par la suite, les sels d'aminopentadiéniminiums **B8** seront appelés « sels de König » et les 5-aminopenta-2,4-diénals **B11**, les « aldéhydes de Zincke ».

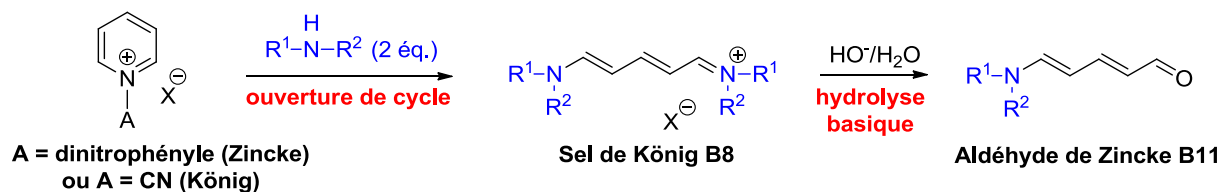


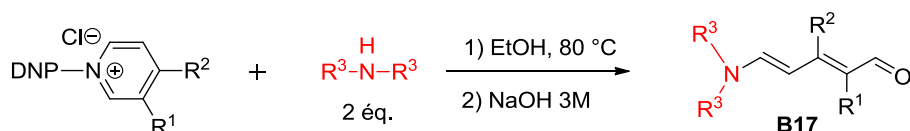
Figure 55 : Préparation de l'aldéhyde de Zincke B11 selon Zincke.^{215(c)}

La préparation de l'aldéhyde Zincke se déroule en deux étapes. Typiquement, la première étape s'opère dans l'éthanol à reflux et, après réaction entre le sel de Zincke et deux équivalents d'amine secondaire, conduit à la formation du sel de König. Ce dernier est traité par de la soude pour conduire à l'aldéhyde de Zincke **B17** avec de bons voire d'excellents rendements (Tableau 17).^{216,217}

Ann Chem 1904; **339**: 193-201. (c) Zincke T, Wurker W. On the effect of aliphatic amines on dinitrophenylpyridinium chloride. *Justus Liebigs Ann Chem* 1905; **341**: 365-79. (d) Zincke T, Schreyer F. Dinitrophenylpyridinium chloride and their conversion products. The effect of acetic acid hydrides on pyridine colour bases. *Justus Liebigs Ann Chem* 1907; **353**: 380-5.

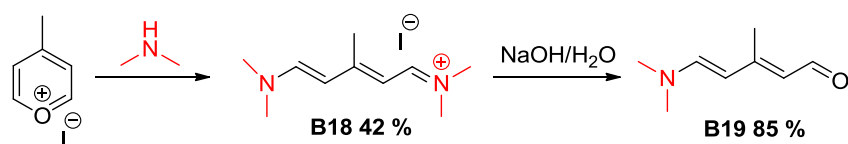
²¹⁶ Steinhardt SE, Silverston JS, Vanderwal CD. Stereocontrolled synthesis of Z-Dienes via an Unexpected pericyclic cascade rearrangement of 5-Amino-2,4-pentadienals. *J Am Chem Soc* 2008; **130**: 7560-1.

²¹⁷ Nguyen TM, Peixoto S, Ouairy C et al. Simple and Convenient Method for the Synthesis of 2-Substituted Glutaconaldehyde Salts and 2-Substituted Glutaconaldehyde Derivatives. *Synthesis* 2010; **1**: 103-9.

Tableau 17 : Préparation de l'aldéhyde Zincke B17 à partir du sel de Zincke.

R ¹	R ²	$\text{R}^3\text{-N-R}^3$	Durée (min)	Rendement isolé (%)	Référence
Ph	H	Me_2NH	24 h	65	216
H	Ph	Me_2NH	10	89	
H	H	Me_2NH	90	83	217
CH ₃	H	Me_2NH	90	84	
(CH ₂) ₂ -OH	H	Me_2NH	60	51	
OMe	H	Me_2NH	30	55	
H	H	Bn_2NH	90	81	216
CH ₃	H		120	79	

En 1961, Köbrich décrit la synthèse de l'aldéhyde de Zincke **B19** à partir d'un sel de pyrylium (Figure 56).²¹⁸ L'ouverture du cycle après réaction avec une amine secondaire, conduit à la formation du sel de König **B18** correspondant avec un rendement isolé de 42 %. Puis après traitement par de la soude, l'aldéhyde de Zincke **B19** est isolé avec un rendement de 85 %.

**Figure 56 : Synthèse de l'aldéhyde Zincke B19 à partir d'un sel de pyrylium.**²¹⁸

La facilité de préparation des aldéhydes de Zincke, ainsi que leur large gamme d'application en chimie hétérocyclique ont contribué à leur utilisation en tant qu'intermédiaires de synthèse. Nous pouvons citer leur emploi pour la synthèse totale du FR182877 (un agent stabilisant des microtubules),²¹⁹ la synthèse de produits naturels comme l'azulène²²⁰ ou d'autres produits

²¹⁸Köbrich G. 4-Methyl-pyryliumperchlorat und Dessen Abwandlung zu Pentamethinderiv. *Liebigs Ann Chem* 1961; **648**: 114-23.

²¹⁹Vanderwal CD, Vosburg DA, Weiler S, and Sorensen EJ. An Enantioselective Synthesis of FR182877 Provides a Chemical Rationalization of Its Structure and Affords Multigram Quantities of Its Direct Precursor. *J Am Chem Soc* 2003; **125**: 5393-407.

naturels plus complexes²²¹ comme la Marinomycine A,²²² ou d'autres polyènes.²²³ Dans ce dernier exemple, l'aldéhyde de Zincke est utilisé pour transférer le motif diénal à un nucléophile organométallique. De plus, le groupe de Marazano a décrit la synthèse d'alcaloïdes en utilisant l'aldéhyde de Zincke comme intermédiaire clef.¹⁸⁷

Par ailleurs, il a été démontré que l'aldéhyde de Zincke **B20** pouvait, sous activation micro-ondes, subir un réarrangement pour conduire au *Z*-penta-2,4-dienamide **B21** correspondant. Ce comportement a été mis à profit en chimie hétérocyclique.^{216,224}

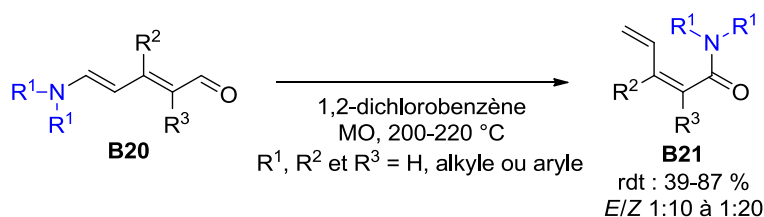


Figure 57 : Réarrangement de l'aldéhyde de Zincke B20 sous activation micro-ondes (MO).^{216,224}

Enfin, il a démontré que l'addition de l'aldéhyde de Zincke **B23** sur un ion *N*-acyliminium **B22** conduisait à la formation du sel de pyridinium **B24** correspondant (Figure 58).²²⁵

²²⁰Ziegler K, Hafner K. Zu Vorstehender Zuschrift. *Angew Chem* 1955; **67**: 301.

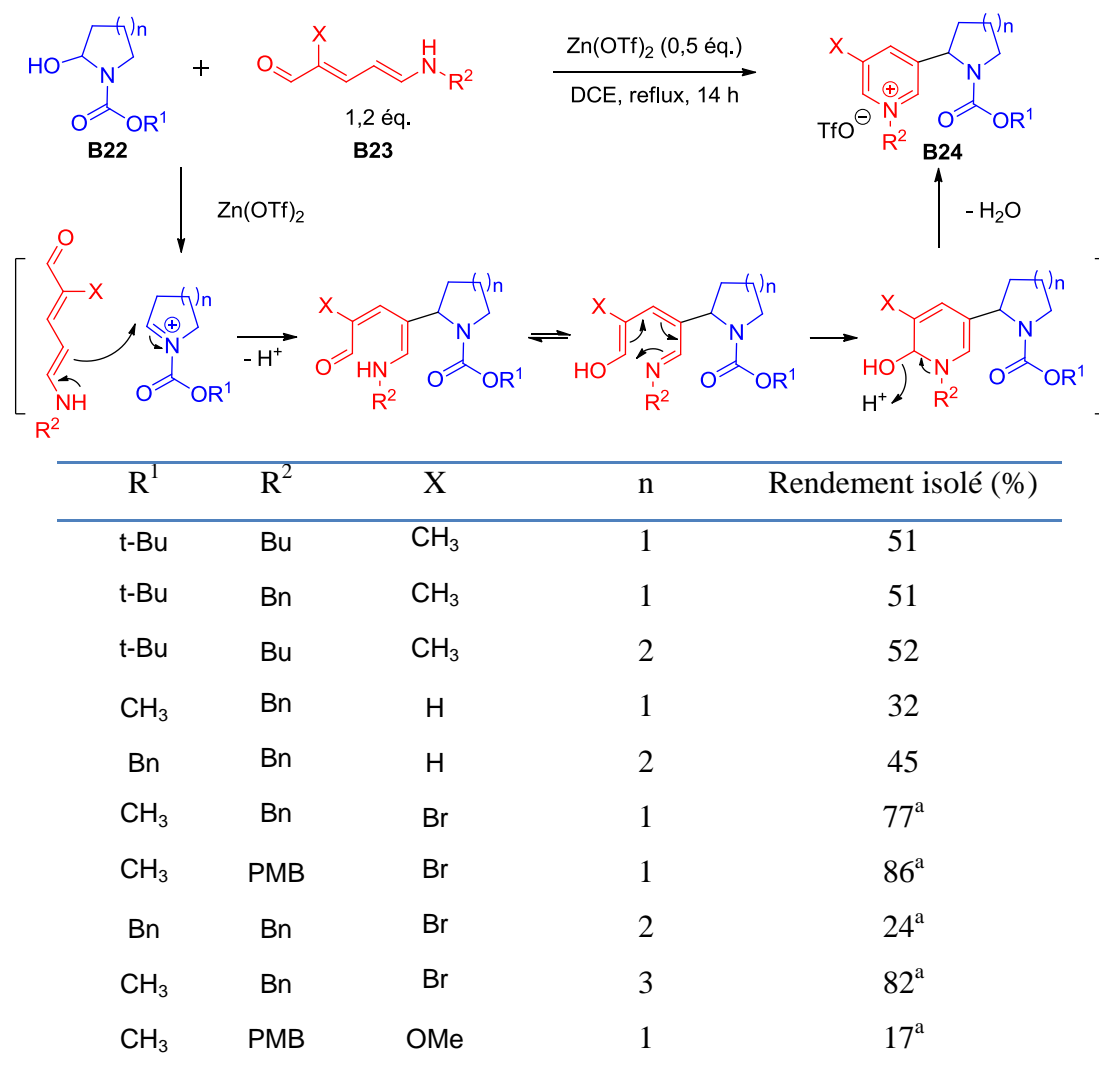
²²¹Vanderwal CD. Reactivity and Synthesis Inspired by the Zincke Ring-Opening of Pyridines. *J Org Chem* 2011; **76**: 9555-67.

²²²Evans PA, Huang MH, Lawler MJ, Maroto S. Total synthesis of marinomycin A using salicylate as a molecular switch to mediate dimerization. *Nat Chem* 2012; **4**: 680-4.

²²³Köbrich G, Breckoff WE, Drischel W. Ein neues Syntheseprinzip für Verbindungen der Vitamin A-Reihe. *Liebigs Ann Chem* 1967; **704**: 51-69.

²²⁴Paton RS, Steinhardt SE, Vanderwal CD, Houk KN. Unraveling the Mechanism of Cascade Reactions of Zincke Aldehydes. *J Am Chem Soc* 2011; **133**: 3895-1.

²²⁵Peixoto S, Nguyen M, Crich D, Delpéch B, Marazano C. One-pot formation of piperidine- and pyrrolidine-substituted pyridinium salts via addition of 5-alkylaminopenta-2,4-dienals to *N*-acyliminium ions : Application to the synthesis of (±)-Nicotine and analogs. *Org Lett* 2010; **12**: 4760-3.



a : après 14 h au reflux, ajout de 1 éq. de TFA à TA pendant 1 h.

Figure 58 : Synthèse de sel de pyridinium **B24** à partir de l'aldéhyde de Zincke **B23**.²²⁵

III.3.3.1.3 Synthèse de sels de pyridinium à partir du glutaconaldéhyde

III.3.3.1.3.1 Préparation du glutaconaldéhyde

En 1924, Baumgarten démontre que la réaction entre le complexe SO₃-pyridine **B25** et la soude conduit à la formation de l'alcoolate de sodium du glutaconaldéhyde **B12** (5-hydroxypenta-2,4-diène)²²⁶ (Figure 59), l'alcool correspondant étant très instable.²²⁷

²²⁶(a) Baumgarten P. Concerning the breakdown of pyridine to gluconic acid dialdehyde and its reverse transformation in pyridine. *P Chem Ber* 1924; **57**: 1622-7.

(b) Baumgarten P. The effect of halogen on enolates of gluconic acid dialdehyde and the synthesis of beta-halogen-pyridines. *P Chem Ber* 1925; **58**: 2018-23.

²²⁷ Becher J, Christensen MC. Derivatives and reactions of glutaconaldehyde .IX. Substitution-reactions in the glutaconaldehyde anion-assignment of structure of a free glutaconaldehyde. *Tetrahedron* 1979; **35**: 1523-30.

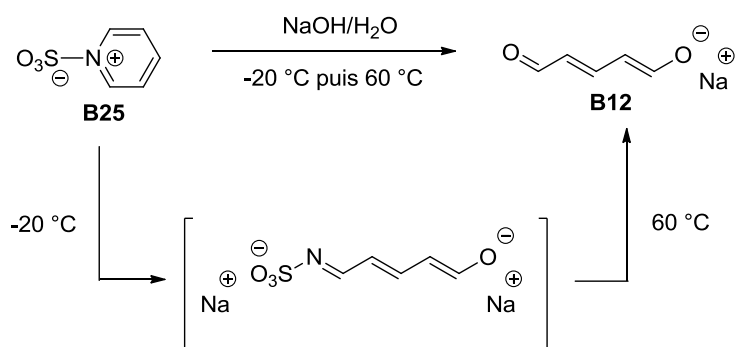


Figure 59 : Synthèse de l'alcoolate de sodium du 5-hydroxypenta-2,4-diéнал **B12** d'après Becher.²²⁸

Plus récemment, l'équipe de Marazano a décrit la synthèse de l'alcoolate de potassium du glutaraldehyde **B12** en partant du sel de Zincke **1** via la formation de l'aldéhyde de Zincke **B11** (Tableau 17).²¹⁷ Ce dernier est traité par de la potasse dans un mélange méthanol/THF à reflux pour conduire à l'alcoolate correspondant avec de très bons rendements (Tableau 18).²¹⁷

Tableau 18 : Synthèse de l'alcoolate de potassium du glutaraldehyde **B12** à partir de l'aldéhyde de Zincke **B11**.²¹⁷

The reaction shows the conversion of Zincke aldehyde (**B11**) to the potassium salt of glutaraldehyde (**B12**). The reaction conditions are KOH in MeOH/THF at reflux for 3-6 hours.

R	Rendement isolé (%)
H	93
CH_3	80
$(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$	83
OMe	65

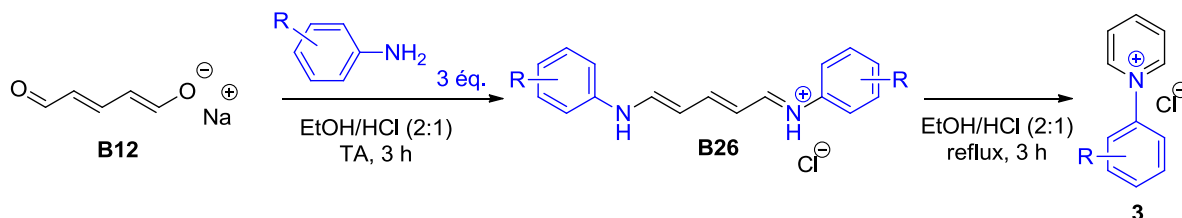
III.3.3.1.3.2 Synthèse de sels de pyridinium

L'action d'un dérivé de l'aniline **2** sur le glutaraldehyde **B12** conduit à la formation du sel de *N*-aryle pyridinium **3** correspondant (Tableau 19). Cette réaction procède en deux étapes, avec premièrement la formation du sel de König **B26**, dans un mélange éthanol/acide chlorhydrique (2:1) à température ambiante. Dans une seconde étape, la cyclisation s'opère au reflux du mélange éthanol/acide chlorhydrique pour conduire au sel de pyridinium

²²⁸Becher J. Glutaraldehyde sodium salt from hydrolysis of pyridinium-1-sulfonate. *J Org Synth* 1979; **59**: 79.

correspondant **3**.^{229,230} Il est à noter que dans les articles mentionnant cette voie de synthèse, les rendements en sel de pyridinium isolé ne sont jamais précisés.

Tableau 19 : Synthèse de *N*-aryle pyridiniums à partir du glutaconaldéhyde.^{229,230}

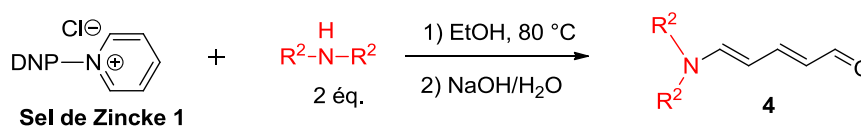


position	R
--	H, 1-naphtyle
<i>o</i>	NO ₂ , Cl, Me, OMe
<i>m</i>	NO ₂ , Cl, OMe
<i>p</i>	NO ₂ , Et, Cl, Me, Ph, OMe, phenylazo

III.3.3.2 Résultats et discussion

Le protocole décrit dans la littérature a été appliqué à la synthèse de l'aldéhyde de Zincke **4** à partir d'amines secondaires (Tableau 20).

Tableau 20 : Synthèse de l'aldéhyde de Zincke **4.**



entrée	$\begin{matrix} \text{H} \\ \text{R}^2\text{-N-R}^2 \end{matrix}$	Durée (h)
1		2
2		18

²²⁹Kossemehl G, Kabbeck-Kupijai D. Synthesis and electrical conductivity of *N*-arylated pyridinium TCNQ complex salts. *Synthetic Metals* 1993; **53**: 347-51.

²³⁰Magonov SN, Bar G, Cantow HJ, Kabbeck-Kupijai D, Kobmehl G. Complex salts of TCNQ with substituted phenyl pyridines and their characterization by scanning tunneling microscopy. *Ber Bunsenges Phys Chem* 1993; **97**: 1478-86.

Pour ce faire, deux équivalents de morpholine (entrée 1) ou de pyrrolidine (entrée 2) ont été mis à réagir avec le sel de Zincke **1** à 80 °C dans l'éthanol. Dans un second temps, le mélange réactionnel est traité par de soude. Seule la réaction avec la pyrrolidine a permis de conduire à l'aldéhyde de Zincke **4** correspondant après 18 h (entrée 2). Bien que ce composé n'ait jamais été décrit dans la littérature, les déplacements chimiques de son spectre RMN ¹H sont conformes à ceux de ses analogues déjà décrits.²¹⁶ Néanmoins, l'aldéhyde de Zincke ainsi synthétisé s'est révélé particulièrement instable, se dégradant en effet totalement en quelques jours, malgré un stockage au congélateur à -18° C. Cette instabilité, de même que les résultats obtenus grâce à l'activation micro-onde (*vide infra*), ne nous ont pas incités à poursuivre la synthèse de pyridiniums à partir des aldéhydes de Zincke **4**.

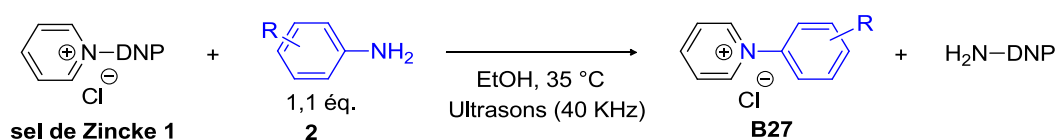
III.3.4 Activations non conventionnelles de la réaction de Zincke

III.3.4.1 Rappels bibliographiques

III.3.4.1.1 Réaction de Zincke par activation ultrasonique

En 2010, Zhao *et al.* décrivent la synthèse de *N*-aryle pyridiniums **B27** par la réaction de Zincke assistée par ultrasons (Tableau 21).²³¹

Tableau 21 : Synthèse de *N*-aryle pyridiniums **B27 par activation ultrasonique d'après Zhao *et al.*²³¹**



Entrée	R	Durée (min)	Rendement (%)
1	H	100	62
2	<i>p</i> -CH ₃	100	67
3	<i>p</i> -Cl	100	79
4	<i>p</i> -I	100	66
5	<i>p</i> -NH ₂	100	79
6	2,5-diMe	100	48
7	1-Naphtyle	120	traces

²³¹Zhao S, Xu X, Zheng L, Liu H. An efficient ultrasonic-assisted synthesis of imidazolium and pyridinium salts based on the zincke reaction. *Ultrasonics Sonochemistry* 2010; **17**: 685-9.

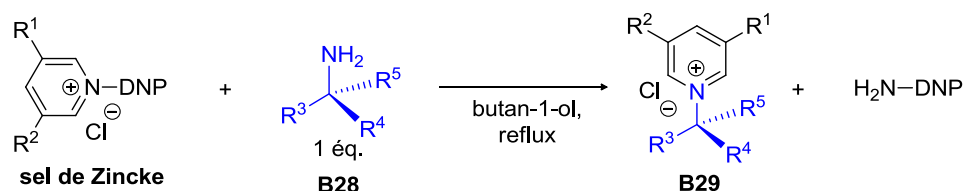
8	<i>p</i> -NO ₂	120	traces
---	---------------------------	-----	--------

Les produits **B27** ont ainsi pu être obtenus avec de bons rendements (entrées 1-6) en un temps limité (100 minutes). Dans le cas d'anilines désactivées (entrée 8) ou stériquement encombrées (entrée 7), les auteurs n'ont cependant pas pu obtenir les produits attendus.

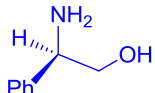
III.3.4.1.2 Réaction de Zincke par activation micro-onde

Vianna *et al.* ont décrit la synthèse de sels de pyridinium **B29** par la réaction de Zincke sous activation micro-ondes, en utilisant pour cela un four à micro-ondes domestique (Tableau 22).¹⁹²⁻¹⁹⁴

Tableau 22 : Synthèse de sels de pyridiniums chiraux B29. Activation thermique vs activation micro-ondes.¹⁹³⁻¹⁹⁴



Entrée	Sel de Zincke	B28	Rendement (%)	
			Activation Thermique (15 h)	Activation Micro-ondes (10 min)
1	R ¹ = CH ₃ , R ² = H		85	91
2	R ¹ = CH ₃ , R ² = H		68	72
3	R ¹ = CH ₃ , R ² = H		29	57
4	R ¹ = CH ₃ , R ² = H		100	100
5	R ¹ = CH ₃ , R ² = H		49	98
6	R ¹ = CH ₃ , R ² = H		65	98
7	R ¹ = CH ₃ , R ² = H		72	98

8	$R^1 = R^2 = H$		92	93
9	$R^1 = R^2 = CH_3$		80	98
10	$R^1 = R^2 = H$		70	67
11	$R^1 = Et, R^2 = H$		75	86

Ce mode d'activation a permis de réduire considérablement le temps de réaction, passant de 15 heures en activation thermique à seulement 10 minutes en activation micro-ondes. Par ailleurs, il a conduit à l'obtention des produits avec de meilleurs rendements isolés, particulièrement dans le cas du 2-aminopropane-1,3-diol où le rendement passe de 49 à 98 % (entrée 5). Enfin, les auteurs ont constaté une racémisation nettement plus faible, probablement due à un temps de chauffe considérablement réduit. L'activation micro-onde de la réaction de Zincke apparaît donc comme une méthode de choix pour procéder à la transformation d'amines primaires peu réactives. Elle présente en outre l'avantage de limiter les temps de réaction et d'augmenter les rendements par rapport à l'activation thermique classique.

III.3.4.2 Résultats et discussion

Afin de surmonter le manque de réactivité précédemment rapporté et rencontré avec certaines des anilines que nous souhaitions transformer, l'activation micro-onde nous a semblé être une méthode appropriée pour obtenir les sels de pyridinium correspondants.

III.3.4.2.1 Etude de stabilité du sel de Zincke

L'activation micro-onde permettant d'atteindre des températures très élevées, une étude de stabilité a été menée sur le sel de Zincke **1**. Pour ce faire, après dissolution dans différents solvants, il a été chauffé sous activation micro-onde à 130 et 150 °C, en tube fermé. La dégradation du sel **1** a été mesurée par RMN 1H dans le DMSO- d_6 , en présence de dichloroéthane utilisé comme étalon externe (Tableau 23).

Tableau 23 : Dégradation du sel de Zincke dans différents solvants.

entrée	solvant	dégradation (%) ^a	
		130 °C	150 °C
1	MeCN	95	98
2	<i>i</i> PrOH	50	97
3	EtOH	20	76
4	H ₂ O	0	0

Conditions : activation MO sous pression, 5 min, sel de Zincke1 (0,2 mmol), solvant (1 mL). a: mesurée par RMN ¹H dans le DMSO-d₆ en présence de dichloroéthane comme étalon externe.

En premier lieu, il a été montré que le sel de Zincke **1** disparaissait quasi totalement après 5 min de chauffage dans l'acétonitrile à 130 et 150 °C (entrée 1). Cette disparition s'explique par une réaction en solution de type S_NAr, les ions chlorure venant déplacer le noyaupyridinium du sel de Zincke (en fait, la réaction inverse de la réaction de préparation du sel de Zincke lui-même). Cette réaction d'auto-dégradation a pu être mise en évidence avec la présence dans le milieu (confirmée par RMN ¹H) de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène et de pyridine (Figure 60D).

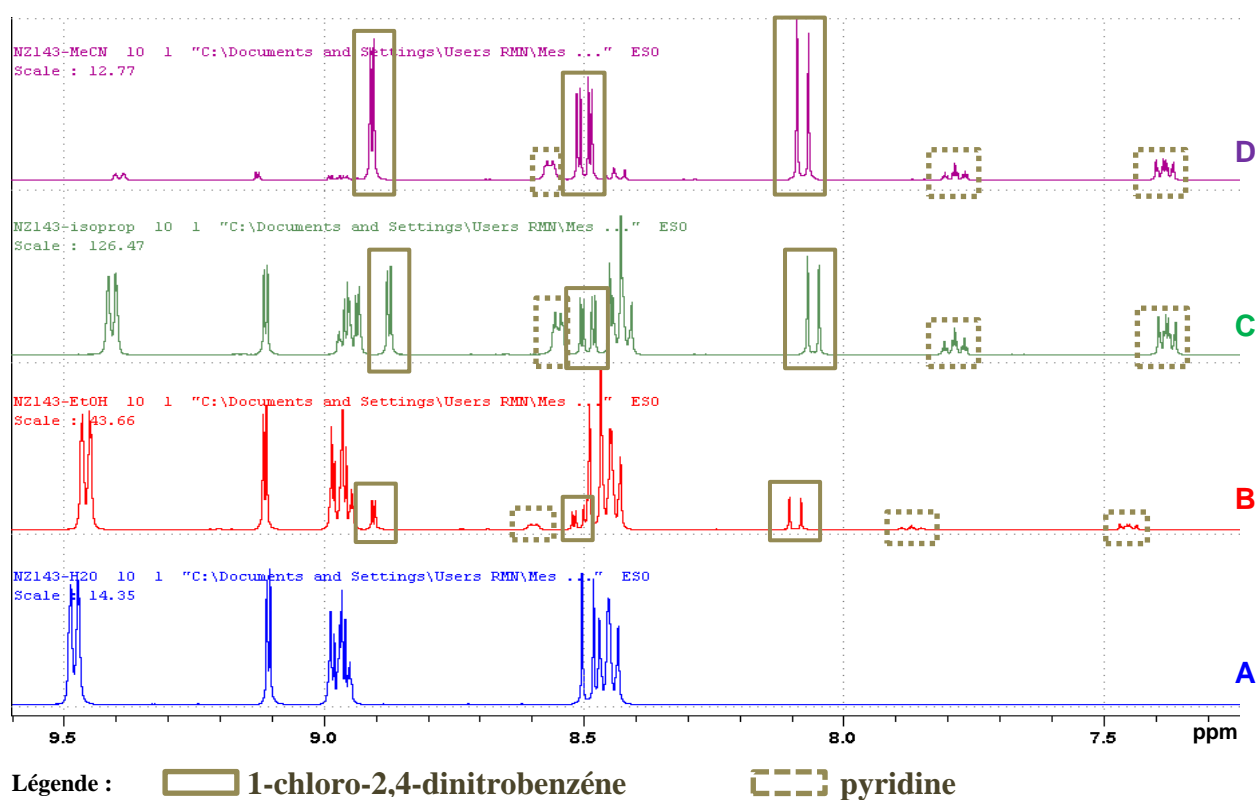


Figure 60 : Spectres RMN ¹H dans le DMSO-d₆ du mélange réactionnel après chauffage au MO du sel de Zincke dans différents solvants (A : H₂O, B : EtOH, C : *i*PrOH, D : MeCN) à 130 °C pendant 5 min.

Il convient de préciser que cette réaction d'auto-dégradation, consécutive de l'attaque nucléophile des ions chlorure, a déjà été mentionnée dans la littérature. La parade qui avait alors été trouvée consistait à remplacer par métathèse de sels, les ions chlorure par des anions non nucléophiles, en l'occurrence des sulfates d'alkyle.²⁰³

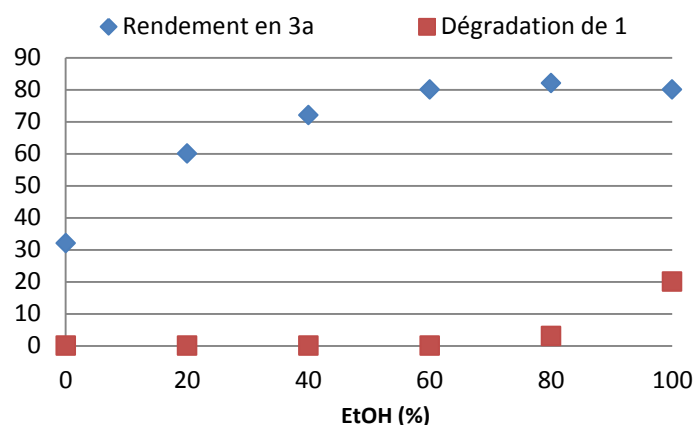
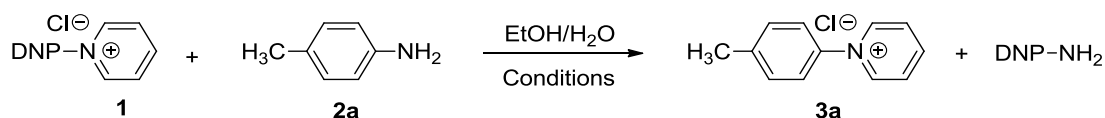
Par la suite, cette étude de stabilité a montré que les solvants organiques protiques tels que les alcools, du fait de leur capacité à solvater les ions chlorures, étaient capables de minimiser cette réaction d'auto-dégradation. Très logiquement, cette dégradation était d'autant plus limitée que la capacité du solvant à solvater les ions chlorure était grande. Ainsi, plus acide que l'isopropanol, l'éthanol s'est également révélé plus efficace pour préserver le sel de Zincke **1** (Tableau 23 : entrées 2 et 3 ; Figure 60B et 60C). De même, l'augmentation de l'agitation moléculaire liée à l'élévation de la température du milieu, en minimisant l'effet de solvation a eu pour effet d'accroître significativement la dégradation du sel **1**. A ce stade, il convient de rappeler que les solvants généralement utilisés pour la réaction de Zincke sont des alcools en C1-C5, typiquement l'éthanol ou le butanol. Le fait que d'excellents rendements puissent être néanmoins obtenus avec ce type de solvant semble indiquer qu'en présence d'amines primaires suffisamment nucléophiles (typiquement les amines aliphatiques), cette réaction d'auto-dégradation possiblement concurrente de celle attendue, reste en réalité limitée, même sous activation micro-ondes.¹⁹²

Envisageant l'eau comme solvant, nous avons pu constater que dans ce milieu, le sel de Zincke **1** restait intact après 5 min de chauffage, à 130 comme à 150 °C (Tableau 23 : entrée 4 ; Figure 60A). Il convient de préciser que si le recours à l'eau en tant que solvant pour la réaction de Zincke a déjà été décrit et notamment sous activation micro-onde, son rôle protecteur par effet de solvation des ions chlorures n'a à notre connaissance jamais été démontré, ni même seulement évoqué.¹⁹³ Il est à noter que les auteurs avaient alors obtenus des rendements plus faibles qu'en activation thermique classique, probablement par manque de solubilité des amines primaires engagées dans la réaction. Malheureusement, nous nous sommes heurtés aux mêmes difficultés et la lipophilie de certaines amines primaires a rendu impossible l'utilisation de l'eau seule comme solvant de réaction.

III.3.4.2.2 Optimisation du mélange binaire EtOH/H₂O

Envisageant logiquement le recours à un mélange binaire EtOH/H₂O, nous nous sommes attachés à déterminer la proportion optimale de ces deux co-solvants pour une mise en œuvre efficace de la réaction de Zincke. L'optimisation du mélange binaire EtOH/H₂O a été menée

sous micro-onde et en tube fermé, sur une réaction modèle entre le sel de Zincke **1** et la *p*-toluidine **2a**, cette dernière ayant été précisément choisie pour son caractère lipophile. Les rendements en produit attendu ainsi que l'auto-dégradation du sel de de Zincke **1**, ont été mesurés après 5 minutes de réaction par RMN ^1H , dans le DMSO- d_6 en présence de fumarate de diéthyle utilisé comme étalon externe (Figure 61).



Conditions : activation MO (150 °C, sous pression), 5 min, sel de Zincke **1**(0,2 mmol), **2a** (2 éq.), solvant (1 mL). Le rendement en **3a** et la dégradation de **1** ont été mesurés par RMN ^1H dans le DMSO- d_6 en présence de fumarate de diéthyle comme étalon externe.

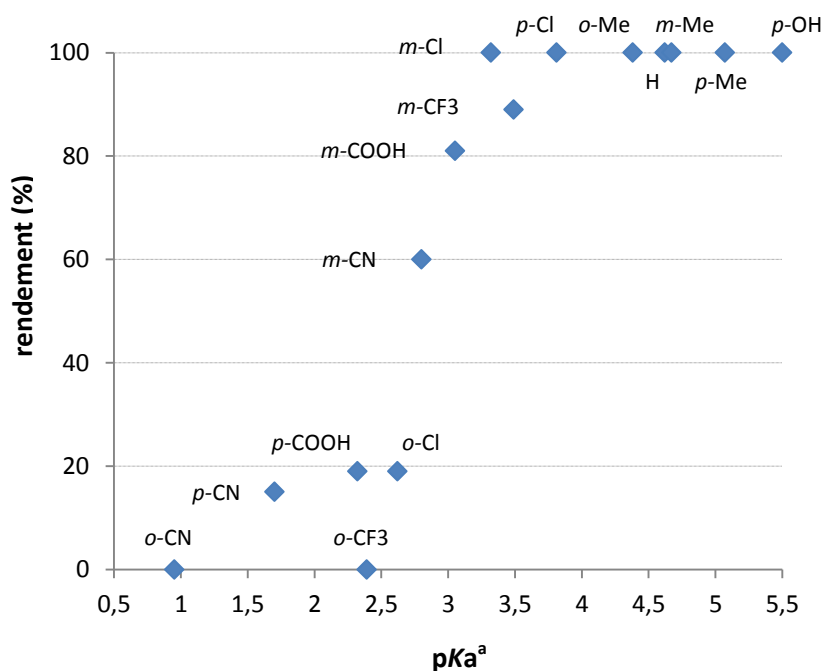
Figure 61 : Rendement en 3a et dégradation de 1 en fonction de la composition du mélange binaire EtOH/H₂O

Cette étude a permis de mettre en évidence le fait que l'utilisation de l'eau seule comme solvant de réaction, tout en permettant certes la préservation du sel de Zincke **1**, conduisait néanmoins à l'obtention du sel attendu **3a** avec un rendement médiocre de 32 %. Le manque de solubilité de l'aniline **2a** dans le milieu réactionnel explique vraisemblablement ce résultat. De fait, l'addition d'éthanol a permis d'améliorer considérablement les rendements tout en limitant l'auto-dégradation du sel de Zincke. De cette étude, il est ainsi ressorti qu'un mélange binaire EtOH/H₂O en proportion respective 60/40 constituait le solvant optimal pour mener à bien nos réactions de Zincke.

III.3.4.2.3 Réactivité des anilines

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'autre partenaire de la réaction, en l'occurrence dans notre cas, au dérivé de l'aniline **2** engagé comme amine primaire. En particulier, il nous a semblé intéressant d'identifier les paramètres permettant de classer ces composés en

fonction de leur réactivité vis-à-vis du sel de Zincke **1**. Pour ce faire, une série d'anilines monosubstituées et diversement fonctionnalisées a été engagée dans des réactions de Zincke, sous activation thermique conventionnelle à 80 °C pendant 96 h, dans un mélange binaire EtOH/H₂O (60/40). Les rendements ont été mesurés par RMN ¹H dans le DMSO-d₆ en présence de fumarate de diéthyle utilisé comme étalon externe (Figure 62).



Conditions : Activation thermique (80 °C), 96 h, sel de Zincke **1** (0,2 mmol), dérivés d'aniline **2** (2 éq.), EtOH/H₂O : 60/40 (1 mL). Valeurs pK_a, voir réf. : [232](#), [233](#), [234](#) et [235](#). a : pK_a de l'acide conjugué de l'aniline considérée.

Figure 62 : Variation du rendement de la réaction de Zincke en fonction du pK_a des anilines.

Cette étude a permis de mettre en évidence une bonne corrélation entre le rendement de la réaction et le pK_a de l'acide conjugué de l'aniline considérée. Ainsi, les composés dont le pK_a est supérieur à 3,81 ont donné dans nos conditions, des rendements quantitatifs en sels attendus. A l'inverse, les anilines dont l'acide conjugué possède un pK_a inférieur à 2,62, caractérisées par une désactivation électronique de l'atome d'azote éventuellement associée à un encombrement stérique, ont donné des rendements faibles, de l'ordre de 20 % maximum,

²³² JM Vandebelt, C Henrich, SG Vansenberg. Comparison of pK_a' values determined by electrometric titration and ultraviolet absorption methods. *Anal Chem* 1954; **26**: 726-7.

²³³ HC Brown, DH McDaniel, O Hafliger. Determination of organic structures by physical methods, eds. EA Braude, FC Nachod. Academic Press, New York, 1955, vol. 1, ch. 14, pp. 567-662.

²³⁴ O Pytela, M Otyepka, J Kulhanek, E Otyepkova, T Nevecna. Correlation of dissociation constants of 2- and 2,6-substituted anilines in water by methods based on the similarity principle and quantum-chemistry calculations. *J Phys Chem A* 2003; **107**: 11489-96.

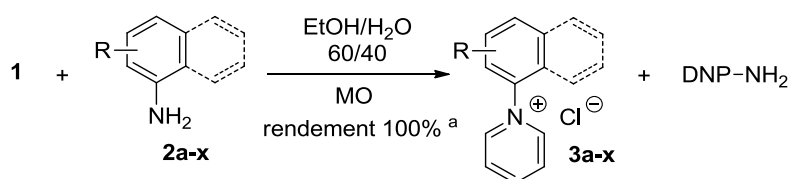
²³⁵ AM Grana, JM Hermida-Ramon, RA Mosquera. QTAIM interpretation of the basicity of substituted anilines. *Chem Phys Lett* 2005; **412**: 106-9.

voire nuls (*o*-CN et *o*-CF₃). Il convient de préciser que lorsque les conversions étaient nulles ou incomplètes, la quantité de produits de départ n'ayant pas réagi a pu être mesurée par RMN. Ces quantités mesurées se sont révélées conformes à celles attendues, confirmant ainsi l'absence de réaction compétitive de dégradation.

III.3.4.2.4 Mise en œuvre de la réaction de Zincke sous activation micro-onde

Une série de dérivés de l'aniline **2** a été mise à réagir par activation micro-onde et sous pression avec le sel de Zincke **1**, dans un mélange binaire EtOH/H₂O (60/40). Trois protocoles différents ont été mis au point selon le p*K*_a de l'acide conjugué de l'amine primaire utilisée. Le suivi des réactions a été réalisé par RMN ¹H dans le DMSO-d₆, en présence de fumarate de diéthyle utilisé comme étalon externe. Afin d'éviter l'obtention de mélange de sels, les temps de réaction ont été adaptés de telle sorte que les rendements en produit attendu **3** soient quantitatifs (Tableau 24).

Tableau 24 : Réactions optimisées de transannélation entre le sel de Zincke et les dérivés d'aniline.



Entrée	p <i>K</i> _a	R	Aniline	Protocole	Durée (min)	Rendement isolé (%)
1	0,95 ²³²	<i>o</i> -CN	2j	A	60	84
2	1,70 ²³⁵	<i>p</i> -CN	2k	A	60	88
3	2,19 ²³²	<i>p</i> -COMe	2l	A	60	84
4	2,32 ²³³	<i>p</i> -COOH	2m	B	60	38
5 ^b	2,39 ²³⁴	<i>o</i> -CF ₃	2i	A	60	8[16] ^e
6 ^c	2,57 ²³³	<i>p</i> -CF ₃	2n	A	60	34[77] ^e
7	2,62 ²³³	<i>o</i> -Cl	2h	A	75	84
8	2,80 ²³⁵	<i>m</i> -CN	2o	B	60	100
9	3,05 ²³³	<i>m</i> -COOH	2p	B	60	78
10	3,20 ²³⁶	<i>o</i> -F	2q	A	60	90
11	3,32 ²³³	<i>m</i> -Cl	2c	B	40	91
12	3,49 ²³³	<i>m</i> -CF ₃	2r	B	60	73

²³⁶Biggs AI, Robinson RA. Ionisation constants of some substituted anilines and phenols - A test of hammett relation. *J Chem Soc* 1961; 388-93.

13	nd	<i>p</i> -CONH ₂	2s	B	60	80
14	nd	<i>m</i> -CONH ₂	2t	B	20	64
15	3,81 ²³³	<i>p</i> -Cl	2d	C	30	93
16	3,92 ²³³	1-naphtyle	2u	B	20	70
17 ^d	4,17 ²³³	<i>m</i> -OH	2f	C	40	63[84] ^e
18	4,38 ²³³	<i>o</i> -Me	2v	C	15	94
19	4,49 ²³³	<i>o</i> -OMe	2w	C	30	80
20	4,62 ²³³	H	2b	C	20	100
21	4,67 ²³³	<i>m</i> -Me	2x	C	20	95
22 ^d	4,72 ²³³	<i>o</i> -OH	2e	C	30	31[77] ^e
23	5,07 ²³³	<i>p</i> -Me	2a	C	15	96
24	5,50 ²³³	<i>p</i> -OH	2g	C	20	63

Conditions : sel de Zincke **1** (0,2 mmol), EtOH/H₂O : 60/40 (1 mL), sous pression. Méthode A : 150 °C, **2** (12 éq.). Méthode B : 150 °C, **2** (3 éq.). Méthode C : 130 °C, **2** (1,2-2 éq.). a : rendement mesuré par RMN ¹H dans le DMSO-d₆ en présence de fumarate de diéthyl utilisé comme étalon externe. b : réaction conduite dans un mélange EtOH/H₂O 80/20, sel **3i** obtenu avec un rendement de 50 % (décomposition partielle du sel de Zincke **1**). c : réaction conduite dans l'EtOH, 150 °C, **1** (6 éq.), sel **3n** obtenu avec un rendement de 44 % (décomposition partielle du sel de Zincke **1**). d : sels **3e** et **3f** obtenus avec des rendements respectifs de 40 et 85 % (en mélange avec sous-produit(s) à hauteur de 60 et 15 %). e : rendement corrigé.

A l'exception de l'acide *para*-aminobenzoïque (entrée 4), les réactions impliquant les anilines dont les acides conjugués ont un p*K*_a inférieur à 2,62 requièrent l'utilisation du protocole A (entrées 1-3, 5-7). Ce protocole permettant d'obtenir quantitativement les sels attendus **3** est caractérisé par l'utilisation d'un large excès d'aniline (12 équivalents vs. sel de Zincke **1**) et un chauffage prolongé (60-75 min) à 150 °C. Dans cette série, nos efforts pour réduire le nombre d'équivalents d'aniline engagés en réaction, tout en conservant un temps de chauffage raisonnable, sont malheureusement restés infructueux. Il est possible qu'une faible différence de nucléophilie entre ces dérivés de l'aniline et la 2,4-dinitroaniline libérée au cours de la réaction soit à l'origine de l'instauration en solution d'un équilibre que seul un tel excès permet de déplacer totalement.

De plus, la 4'-aminoacétophenone **2l** (*p*-COMe) qui s'est révélée totalement non réactive sous activation conventionnelle,¹⁹⁸ a été convertie avec succès en sel de pyridinium **3l** (entrée 3). Il convient par ailleurs de noter que du fait de leur lipophilie, les anilines **2i** (*o*-CF₃) et **2n** (*p*-CF₃) se sont révélées peu solubles dans le mélange binaire EtOH/H₂O (60/40) utilisé. Pour cette raison, un mélange enrichi en éthanol 80/20 a été utilisé pour l'aniline **2i**. S'agissant de l'aniline **2n** en revanche aucun mélange binaire EtOH/H₂O ne nous a permis d'obtenir une solubilisation satisfaisante, raison pour laquelle la réaction a été menée dans l'éthanol pur.

Cette proportion moindre voire nulle d'eau s'est traduite par une décomposition partielle du sel de Zincke **1** en 1-chloro-2,4-dinitrobenzène et un rendement de seulement 86 % pour la préparation du sel **3i** (entrée 5) et 44 % pour le sel **3n** (entrée 6).

Pour les anilines dont les acides conjugués ont un pK_a compris entre 2,80 et 3,81, à l'exception de l'aniline **2q** (entrée 10), leur utilisation à hauteur de 3 équivalents par rapport au sel de Zincke à 150 °C, a suffi pour obtenir quantitativement les sels attendus (entrées 8-12). Il est à noter que c'est par cette méthode que les anilines **2s** (*p*-CONH₂) et **2t** (*m*-CONH₂), dont le pK_a des acides conjugués n'est pas mentionné dans la littérature, ont conduit aux sels correspondants **3s-t** (entrées 13-14).

Enfin, les anilines dont les acides conjugués ont un pK_a supérieur à 3,81 ont conduit quantitativement aux sels attendus et ce, en ayant recours à des excès limités en aniline de départ, à une température de réaction abaissée à 130 °C et après des temps de réaction ne dépassant pas les 40 minutes (entrées 15, 17-24). Il est à noter que malgré un pK_a de 3,92, la 1-naphtylamine **2u** a été quantitativement convertie en sel de pyridinium **3u** par le protocole B (entrée 16) établi pour les anilines moins réactives (entrées 8-12). Ceci est en accord avec une étude précédente montrant l'absence totale de réactivité de ce substrat sous activation ultrasonique (Tableau 21, entrée 7).²³¹ Ce comportement, probablement expliqué par un encombrement stérique du groupement naphyle, illustre les limites au fait de ne considérer que le pK_a pour anticiper la réactivité des amines primaires engagées dans la réaction de Zincke.

III.3.4.2.5 Régiosélectivité de la réaction et réactions secondaires

Il est à noter que dans le cas des aminophénols **2e** (*o*-OH) et **2f** (*m*-OH), la formation de produits secondaires (parmi lesquels la pyridine, reconnaissable à son odeur caractéristique) a conduit à l'obtention des sels correspondants **3e** et **3f** avec des rendements respectifs de 40 et 85 % (entrées 17 et 22). De même, la transformation de l'aniline **2y** (*o*-CONH₂) à 150 °C pendant une heure dans un mélange EtOH/H₂O (60/40), s'est accompagnée de la formation à hauteur de 15 % d'un produit secondaire dont l'élucidation structurale va maintenant être présentée.

III.3.4.2.5.1 Elucidation structurale d'un sous-produit de la réaction de Zincke

Nous avons pu isoler le produit secondaire de la réaction entre le sel de Zincke **1** et l'aniline **2y** (*o*-CONH₂). Les analyses LC-MS et HRMS nous ont conduits vers la formule brute C₁₃H₁₀N₄O₅. Deux structures répondant à cette formule brute et correspondant à des produits de S_NAr sur le sel de Zincke **1** ont été proposées (Figure 63). Il s'agit en l'occurrence des produits de S_NAr **5y** et **5y'** issus de l'attaque nucléophile respectivement de la fonction amine ou de la fonction amide de l'aniline **2y**.

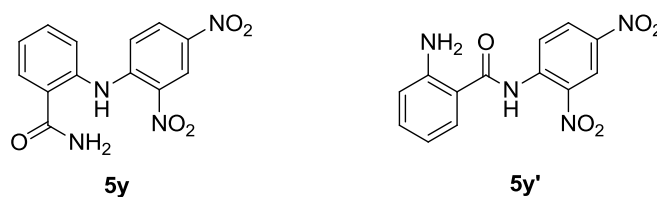


Figure 63 : Structures chimiques possibles du sous-produit formé lors de la réaction entre le sel de Zincke **1 et la 2-aminobenzamide **2y**.**

Une analyse rapide du spectre HSQC ¹H/¹³C (Figure 64) montre la présence de trois hydrogènes acides (flèches rouges), c'est-à-dire non portés par un carbone.

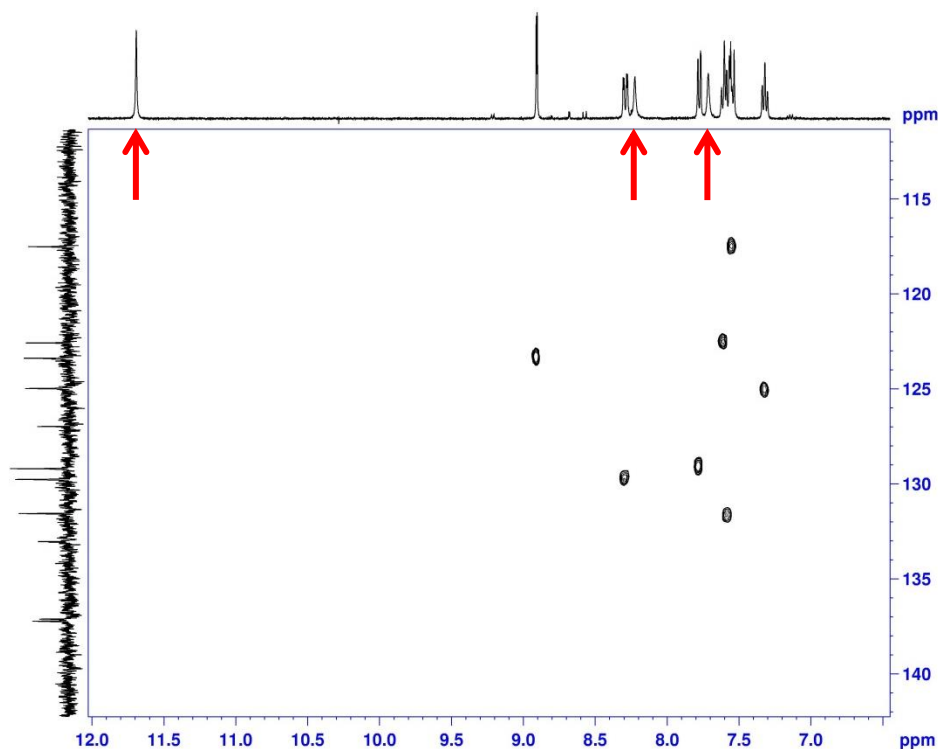


Figure 64 : Spectre HSQC ¹H/¹³C du produit secondaire formé lors de la réaction entre le sel de Zincke **1 et la 2-aminobenzamide **2y**.**

L'analyse du spectre HSQC ¹H/¹⁵N (Figure 65) nous indique que deux de ces hydrogènes sont diastérotopes c'est-à-dire, bien que portés par le même atome d'azote mais du fait d'un

environnement chimique différent, présentent des déplacements chimiques également différents en RMN ^1H (7,71 et 8,22 ppm).

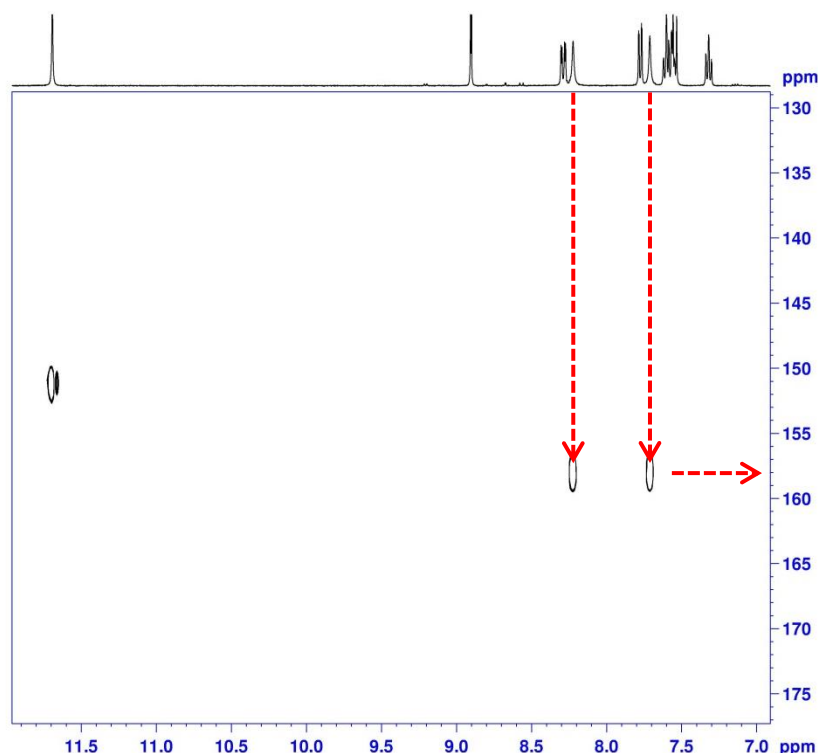


Figure 65 : Spectre HSQC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ du produit secondaire formé lors de la réaction entre le sel de Zincke **1 et la 2-aminobenzamide **2y**.**

Les hydrogènes portés par la fonction amide étant les seuls à pouvoir être diastéréotopes, la structure de type diarylamine **5y** a donc été retenue comme étant celle du produit secondaire formé au cours de la réaction. Le spectre RMN ^1H de ce composé, par ailleurs décrit dans la littérature, nous a permis de confirmer cette étude.²³⁷

III.3.4.2.5.2 Formation du produit secondaire

Nous nous sommes ensuite intéressés à la réaction conduisant à l'obtention de la diarylamine **5y**. Au vu des réactifs présents dans le milieu, trois réactions de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ impliquant à chaque fois le groupement amino de l'aniline **2y** peuvent être envisagées pour expliquer la formation de ce sous-produit.

La première, bien que très peu probable, suppose l'attaque nucléophile de ce groupement amino sur le chlorodinitrobenzène, lequel se serait formé au cours de la réaction (de manière

²³⁷ Specs Research Laboratory (Spectral data were obtained from Advanced Chemistry Development, Inc.)

résiduelle et en dépit du solvant binaire EtOH/H₂O), par dégradation du sel de Zincke **1** (Figure 66).

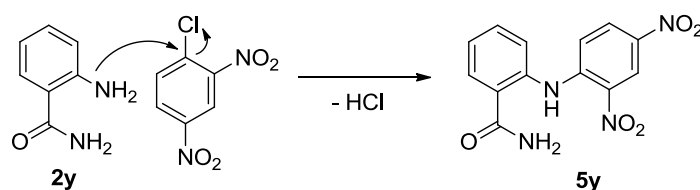


Figure 66 : Première hypothèse de réaction expliquant la formation de la diarylamine 5y.

Cette première hypothèse a très vite été écartée dès lors qu'aucune réaction n'a été constatée entre le chlorodinitrobenzène et l'aniline **2y**, mis tous deux à réagir dans des conditions similaires.

La seconde hypothèse suppose deux réactions de S_NAr successives (Figure 67) : la première (1) serait l'attaque en *ipso* du groupement amide sur le sel de Zincke **1**, favorisée par activation du groupement amino en position *ortho*. Puis dans une seconde étape (2), la formation de la diarylamine **5y** se ferait suivant une réaction de S_NAr intramoléculaire impliquant le groupement amino.^{168,238}

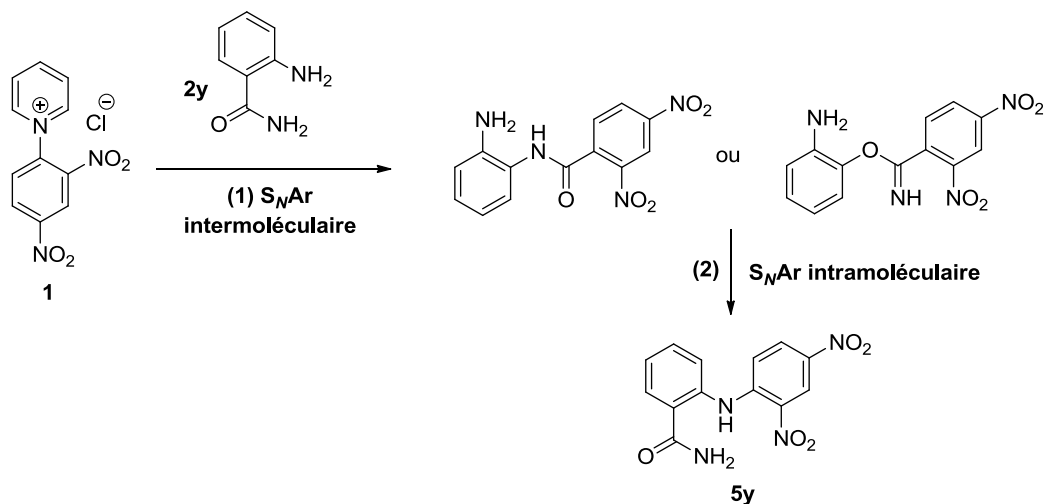


Figure 67 : Deuxième hypothèse de réaction expliquant la formation de la diarylamine 5y.

Suivant cette hypothèse, l'aniline **2s** (*p*-CONH₂) devrait, logiquement, suivre le même mécanisme réactionnel conduisant à la formation de l'intermédiaire issue de la réaction de

²³⁸Katritzky AR, Awartani R. Nucleophilic displacements of *N*-Aryl and heteroaryl groups. Part 5. Conversion of 2-aminopyridines into 2-pyridones. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1983; 2623-7.

S_NAr intermoléculaire, la réaction de S_NAr intramoléculaire n'étant pas envisageable pour cette aniline *para*-substituée. Néanmoins, l'aniline **2s** a conduit quantitativement à la formation du produit **3s**. Ainsi, cette hypothèse semble très peu probable.

La troisième hypothèse suggère l'attaque du groupement amino de l'aniline **2y** sur le sel de Zincke **1** lui-même, non sur le cycle pyridinium comme attendu mais en position *ipso*, suivant donc en cela, une régiosélectivité inhabituelle (Figure 68).

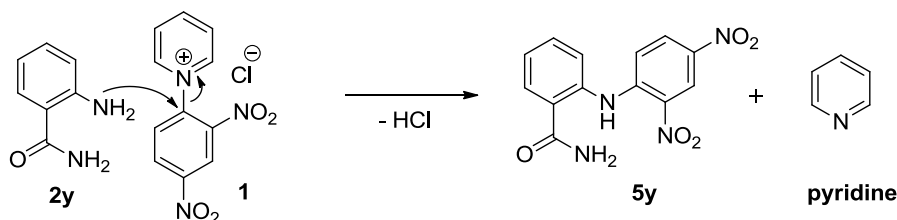
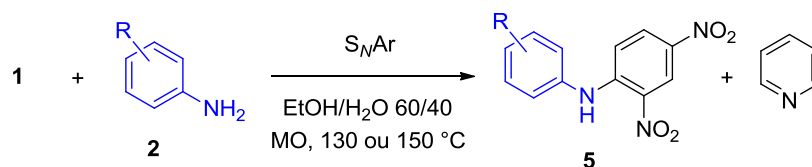


Figure 68 : Formation de la diarylamine **5y** par réaction de S_NAr entre le sel de Zincke **1** et la 2-aminobenzamide **2y**.

Par analogie, il semble raisonnable d'envisager le même type de réaction secondaire dans le cas des aminophénols **2e** (*o*-OH) et **2f** (*m*-OH), lesquels conduiraient aux diarylamines **5e** et **5f** (Tableau 25) et à la libération concomitante de pyridine, dont l'odeur caractéristique avait été également notée.

Tableau 25 : Variation du rendement en diarylamine en fonction du type de substitution de l'aniline **2**.



entrée	aniline	R	Rendement estimé de 5 (%) ^a
1	2e	<i>o</i> -OH	60
2	2f	<i>m</i> -OH	15
3	2g	<i>p</i> -OH	0
4	2y	<i>o</i> -CONH ₂	15
5	2t	<i>m</i> -CONH ₂	0
6	2s	<i>p</i> -CONH ₂	0

a : rendement en sel **3** mesuré par RMN ¹H dans le DMSO-d₆ en présence de fumarate de diéthyl utilisé comme étalon externe. Le rendement estimé en diarylamine **5** correspond à la différence entre la quantité de sel de Zincke **1** introduite et celle de pyridinium **3** formé.

III.3.4.2.5.3 Discussion sur la régiosélectivité de la réaction

Nous avons proposé que la formation des produits **5** résultait d'une réaction de type S_NAr , compétitive de celle attendue. Au lieu de s'additionner sur le noyau pyridinium ainsi que le requiert le processus de $S_N(ANRORC)$, l'aniline le substituerait, consécutivement à une attaque de la position *ipso* du sel de Zincke **1**. Dans la mesure où :

- (i) cette réaction de S_NAr n'a été constatée que pour des anilines dont le substituant est porteur d'hydrogènes acides (**2e**, **2f** et **2y**),
- (ii) le rendement de cette réaction de S_NAr semble dépendant du mode de substitution de l'aniline utilisée (Tableau 25, entrées 1, 2 et 3),
- (iii) la réaction entre l'aniline **2w** (*o*-OMe) et le sel de Zincke **1** conduit quantitativement au sel de pyridinium **3w** sans qu'aucune réaction secondaire n'ait lieu (Tableau 24, entrée 18),

il semble qu'un possible effet directeur, par liaison hydrogène intermoléculaire entre la fonction porteuse de l'hydrogène acide et le groupement nitro du sel de Zincke **1** soit à l'origine de la régiosélectivité inattendue constatée pour les composés **2e**, **2f** et **2y**.

Quand une telle interaction est possible au moment de l'attaque nucléophile de l'atome d'azote, celui-ci serait dirigé vers le carbone quaternaire du sel de Zincke **1**, engageant alors le processus de S_NAr . En l'absence d'une telle interaction, l'atome d'azote suivrait une approche classique, engageant alors un processus de $S_N(ANRORC)$.

Nous pouvons noter que, puisque la réaction entre l'aniline **2w** (*o*-OMe) et le sel de Zincke **1** n'entraîne pas la formation de produits secondaires, cet effet orienteur constaté pour les aminophénols **2e** (*o*-OH) et **2f** (*m*-OH) pourrait être annulé par la protection des fonctions alcool. Dans ce sens, le groupement hydroxyle de l'aminophénol **2e** a ainsi été préalablement protégé par un groupement triéthylsilyle (Figure 69) avant d'être engagé en réaction avec le sel de Zincke **1**. Malheureusement, ce groupement protecteur s'est révélé insuffisamment robuste, les conditions opératoires conduisant à son départ et à la libération du groupe hydroxyle.

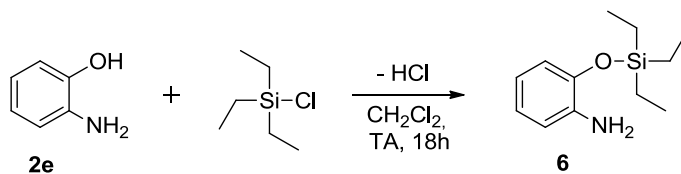
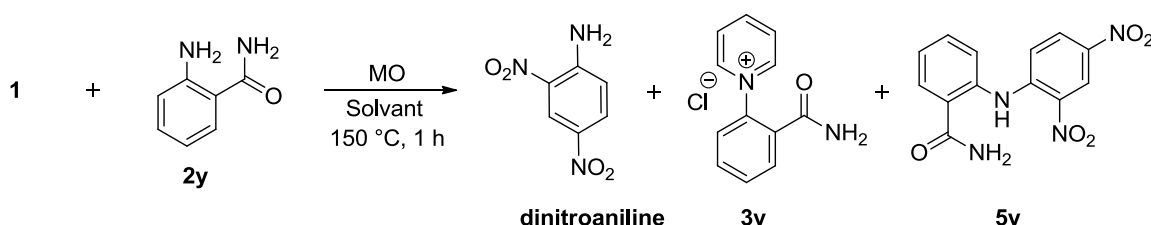


Figure 69 : Protection du groupement hydroxyle de l'aminophénol **2e par le chlorure de triéthylsilane.**

III.3.4.2.5.4 Influence de l'eau sur la régiosélectivité

Dans la suite de cette étude, nous nous sommes attachés à déterminer si la présence d'eau dans le milieu pouvait ou non influencer la régiosélectivité de la réaction. Pour cela, la réaction entre l'aniline **2y** (*o*-CONH₂) et le sel de Zincke **1** a été conduite sous activation micro-ondes, à 150 °C pendant une heure, dans trois milieux différents : dans l'éthanol pur, dans un mélange EtOH/H₂O (60/40) et dans l'eau (Tableau 26).

Tableau 26 : Influence de l'eau sur la formation de **5y et sur la dégradation de **3y**.**



entrée	Solvant	dinitroaniline (%)	3y (%)	5y (%)
1	EtOH	56	8	44
2	EtOH/H ₂ O (60/40)	85	40	15
3	H ₂ O	85	65	15

Il est à noter que lors de l'exploitation de ces résultats, la dinitroaniline a été considérée comme l'indicateur d'une réaction de Zincke authentiquement survenue. Les différences de proportions constatées entre la dinitroaniline et le sel **3y** (pourtant sensées être les mêmes) ont été attribuées à la dégradation du sel survenue dans le milieu réactionnel, ultérieurement à la réaction de Zincke. Les proportions de chaque constituant des mélanges obtenus ont été estimées par RMN ¹H.

De cette étude, il ressort que la présence d'eau permet de diminuer sensiblement la formation de la diarylamine **5y**. En effet, le rapport dinitroaniline/**5y** passe de 56/44 dans l'éthanol (entrée 1) à 85/15 en présence d'eau (entrées 2 et 3). Une explication plausible à ce phénomène serait la meilleure solvataion du groupement aminocarbonyle par l'eau, empêchant ainsi l'interaction intermoléculaire par liaison hydrogène entre l'aniline **2y** et le sel de Zincke **1** et défavorisant par la même occasion, le processus de S_NAr qui en découle. Il convient de noter par ailleurs, que l'utilisation de l'eau comme solvant ou co-solvant de réaction semble minimiser la réaction de dégradation du sel **3y**, puisque le rapport dinitroaniline/**3y** passe de 56/8 dans l'éthanol (entrée 1) à 85/65 dans l'eau (entrée 3).

Chapitre II : Préparation des *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés

I. Préparation des *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés par la réaction de Zincke

I.1 Rappels bibliographiques

Bien que la synthèse du dérivé 3-hydroxylé du sel de Zincke **B30** ait été décrite,^{239,240} aucune référence ne semble mentionner son utilisation pour la synthèse de 3-hydroxy-*N*-aryle pyridiniums. Fait intéressant, Vompe et Turitsyna, les premiers auteurs à décrire la préparation de ce dérivé hydroxylé du sel de Zincke, font état de l'instabilité de ce sel lorsqu'il est exposé à un chauffage prolongé ou encore, à un milieu basique.²⁴⁰ Très logiquement, il fut proposé que l'espèce obtenue après ces traitements était la forme zwitterionique correspondante **B31** (Figure 70).

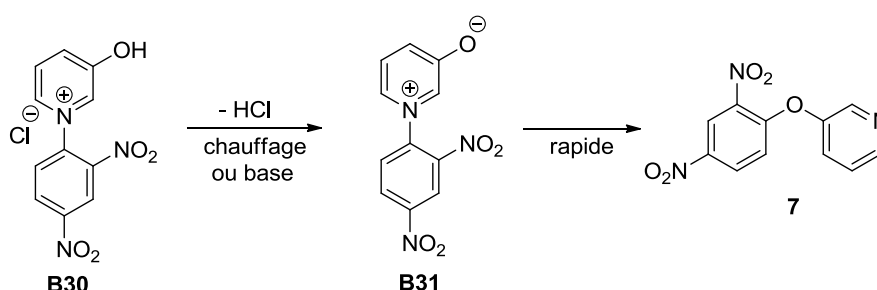


Figure 70 : Formation du diaryléther **7** via la formation du zwitterion **B31** à partir du sel de Zincke **B30**.^{240,241}

²³⁹Vompe AF, Turitsyna NF. K Voprosu O Rasshcheplenii piridinovogo koltsa - Sintez khlordinitrofenilatov zameshchennykh piridinov i ikh vzaimodeistvie s aromatcheskimi aminami. *Doklady Akademii nauk SSSR* 1949; **64**: 341-4.

²⁴⁰Vompe AF, Turitsyna NF. Reaktsii piridiniyevykh solei .2. Vzaimodeistvie s anilinom khlor-2,4-dinitrofenilatov zameshchennykh piridinovykh osnovanii. *Zhur obshchei Khim* 1957; **27**: 3282-90.

En 1974, Katritzky et *al.* démontrent qu'une fois formé, ce zwitterion se réarrange rapidement pour conduire au diaryléther **7** (Figure 70).²⁴¹ Undheim et Hansen démontrent quant à eux que ce réarrangement peut survenir après chauffage du composé **B30** à 120 °C.²⁴² Ainsi, le produit initialement décrit par Vompe et Turitsyna comme étant le zwitterion était en réalité, le diaryléther **7**.

Par ailleurs, Vompe et Turitsyna ont également constaté que la réaction dans l'éthanol entre le dérivé **B30** et l'aniline **2b** conduisait à l'obtention de la diarylamine **B32** correspondante (Figure 71).²⁴⁰

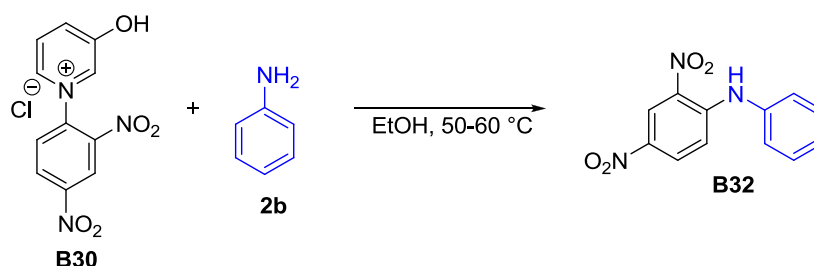


Figure 71 : Formation de la diarylamine **B32 à partir du sel de Zincke 3-hydroxylé **B30** décrit par Vompe et *al.***²⁴⁰

1.2 Résultats et discussion

En faisant réagir le diaryléther **7** avec la *p*-toluidine **2a**, nous avons constaté la formation d'un produit qui a été identifié comme étant la diarylamine **5a** (Figure 72).

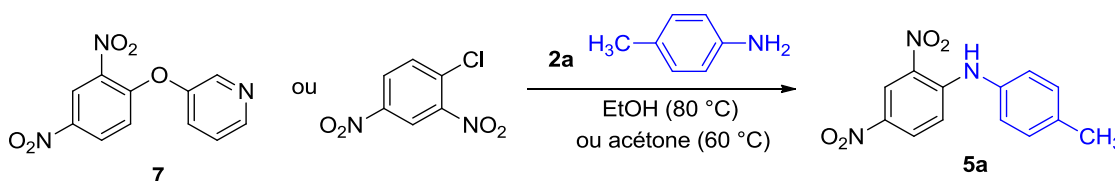


Figure 72 : Formation de la diarylamine **5a à partir diaryléther **7** ou du chlorodinitrobenzène.**

Afin de confirmer cette structure et de lever ainsi toute ambiguïté possible, nous avons mis à réagir l'aniline **2a** avec le chlorodinitrobenzène et avons comparé les temps de rétention en CPG ainsi que les spectres LRMS des produits issus des deux réactions (Figure 73).

²⁴¹Dennis N, Ibrahim B, Katritzky AR, Taulov IG, Takeuchi Y. 1,3-dipolar character of six-membered aromatic rings. Part IX. Rearrangement and addition of 1-(2,4-dinitrophenyl)-3-oxidopyridinium. *J Chem Soc Perkin I* 1974; 1883-5.

²⁴²Undheim K, Hansen PE. Mass spectrometry of onium compounds-XVIII : Evaporation of *N*-arylpyridinium-3-oxides. *Org Mass Spectrometry* 1973; **7**: 635-8.

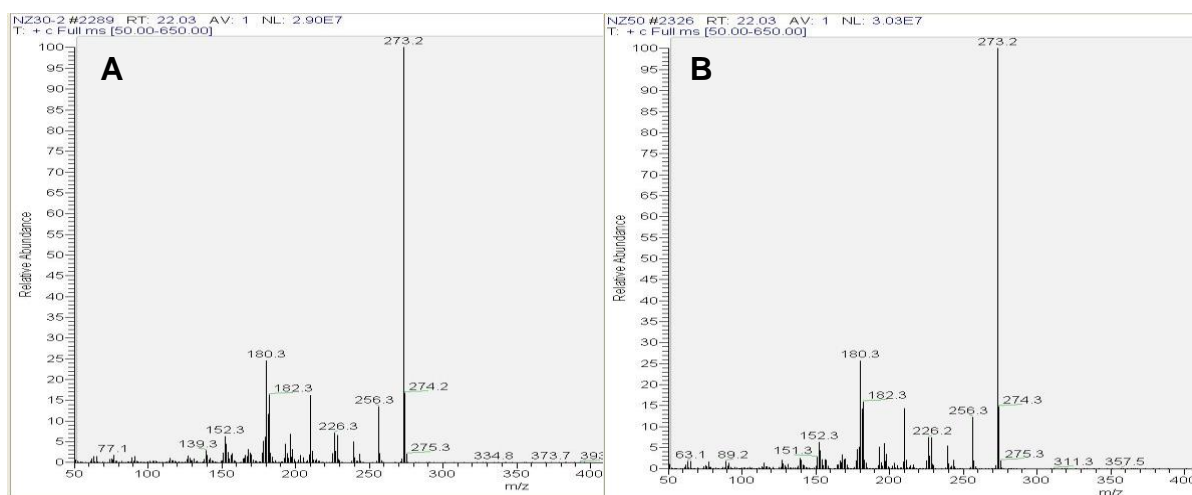


Figure 73 : Spectres de masse (LRMS) des produits de réaction entre l'aniline **2a et le diaryléther **7** (A) ou le chlorodinitrobenzène (B)**

La similitude des temps de rétention ($t_r = 22,03$ min) ainsi que des spectres de masse (Figure 73) ont permis de confirmer la formation au cours des deux réactions de la diarylamine **5a**. Il est par conséquent vraisemblable que la formation de la diarylamine **B32** décrite par Vompe et Turitsyna²⁴⁰ ait été le résultat d'une réaction entre l'aniline et non pas le dérivé hydroxylé du sel de Zincke **B30** mais avec le diaryléther **7**.

Dans le cas de la préparation de la diarylamine **5a** dans l'éthanol par Vompe et Turitsyna, l'on pourra toutefois objecter que la réaction avait été menée en l'absence de base et à des températures relativement faibles (50-60 °C), ce qui ne correspond pas aux conditions définies par Katritsky (milieu basique) ou par Undheim et Hansen (chauffage à 120 °C). Comme nous le verrons par la suite (Cf.III.3.5.2), il est possible qu'en milieu protique, un équilibre pyridinium-zwitterion se crée et soit à l'origine de la formation de la diarylamine **4a**.

Du fait d'une part, de l'instabilité de la forme zwitterionique **B31** (laquelle se forme en milieu protique), et d'autre part, de l'instabilité thermique du sel de Zincke 3-hydroxylé **B30**, lesquelles conduisent à une décomposition en éther **7**, il nous est apparu évident que cette voie d'accès aux 3-hydroxy-*N*-arylepyridiniums par la réaction de Zincke sous activation MO (Cf.Chap.1) n'était clairement pas envisageable.

II. Préparation *one pot* des *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés

II.1 Historique

En 1870, Stenhouse constate que la réaction entre l'aniline **2b**, le chlorure de phényle ammonium et le furfural conduit à la formation d'un produit violet, plus tard appelé sel de Stenhouse.²⁴³ En 1905, Zincke suggère pour ce produit de condensation, une structure **B33** apparentée à celle du sel de König **B8** (Figure 74).²⁴⁴ Cette suggestion sera confirmée plus tard par Williams et Wilson.²⁴⁵

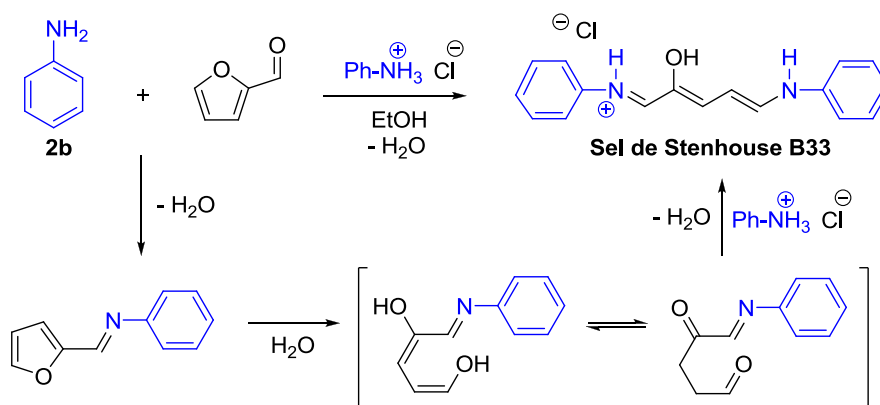


Figure 74 : Mécanisme réactionnel proposé pour la formation du sel de Stenhouse.²⁴⁶

Le mécanisme de formation du sel de Stenhouse **B33** proposé dans la littérature (Figure 74)²⁴⁶ suggère la formation de l'imine consécutivement à l'attaque de l'aniline sur le furfural. Puis, sous l'action d'une molécule d'eau, le noyau furane s'ouvre pour conduire à la formation d'un 1,4-diol qui, par tautomérie céto-énolique, conduit au 1,4-diényl correspondant. Enfin, la réaction entre ce diényl et le phényle ammonium aboutit à la formation du sel de Stenhouse.

En 1905, Zincke démontre que le sel de Stenhouse **B33** peut, sous activation thermique dans un mélange EtOH/acide acétique, se cycliser pour conduire au chlorure de 3-hydroxy-*N*-phénylpyridinium **B34** (Figure 75).²⁴⁴

²⁴³ Stenhouse J. Ueber Furfuranilin und Furfurtoluidin. *Justus Liebigs Ann Chem* 1870; **156**: 197-205.

²⁴⁴ Zincke T, Muhlhausen G. Arylamine derivatives of furfural and its conversion in pyridine compounds. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 1905; **38**: 3824-9.

²⁴⁵ Williams G, Wilson CL. Reactions of furan compounds Part I Constitution of the coloured condensation product from furfural, aniline, and aniline hydrochloride. *J Chem Soc* 1942; 506-7.

²⁴⁶ Foley WMJ, Sanford GE, McKennis HJ. The mechanism of the reaction of aniline with furfural in the presence of acid. *J Am Chem Soc* 1952; **74**: 5789-91.

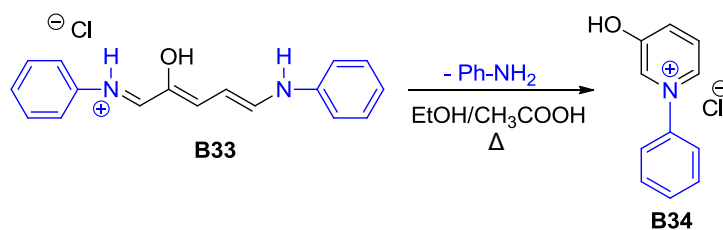


Figure 75 : Synthèse du chlorure de 3-hydroxy-*N*-phénylpyridinium B34 à partir du sel de Stenhouse B33 décrit par Zincke.²⁴⁴

II.2 Synthèse de *N*-aryl pyridiniums 3-hydroxylés

En 1950, s'inspirant des travaux de Zincke, Koelsch et Carney décrivent un protocole *one-pot* de préparation du chlorure de 3-hydroxy-*N*-phénylpyridinium **B34** (Figure 76).²⁴⁷

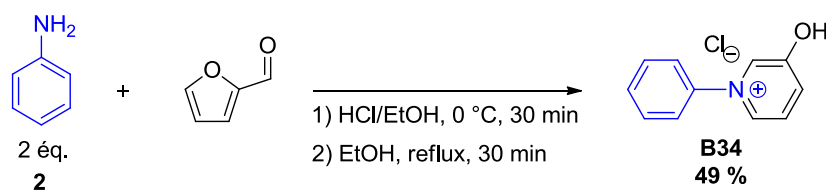
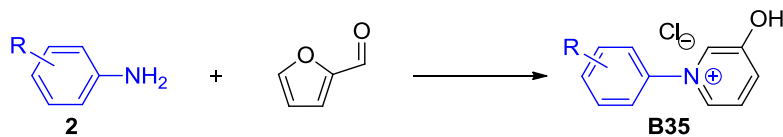


Figure 76 : Préparation *one-pot* du chlorure de 3-hydroxy-*N*-phénylpyridinium B34.²⁴⁷

Pour cela, le furfural est mis à réagir avec deux équivalents d'aniline dans un mélange HCl/EtOH pendant 30 minutes, conduisant à l'obtention du sel de Stenhouse **B33**. Puis, après 30 minutes à reflux dans l'éthanol, le sel de pyridinium **B34** est obtenu avec 49 % de rendement. Plus tard, ce protocole a été appliqué à la synthèse de sels de pyridinium **B35** à partir de dérivés d'aniline diversement fonctionnalisés (Tableau 27).^{242,248}

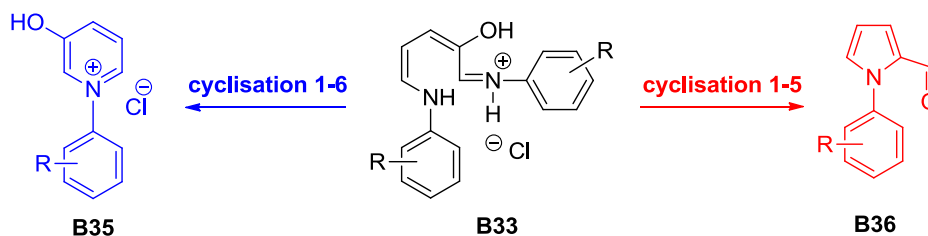
²⁴⁷ Koelsch CF, Carney JJ. Hydrogenation of hydroxyglutaconaldehyde dianil and of 3-hydroxy-1-phenylpyridinium salts. *J Am Chem Soc* 1950; **72**: 2285-6.

²⁴⁸ Ren H, Wu C, Ding X, Chen X, Shi F. Aryne cycloaddition with 3-oxidopyridinium species. *Org Biomol Chem* 2012; **10**: 8975-84.

Tableau 27 : Synthèses *one-pot* de 3-hydroxy-*N*-aryl pyridiniums **B35 décrits dans la littérature.**^{242,248}

Entrée	R	Rendement (%)	Référence
1	<i>p</i> -Cl	---	242
2	<i>p</i> -OMe	---	242
3	<i>p</i> -Me	11	248
4	<i>p</i> -Cl	12	248
5	<i>o</i> -OMe	6	248

Il est important de mentionner que les rendements de synthèse *one-pot* des 3-hydroxy-*N*-arylpyridiniums **B35** sont très faibles (entrées 3-5), alors même que les anilines mises en jeu restent relativement nucléophiles. Un aperçu de la littérature permet d'expliquer, au moins en partie, ces faibles rendements. En effet, il a été rapporté que l'étape de cyclisation était chimiosélective et pouvait conduire soit au pyridinium attendu **B35** (Figure 77, cyclisation 1-6), soit à un dérivé de type pyrrole **B36** (Figure 77, cyclisation 1-5).²⁴⁹

**Figure 77 : Chimiosélectivité de la réaction de cyclisation du sel de Stenhouse **B33** en milieu acide.**²⁴⁹

Par ailleurs, il a été constaté que cette chimiosélectivité était dépendante de la nature du substituant porté par l'aniline de départ (Tableau 28).²⁴⁹

²⁴⁹Lewis KG, Mulquiney CE. Aspects of the formation and use of Stenhouse salts and related compounds. *Tetrahedron* 1977; **33**: 463-75.

Tableau 28 : Rendements isolés en pyridinium B35 (cyclisation 1-6) et en dérivé pyrrole B36 (cyclisation 1-5) selon la nature de l'aniline.²⁴⁹

Entrée	R	B35 (%)	B36 (%)
1	<i>p</i> -CH ₃	60	11
2	H	58	12
3	3-NO ₂ ,4-CH ₃	16	33
4	<i>m</i> -NO ₂	17	37
5	<i>p</i> -NO ₂	0	80

Dans le cas des anilines **2** relativement nucléophiles (entrées 1-2), la réaction de cyclisation conduit majoritairement à la formation du pyridinium **B35**. En revanche, la cyclisation 1-5 est privilégiée dans le cas des anilines peu nucléophiles (entrées 3-5), conduisant à la formation du dérivé pyrrole **B36**.

Du fait de ce problème de chimiosélectivité, et compte tenu des faibles rendements décrits dans la littérature dans le cas d'anilines relativement nucléophiles, il est apparu évident que ce mode opératoire n'était pas adapté à des anilines très désactivées et/ou stériquement encombrées comme pouvaient l'être nos substrats. Nous avons donc décidé de ne pas suivre ce protocole.

III. Préparation des *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés par réaction multi-étapes

III.1 Oxydation de noyaux furanes : rappels bibliographiques

Dans la suite de ce manuscrit, nous limiterons notre propos à l'oxydation de noyaux furane insérés dans un enchainement furane-méthylène-azote, situation permettant en effet l'accès aux 3-hydroxypyridiniums.

III.1.1 Réaction d'Aza-Achmatowicz

III.1.1.1 Rappels sur la réaction d'Achmatowicz

En 1971, Achmatowicz Jr. a montré que les alcools furfuryliques **B37** pouvaient après oxydation par le dibrome dans le méthanol, conduire aux pyranones **B38** correspondantes (Figure 78).²⁵⁰

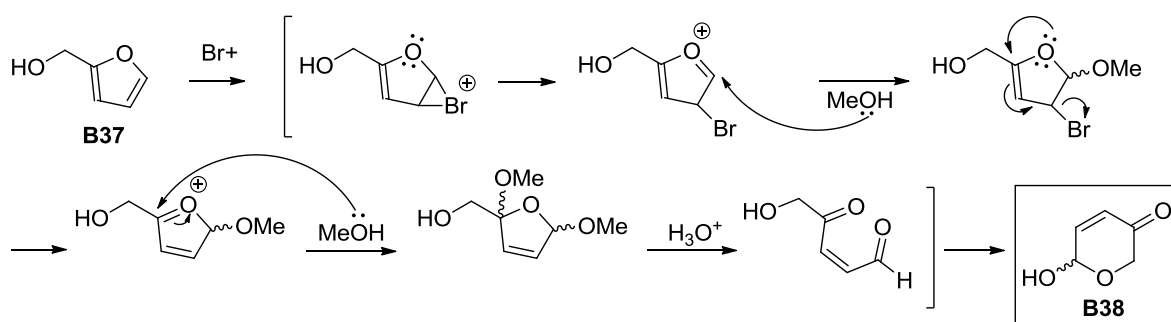


Figure 78 : Mécanisme de la réaction d'Achmatowicz avec Br_2/MeOH .²⁵⁰

Peu de temps après, Lefebvre *et al.* ont démontré que l'utilisation de *m*-CPBA comme oxydant conduisait au même produit de transformation mais *via* un mécanisme différent (Figure 79).^{251,252}

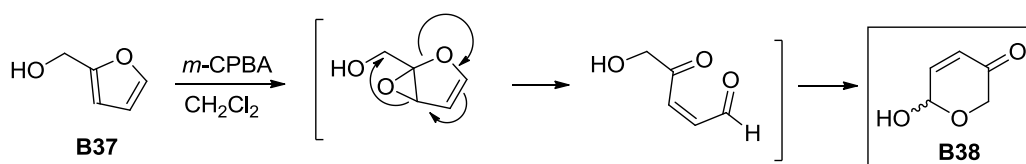


Figure 79 : Réaction d'Achmatowicz avec *m*-CPBA suivant la procédure de Lefebvre.^{251,252}

III.1.1.2 Réaction d'Aza-Achmatowicz

En 1991, Zhou *et al.* ont montré qu'une furanylamine tosylée **B39** pouvait, sous l'action du *m*-CPBA, conduire à la piperidinone **B40** (Figure 80).^{253,254} Cette réaction constitue ainsi la

²⁵⁰ Achmatowicz Jr O, Bukowski P, Szechner B, Zwierzchowska Z, Zamojski A. Synthesis of methyl 2,3-dideoxy-DL-alk-2-enopyranosides from furan compounds-General approach to total synthesis of monosaccharides. *Tetrahedron* 1971; **27**: 1973-96.

²⁵¹ Lefebvre Y. Oxidation of furans-1-Synthesis of 6-hydroxy-2H-pyran-3(6H)-ones. *Tetrahedron Lett* 1972; **13**: 133-6.

²⁵² Lalibert R, Medawar G, Lefebvre Y. Oxidation of furans-2-Synthesis and biological properties of 6-hydroxy-2H-pyran-3(6H)-ones and derivatives. *J Med Chem* 1973; **16**: 1084-9.

version *aza* de celle décrite par Lefebvre. Elle s'opère typiquement dans le dichlorométhane comme solvant, à température ambiante.

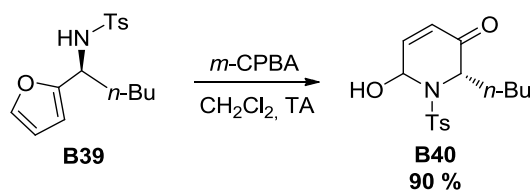


Figure 80 : Réaction d'*Aza*-Achmatowicz de *N*-tosyl α -furanvlamines **B39 avec *m*-CPBA.** ^{253,254}

Il convient de rappeler que les amines sont oxydables en imines par action de dibrome. Dans le cas de cette réaction d'*aza*-Achmatowicz, c'est la présence du groupement tosyl qui, en appauvrissant électroniquement l'atome d'azote, permet dans un premier temps l'oxydation sélective du noyau furane et dans un deuxième temps, la cyclisation avec l'atome d'azote ainsi protégé.

Une exploitation possible de cette réaction consiste en la synthèse de dérivés de type 3-hydroxypyridine après détosylation et aromatisation du cycle. Une transposition à la préparation de pyridiniums *N*-substitués consisterait donc à procéder de manière comparable, partant d'amines secondaires au lieu d'amines primaires tosylées.

III.1.2 Oxydation de noyaux furane conduisant à la formation de 3-hydroxypyridiniums

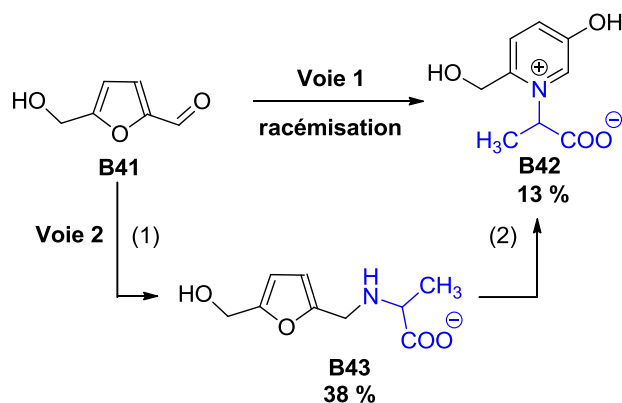
Soldo *et al.* ont décrit la synthèse d'exhausteurs de goût à partir du 5-(hydroxyméthyl)-2-furaldéhyde **B41** et d'acides aminés. ^{132,255,256} Ils ont constaté que la procédure *one-pot* (Cf.II.2) conduisait à l'obtention des 3-hydroxypyridiniums **B42** en mélange racémique (Figure 81, voie 1). ^{132,255}

²⁵³Zhou WS, Lu ZH, Wang ZM. An efficient preparation of optically-active α -furfuryl amide by kinetic resolution using the modified sharpless asymmetric epoxidation reagent. *Tetrahedron Lett* 1991; **32**: 1467-70.

²⁵⁴Zhou WS, Lu ZH, Wang ZM. Asymmetric total synthesis of (+)-goniopyrone. *Tetrahedron* 1993; **49**: 2641-54.

²⁵⁵Soldo T, Franck O, Ottiger H, Hofmann T. Systematic studies of structure and physiological activity of alapyridaine. A novel food-born taste enhancer. *Mol Nutr Food Res* 2004; **48**: 270-81.

²⁵⁶Soldo T, Hofmann T. Application of hydrophilic interaction liquid chromatography/ comparative taste dilution analysis for identification of a bitter inhibitor by combinatorial approach based on Maillard reaction chemistry. *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 9165-71.



Conditions : voie 1 : 1 éq. L-alanine, 1,9 éq. de **B41**, EtOH/H₂O (1:1), NaOH aq. (32 %) pH 9,4, TA (1,5 h), reflux (72 h), 65 % racémique. Voie 2 : (1) 1,5 éq. de **B41**, 2 éq. de L-alanine, H₂O, NaOH aq. (32 %) pH 8,5, Ni/H₂, TA, 5 bar, 48 h ; (2) 1 éq. de furanylamine, H₂O, 0 °C, 1,25 éq. de Br₂/MeOH (30 min), TA (1 h).

Figure 81 : Synthèse d'un 3-hydroxypyridinium **B42 racémique (voie 1) ou énantiomériquement pur (voie 2) à partir de la L-alanine.**¹³²

Néanmoins, en opérant en deux étapes (voie 2), ils obtenaient les 3-hydroxypyridiniums **B42** énantiomériquement purs. Dans ces conditions, la première étape consistait en une amination réductrice entre le 5-(hydroxyméthyl)-2-furaldéhyde **B41** et l'acide aminé. La seconde était l'oxydation du noyau furane en présence de dibrome, qui conduisait après cyclisation au 3-hydroxypyridinium **B42**.

A ce stade de la discussion, il convient d'évoquer le problème de chimiosélectivité de la réaction d'oxydation, pouvant se poser dans le cas de ces furanylamines **B43**. En effet, la fonction amine n'est pas protégée par un groupement électroattracteur (tel qu'un tosylé, comme évoqué dans la réaction d'*Aza*-Achmatowicz) susceptible de la rendre non oxydable. Néanmoins, il est important de mentionner que ce protocole d'oxydation chimique (Br₂/MeOH) est acidifiant du fait de la libération de HBr au cours de la réaction. Ainsi la fonction amine, relativement basique dans cet exemple, est-elle en mesure de capter les protons générés. Cette protonation ayant pour effet de rendre la fonction amine moins facilement oxydable, elle jouera en quelque sorte le même rôle qu'une protection par un groupement tosylé et permettra l'oxydation sélective du noyau furane.

Par la suite, cette approche synthétique (Figure 82) a été appliquée à la synthèse d'autres 3-hydroxypyridiniums **B46** (Tableau 29 et Tableau 30).

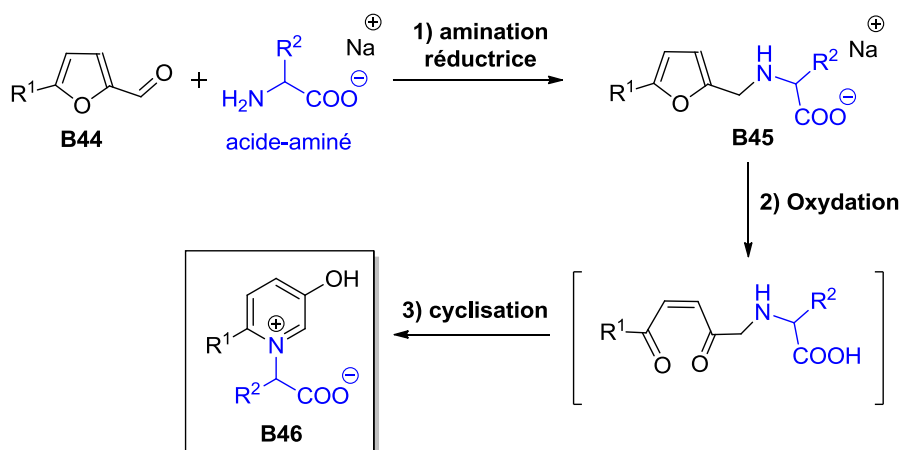
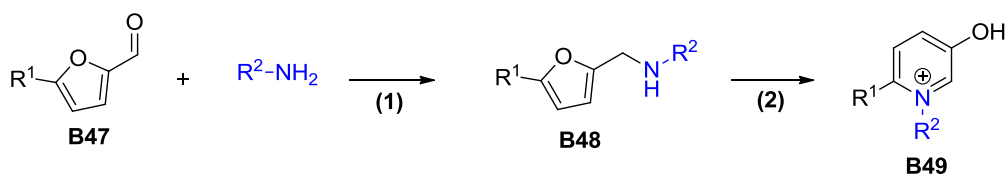


Figure 82 : Schéma réactionnel de préparation de 3-hydroxypyridiniums B46 par réaction multi-étapes à partir du furfural B44 et d'acides aminés.

Le dibrome est l'oxydant le plus utilisé dans l'oxydation chimique de noyaux furane permettant l'accès aux 3-hydroxypyridiniums (Tableau 29).^{257,258}

Tableau 29 : Préparation de 3-hydroxypyridiniums B49 par oxydation chimique de noyaux furane.^{257,258}



Entrée	R ¹	R ²	Rendement 1 (%)	Rendement 2 (%)	Référence
1	CH ₂ -OH	Me	91	78	257 ^a
2	Glucose-O-CH ₂	Me	90	91	257 ^b
3	Glucose-O-CH ₂	C ₁₄ H ₂₉	92	52	257 ^c
4	H	Bn	94	69	258 ^d
5	Me	Bn	---	50	258 ^d
6	H	Cy	---	95	258 ^d
7	H	<i>t</i> -Bu	---	62	258 ^d
8	H	3-pyridine	---	51	258 ^d
9	CH ₂ -OH	Bn	---	41	258 ^d

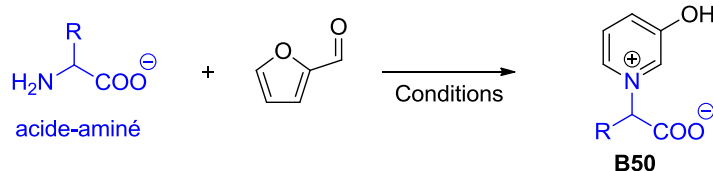
a : (1) méthylamine (42 % aq.), TA, 30 min, Ni/H₂, TA, 30 h (2) Br₂/MeOH, 0 °C, 90 min. b : (1) méthylamine (42 % aq.), TA, 30 min, Ni/H₂, TA, 3 jours (2) H₂O/HCl, Br₂/MeOH, 0 °C, 30 min. c : (1) amine (2 éq.), CH₂Cl₂, reflux, 1 h, 0 °C, NaBH₄, 20 h, TA (2) HCl, Br₂/MeOH, 0 °C, 2 h. d : (1) amine (1 éq.), EtOH, TA, 1 h (2) Br₂/CH₃COOH (1.1 éq.), 0 °C, 1 h.

²⁵⁷ Müller C, Diehl V, Lichtenthaler FW. Building blocks from sugars. Part 23. Hydrophilic 3-pyridinols from fructose and isomaltulose. *Tetrahedron* 1998; **54**: 10703-12.

²⁵⁸ Ren H, Wu C, Ding X, Chen X, Shi F. Aryne cycloaddition with 3-oxidopyridinium species. *Org Biomol Chem* 2012; **10**: 8975-84.

Il convient de noter cependant qu'un mélange HCl/H₂O₂ peut également être utilisé dans la synthèse de 3-hydroxypyridiniums (Tableau 30).²⁵⁹

Tableau 30 : Synthèse de 3-hydroxypyridiniums B50 à partir du furfural et d'acide aminés.²⁵⁹



Entrée	Acide aminé	Rendement (%) ^a
1	glycine	78
2	β-alanine	72
3	alanine	94
4	phénylalanine	55
5	leucine	100

Conditions : (1) 1 éq. acide aminé, 1 éq. NaOH, 1éq. furfural, 60 °C, 30 min, (2) 1,05 éq. NaBH₄, MeOH, 0 °C, 1h, (3) 3 M HCl, 2éq. H₂O₂, 100 °C, 30 min. a : rendement RMN ¹H en présence de 2-méthyle imidazole comme étalon interne.

En conclusion, les processus oxydants permettant d'aller vers la formation de 3-hydroxypyridiniums sont décrits essentiellement en milieu acide (Br₂/MeOH, HCl/H₂O₂). Cette acidification du milieu permet une oxydation suffisamment chimiosélective pour accéder aux pyridiniums attendus.

III.2 L'oxydation du noyau furane du Furosémide®

III.2.1 Oxydation chimique du Furosémide®

En 2007, Chen et Burka décrivent la préparation du **PF** par oxydation chimique du noyau furane du Furosémide® (Figure 83).²⁶⁰ Pour ce faire, la réaction est engagée dans un tube

²⁵⁹ Kirchhecker S, Tröger-Müller S, Bake S, Antonietti M, Taubert A, Esposito D. Renewable pyridinium ionic liquids from the continuous hydrothermal decarboxylation of furfural-amino acid derived pyridinium zwitterions. *Green Chem* 2015; **17**: 4151-6.

²⁶⁰ Chen LJ, Burka LT. Chemical and enzymatic oxidation of Furosemide: formation of pyridinium salts. *Chem Res Toxicol* 2007; **20**: 1741-4.

RMN en présence de diméthyl-dioxirane- d_6 dans l'acétone- d_6 . Ils estiment à 50 % le rendement en **PF**, ce dernier n'ayant pas pu être isolé.

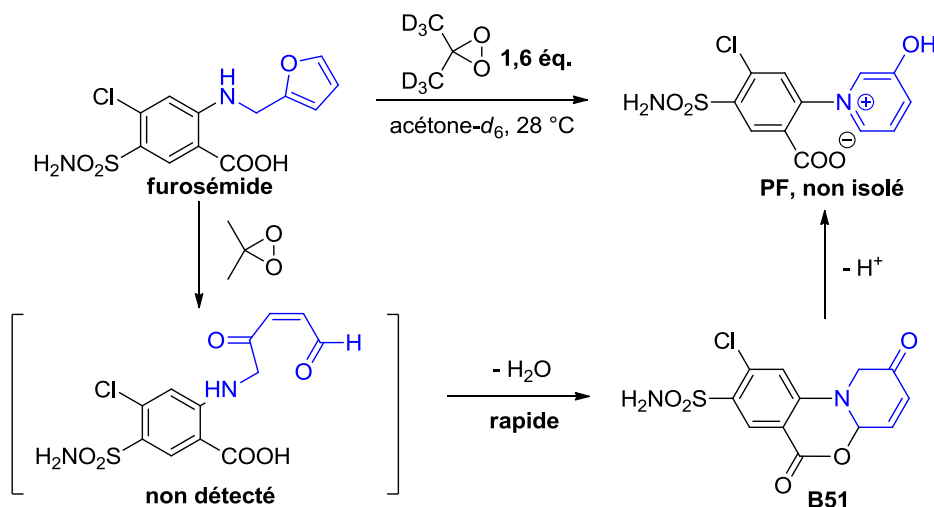


Figure 83 : Préparation du PF par oxydation chimique du novau furane d'après Chen et Burka.²⁶⁰

Il est intéressant de mentionner que, à l'inverse de nombreuses oxydations de noyaux furane par le diméthyl-dioxirane décrites dans la littérature,^{261,262,263} le suivi RMN de l'oxydation du Furosémide[®] n'a pas permis d'identifier les signaux caractéristiques de l'énonal intermédiaire. Ainsi, la réaction de condensation intramoléculaire entre l'aldéhyde et l'amine secondaire est-elle suffisamment rapide pour que le premier produit détecté en RMN soit la forme bicyclique **B51**.

Pour conclure, l'oxydation par le diméthyl-dioxirane du noyau furane d'un enchainement furane-méthylène-azote a permis l'obtention du 3-hydroxypyridinium correspondant. En ce sens, elle constitue une voie d'accès originale aux sels de *N*-arylpyridinium 3-hydroxylé.

²⁶¹ Chen LJ, Hecht SS, Peterson LA. Identification of cis-2-butene-1,4,-dial as a microsomal metabolite of furan. *Chem Res Toxicol* 1995; **8**: 903-6.

²⁶² McClanahan RH, Thomassen D, Slattery JT, Nelson SD. Metabolic activation of (R)-(+)-pulegone to a reactive anonal that covalently binds to mouse liver proteins. *Chem Res Toxicol* 1995; **2**: 349-55.

²⁶³ Alvarez-Diez TM, Zheng J. Detection of glutathione conjugates derived from 4-ipomeanol metabolism in bile af rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 1345-50.

III.2.2 Oxydation électrochimique du Furosémide®

III.2.2.1 Oxydation électrochimique directe du Furosémide®

Deux sites d'oxydation sont envisageables sur le Furosémide® : la fonction amine et le noyau furane (Figure 84).

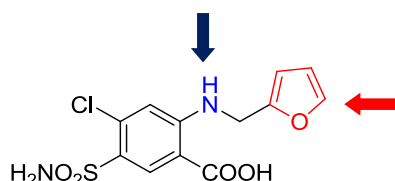


Figure 84 : Sites d'oxydation du furosémide

L'étude voltampérométrique du Furosémide® (les réactions observées sont menées à l'échelle analytique) a été réalisée sur électrode de carbone vitreux dans le méthanol. Les voltampérogrammes ont montré deux pics d'oxydation anodique, le premier à 1,4 V/ECS et le second à 1,6 V/ECS (Figure 85).¹⁵⁷

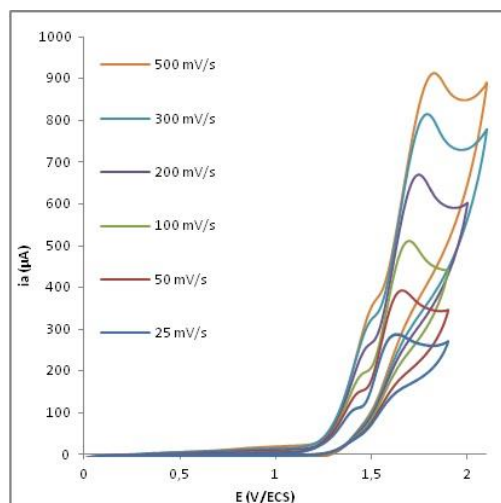


Figure 85 : Voltampérogrammes du Furosémide® à différentes vitesse de balayage.¹⁵⁷

En accord avec la littérature,²⁶⁴ Laurencé *et al.* attribuent le premier pic anodique à l'oxydation de l'amine et le deuxième à celle du noyau furane.¹⁵⁷

²⁶⁴Shetti NP, Sampangi LV, Hedge RN, Nandibewoor ST. Electrochemical Oxidation of Loop Diuretic Furosemide at Gold Electrode and its Analytical Applications. *Int J ElectrochemSci*2009; **4**: 104-21.

A l'échelle préparative, l'oxydation anodique directe du Furosémide[®], dans le méthanol a permis l'oxydation en *alpha* de l'amine, confirmant les travaux de Shettiet *al.*²⁶⁴ Néanmoins, les conditions expérimentales n'ont pas permis d'isoler l'imine correspondante et seule l'aniline **B52** (son produit d'hydrolyse) a pu être isolée (Figure 86).

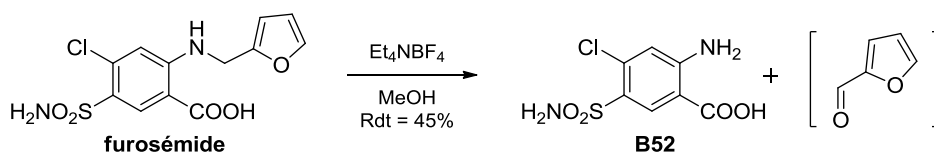


Figure 86 : Oxydation anodique directe du Furosémide[®]¹⁵⁷

III.2.2.2 Oxydation électrochimique indirecte du Furosémide[®]

Une oxydation électrochimique indirecte se caractérise par l'utilisation d'un médiateur redox. Son oxydation à l'anode génère un oxydant qui va à son tour oxyder en solution le substrat. Le médiateur redox utilisé pour procéder à l'oxydation indirecte du Furosémide[®] était le bromure d'ammonium, l'agent oxydant électrogénéré étant le dibrome (Cf.III.3.2.2.1).

Le voltampérogramme du Furosémide[®] en mélange avec des ions bromures (Figure 87, courbe bleue) montre une diminution de l'intensité du pic attribué à la fonction amine. S'agissant des bromures, l'intensité du pic d'oxydation augmente et la disparition du pic retour en réduction est observée (flèche verte). Ce résultat confirme une oxydation médiée par les ions bromure.

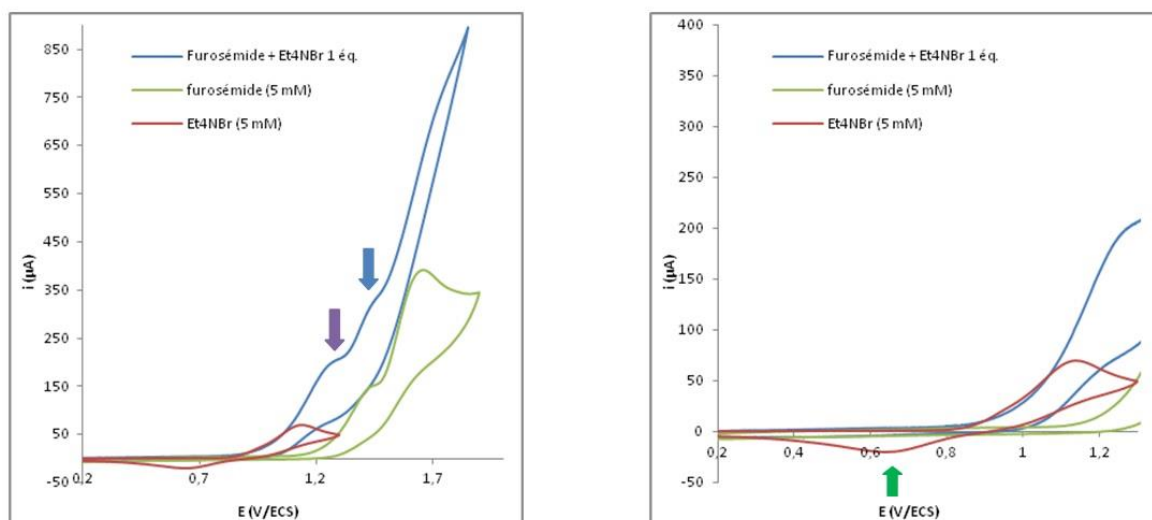


Figure 87 : Voltampérogrammes des bromures seuls (courbe rouge), du Furosémide[®] seul (courbe verte) et en présence de bromures (courbe bleue) à 50 mV/s.

A l'échelle préparative, l'oxydation indirecte du Furosémide[®] menée dans le méthanol et en présence d'ions bromure (NH₄Br), a confirmé ce qui avait été observé par voltampérométrie. En effet, il a été constaté la formation d'un composé diméthoxylé **B53**, obtenu sous la forme de deux diastéréoisomères, après oxydation du noyau furane (Figure 88).

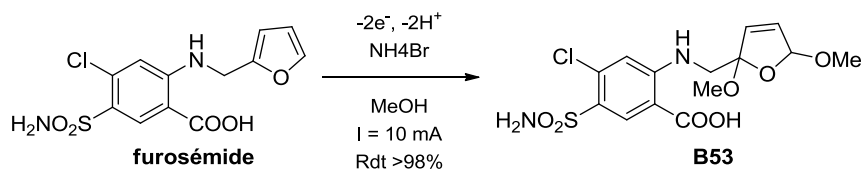


Figure 88 : Oxydation indirecte du Furosémide[®]

III.2.3 Accès au 3-hydroxypyridinium issu du Furosémide[®]

L'hydrolyse en milieu acide (TFA (10 mM)/MeCN : 60/40) à 40 °C du composé **B53** conduit, après une réaction de condensation intramoléculaire (Figure 83), à la formation du **PF** (Figure 89).¹⁵⁷

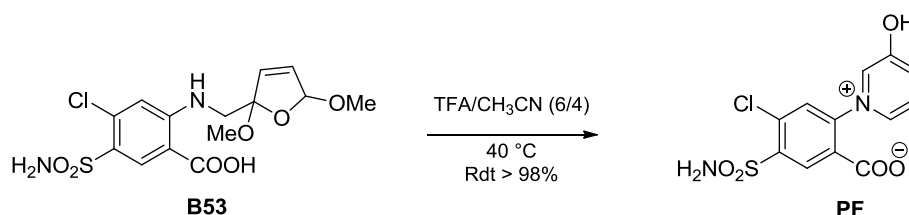


Figure 89 : Formation du PF d'après Laurencé *et al.*¹⁵⁷

III.3 Résultats et discussion

Dans la continuité des travaux initiés par le Dr. Laurencé, nous nous sommes attachés à la synthèse de *N*-arylpyridiniums 3-hydroxylés. Comme l'étude bibliographique l'a démontré, cette voie de synthèse suppose la préparation préalable de composés de type *N*-aryl, *N*-furanyleméthylamine lesquels peuvent eux-mêmes être obtenus par amination réductrice entre une aniline et le furfural (i, Cf.III.3.1). Puis, après une étape d'oxydation (ii, Cf.III.3.2-III.3.4), la cyclisation intramoléculaire (iii, Cf.III.3.5) permet l'accès aux *N*-arylpyridiniums 3-hydroxylés (Figure 90).

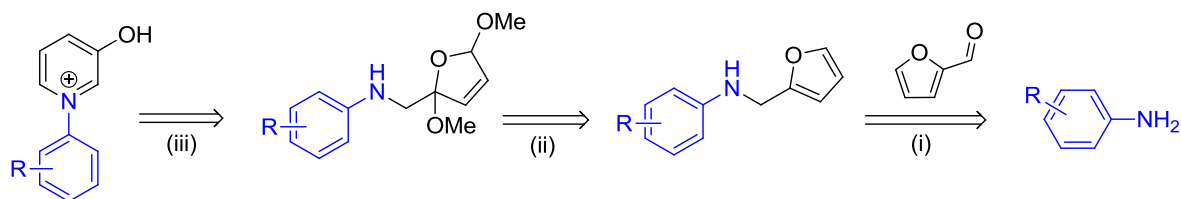


Figure 90 : Accès aux *N*-arylpyridiniums 3-hydroxylés via une étape d'oxydation électrochimique.

III.3.1 Amination réductrice

En premier lieu, il nous a fallu procéder à l'étape d'amination réductrice qui, après réaction entre un dérivé de l'aniline **2** et le furfural, conduit à l'obtention des *N*-aryle, *N*-furanyleméthylamines, analogues diversement fonctionnalisés du Furosemide[®]. Selon la nature de l'aniline engagée, différents protocoles expérimentaux ont dû être mis au point.

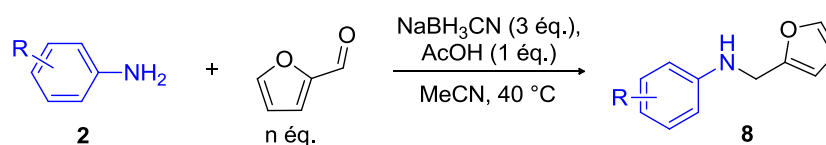
III.3.1.1 Protocole 1 : Amination réductrice *one-pot*

III.3.1.1.1 Activation thermique classique

Le premier protocole testé procède en une seule étape, dans l'acétonitrile, en présence de cyanoborohydrure de sodium comme source d'hydrures et d'acide acétique.^{265,266} Les réactions ont été suivies par CPG et les résultats sont rassemblés dans le Tableau 31.

²⁶⁵ Bagdaley KH, Fears R, Ferres H, Geen GR, Hatton IK, Jennings LJA, Tyrrell AWR. N-Substituted amino acid derivatives with hyperalphalipoproteinaemic activity. *Eur J Med Chem* 1988; **23**: 523-31.

²⁶⁶ Valente S, Tardugno M, Conte M, Cirilli R, Perrone A, Ragno R, Simeoni S et al. Novel cinnamyl hydroxyamides and 2-aminoanilides as histones deacetylase inhibitors: apoptotic induction and cytodifferentiation activity. *Chem Med Chem* 2011; **6**: 698-712.

Tableau 31 : Aminations réductrices *one-pot*.

Entrée	R	Aniline	n	Durée	Rendement isolé (%)
1	H	2b	2	18 h	92
2	<i>m</i> -Cl	2c	2	24 h	80
3	<i>p</i> -Cl	2d	2	48 h	84
4	<i>p</i> -CF ₃	2n	8	48 h	43
5 ^a	<i>p</i> -CN	2k	8	12 j	51
6	<i>p</i> -CONH ₂	2s	5	4 j	53
7	<i>o</i> -Cl	2h	8	15 j	50 % conversion ^b
8	<i>o</i> -CF ₃	2i	8	15 j	0 % conversion ^b

a : avec 7 éq. de NaBH₃CN. b : ratio aniline/produit déterminé par CPG.

Ce protocole a permis d'obtenir les produits d'amination réductrice **8** avec d'assez bons rendements isolés (entrées 1-6). Néanmoins, ce protocole *one-pot* a très vite montré une limitation majeure. En effet, nous avons constaté dans le cas de certains dérivés d'aniline porteurs de groupements électroattracteurs, donc peu nucléophiles, la formation du furanylméthanol consécutivement à la réduction du furfural par le cyanoborohydrure de sodium. Ceci témoigne du manque de réactivité de ces anilines, le furfural se réduisant avant même d'avoir pu se condenser avec l'aniline mise en jeu. Pour cette raison, l'utilisation d'un large excès de furfural pour favoriser la formation de l'imine intermédiaire (entrée 4-8) éventuellement associée à des temps de réaction plus longs (entrées 5-6) a-t-elle été nécessaire. Malgré cela, dans le cas de la 2-chlororoaniline **2h**, une conversion de seulement 50 % a été constatée avec 8 équivalents de furfural et après 15 jours de réaction. Dans les mêmes conditions, la réaction avec l'aniline **2i** a quant à elle échouée, aucune conversion n'ayant été constatée par CPG.

III.3.1.1.2 Activation micro-onde

Reprenant les conditions expérimentales précédemment suivies, 2 équivalents de furfural ont été mis à réagir avec l'aniline **2i** sous activation micro-ondes, dans l'acétonitrile, à 85 °C. Au bout de 40 minutes de réaction, aucun produit attendu n'avait été formé, le furfural quant à lui

ayant été entièrement réduit. L'utilisation d'un plus large excès de furfural (4 équivalents) et un temps de réaction prolongé (1 heure) a abouti au même résultat.

Avec l'aniline **2i**, la réduction du furfural survenant avant même la formation de l'imine intermédiaire, un protocole procédant en 2 étapes avec 1°) formation puis 2°) réduction de l'imine a dû être mis au point.

III.3.1.2 Protocole 2 : Amination réductrice en deux étapes

III.3.1.2.1 Avec appareil Dean-Stark

La réaction de condensation du furfural et de l'aniline conduit à la formation de l'imine **9** correspondante avec libération d'une molécule d'eau (Figure 91). Cette réaction équilibrée peut être rendue totale par élimination du milieu réactionnel de l'eau produite, classiquement sous la forme d'un azéotrope et grâce à un appareil de Dean-Stark.

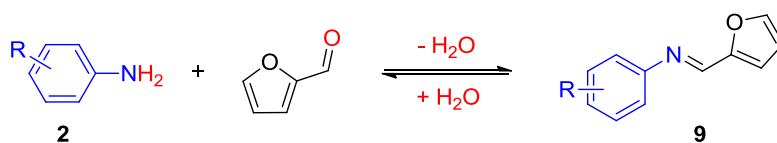
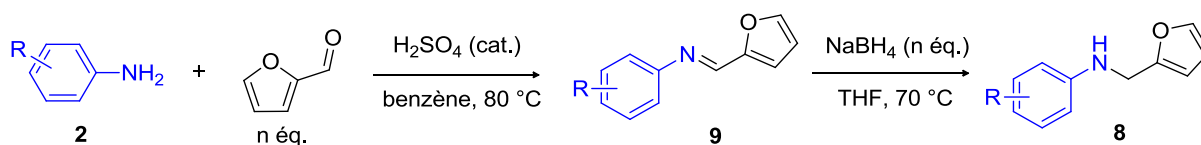


Figure 91 : Equilibre amine/imine lors de la condensation du furfural et du dérivé d'aniline.

Concernant le choix du solvant, nous avons tout d'abord envisagé le toluène (point d'ébullition de son azéotrope avec l'eau : 84 °C). Deux équivalents de furfural ont été mis à réagir avec l'aniline **2i** dans le toluène en présence d'une quantité catalytique d'acide sulfurique concentré et à une température de consigne fixée à 110 °C. Dans ces conditions, une dégradation partielle du furfural a été constatée, vraisemblablement liée à la température du milieu. Nous avons par conséquent opté pour un autre solvant, le benzène²⁶⁵ (point d'ébullition de son azéotrope avec l'eau : 69 °C).

Au solvant près et à la température de consigne fixée à 80 °C, la réaction entre le furfural et l'aniline **2i** a donc été lancée dans les mêmes conditions que dans le toluène. Dans ces conditions et après 5 h de réaction, nous avons constaté la conversion totale de l'aniline **2i** en imine attendue **9i**. Fort de ce succès, nous avons appliqué ce protocole à une série d'anilines (Tableau 6).

Tableau 32 : Aminations réductrices en deux étapes dans le benzène.

Entrée	R	Aniline	n	Rendement isolé (%)
1	<i>o</i> -CF ₃	2i	2	73
2	<i>o</i> -Cl	2h	1,2	50
3	<i>m</i> -CF ₃	2r	1,2	45
4 ^a	<i>o</i> -CN	2j	2	26
5	<i>m</i> -CN	2o	1,2	56
6	<i>o</i> -CONH ₂	2y	1,2	72
7	<i>m</i> -CONH ₂	2t	1,2	55
8 ^b	<i>p</i> -CH ₃	2a	2	58
9 ^b	<i>m</i> -CH ₃	2x	1,2	74
10 ^b	<i>o</i> -CH ₃	2v	1,2	93

a : produit **8j** obtenu en mélange avec l'aldéhyde **10** suite à une réduction partielle de la fonction nitrile en aldéhyde par NaBH₄. b : réduction menée avec n éq. de LiAlH₄.

Une fois l'imine formée, le milieu réactionnel est évaporé puis repris dans le THF. La réduction est ensuite menée dans le THF par le borohydrure de sodium (1 équivalent par rapport au furfural, entrée 1-7).

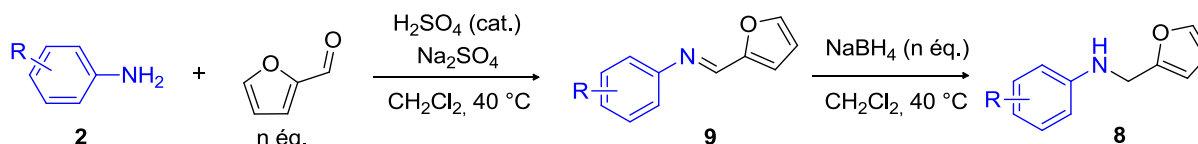
Dans le cas des toluidines **2a**, **2x** et **2v** (entrée 8-10), le NaBH₄ n'a pas permis la réduction des imines correspondantes. Pour ces imines relativement enrichies en électrons, la réduction a dû se faire en utilisant un réducteur plus fort, le tétrahydroaluminat de lithium (LiAlH₄).

Malheureusement, bien que ce protocole ait permis de réduire considérablement l'excès en furfural ainsi que les temps de réaction, il a néanmoins été constaté des problèmes de solubilité dans le cas des anilines relativement polaires. La faible solubilité dans le benzène des dérivés aminés de l'acide benzoïque et des amino-phénols s'est traduite par une absence de réactivité dans ces conditions. Un autre protocole adapté à ces anilines polaires a donc dû être mis au point.

III.3.1.2.2 Cas des anilines peu solubles dans le benzène

Afin de pouvoir solubiliser les dérivés de l'aniline relativement polaires et ainsi procéder à leur amination réductrice, nous avons eu recours à un solvant plus polaire : le dichlorométhane. De plus, dans le but de pouvoir éliminer l'eau formée lors de la formation de l'imine, du sulfate de sodium (Na_2SO_4) est ajouté au mélange réactionnel (Tableau 33).

Tableau 33 : Aminations réductrices en deux étapes dans le dichlorométhane.



Entrée	R	Aniline	n	Rendement isolé (%)
1	<i>o</i> -OH	2e	1,2	42
2	<i>m</i> -OH	2f	1,2	12 ^a
3	<i>p</i> -OH	2g	1	45
4	<i>o</i> -COOH	2z	1,2	32
5	<i>m</i> -COOH	2p	1,2	64
6	<i>p</i> -COOH	2m	1,4	54
7	2-COOH, 5-Cl	2aa	3	81
8	2-COOH, 4-Cl	2ab	3	78

a : produit **8f** se dégrade partiellement sur gel de silice lors de la purification.

Avec ce protocole, les excès en furfural restent, tout comme avec le précédent, limités ainsi que les temps de réaction. Cependant, dans le cas des anilines di-substituées **2aa** et **2ab** (entrées 7-8), 3 équivalents de furfural ont dû être engagés afin d'observer une conversion totale. Enfin, concernant l'aniline **2f** (entrée 2), un faible rendement isolé a été obtenu en raison de la dégradation partielle du produit d'amination réductrice **8f** lors de sa purification sur gel de silice.

III.3.2 Oxydation du noyau furane

Comme mentionné précédemment, l'étape clé de cette voie de synthèse multi-étapes consiste en l'oxydation du noyau furane. D'après l'étude bibliographique, deux méthodes sont

possibles afin d'effectuer cette oxydation : l'oxydation chimique menée en présence de dibrome et l'oxydation anodique où le dibrome est électrogénéré.

Il est à noter que si ces deux méthodes font appel au même agent oxydant (en l'occurrence, au dibrome), elles procèdent cependant dans des conditions différentes en termes de pH. L'oxydation chimique se soldant par la libération de deux équivalents d'HBr, elle induit une acidification du milieu réactionnel. En revanche, durant l'oxydation électrochimique mono-compartment (l'oxydation et la réduction étant réalisées dans le même compartiment), les protons générés sont réduits à la cathode, ce qui garantit une acidité moindre dans le milieu.

III.3.2.1 Oxydation chimique du noyau furane

Le protocole d'oxydation chimique de noyaux furane décrit dans la littérature a été appliqué au produit d'amination réductrice **8s** (*p*-CONH₂).^{132,255,257} Pour ce faire, après dissolution dans le méthanol à 0 °C, 1,3 équivalents de dibrome ont été ajoutés goutte à goutte au mélange réactionnel. Après 30 minutes, la réaction a été analysée par CPG. La LRMS du mélange obtenu a permis d'identifier sans ambiguïté, la formation de l'imine correspondante, l'aniline **2s** et le furfural (Figure 92).

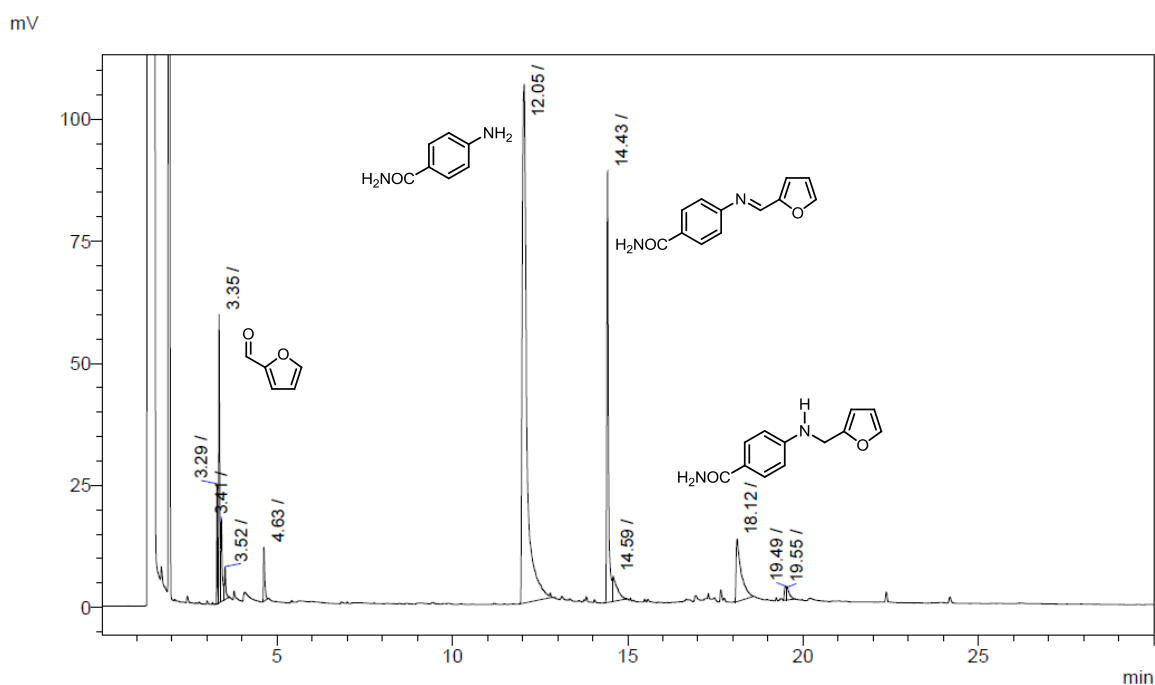


Figure 92 : Chromatogramme (CPG) du brut réactionnel après oxydation chimique par Br₂ du composé 8s.

Ces résultats suggèrent l'oxydation de la fonction amine qui, comme dans le cas de l'oxydation directe du Furosémide[®], conduit à la formation de l'imine **9s** et – après hydrolyse partielle de cette dernière – à la formation de l'aniline **2s** et du furfural (Figure 93).

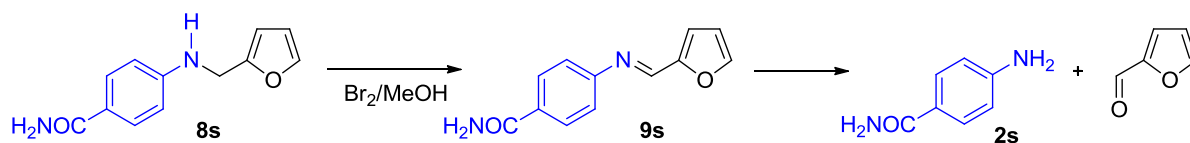
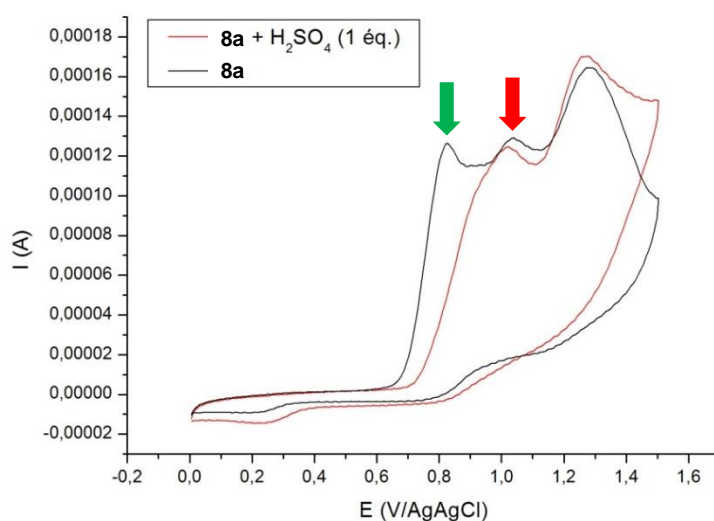


Figure 93 : Oxydation chimique par Br₂ du composé 8s.

Comme nous l'avons précédemment indiqué, l'oxydation chimique est acidifiante. Si cela n'est toutefois pas suffisant pour protéger l'atome d'azote, la réaction peut être lancée en milieu acide.^{259,258}

Malheureusement, l'étude voltampérométrique menée en présence d'acide sulfurique sur le composé **8a** – attendu comme étant relativement basique – a démontré que le fait de travailler en milieu acide ne suffisait pas à repousser suffisamment le potentiel d'oxydation de la fonction amine, celle-ci restant malgré l'addition d'acide plus oxydable que le noyau furane (Figure 94).



Conditions : H₂SO₄ et/ou composé **8a** (0,1 mmol), NEt₄BF₄ (2 mmol), vitesse de balayage 300 mV/s, électrode de carbone graphite, MeOH (20 mL), potentiels E exprimés en V/AgAgCl.

Figure 94 : Voltampérogramme du composé 8a, en absence (courbe noire) et en présence (courbe rouge) d'ions bromure

Ce résultat, *a priori* contradictoire avec ce qui a été précédemment dit de la protection des atomes d'azote par protonation, peut selon toute vraisemblance s'expliquer par le fait que s'agissant de nos amines **8**, nous avons affaire à des dérivés de type aniline, significativement moins basiques que les amines aliphatiques précédemment évoquées (Cf.III.1.2). La

protection par protonation s'avère donc malheureusement insuffisante dans le cas de nos amines.

Poursuivant l'analyse de l'étude voltampérométrique du composé **8a**, l'on ne manquera pas de noter qu'en milieu protique une partie de ce composé se trouve sous forme protonée – et ce, même en l'absence d'acide sulfurique (courbe noire) – ainsi que l'indique la présence des pics d'oxydation de la forme amine libre (flèche verte) et de la forme protonée (flèche rouge). Après l'ajout d'acide toutefois, seule la forme protonée reste visible (courbe rouge).

La conclusion à laquelle nous amène cette étude est donc que l'oxydation chimique sélective du noyau furane des composés **8** suppose obligatoirement la protection préalable de la fonction amine et ce, par un lien moins labile que celui offert par une simple protonation. Dans la mesure où l'oxydation électrochimique indirecte du Furosémide[®] avait démontré sa chimiosélectivité sans protection préalable de la fonction amine, nous avons logiquement envisagé cette méthode pour l'oxydation pour nos composés **8**.

III.3.2.2 Oxydation électrochimique indirecte du noyau furane

III.3.2.2.1 Principe de l'oxydation indirecte

Comme mentionné précédemment, l'oxydation anodique du noyau furane utilise un oxydant électrogénéré : le dibrome. Ainsi, les ions bromure présents dans le milieu réactionnel s'oxydent à l'anode, générant du dibrome en solution. Ce dibrome va à son tour oxyder chimiquement le noyau furane, régénérant les ions bromure. Ces derniers jouent donc le rôle de médiateur redox. La réaction étant menée dans le méthanol, la forme oxydée du furane est piégée sous la forme d'un diacétal méthylique (Figure 95).

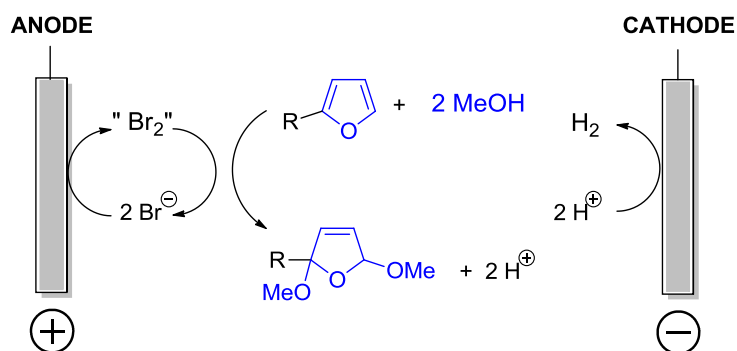
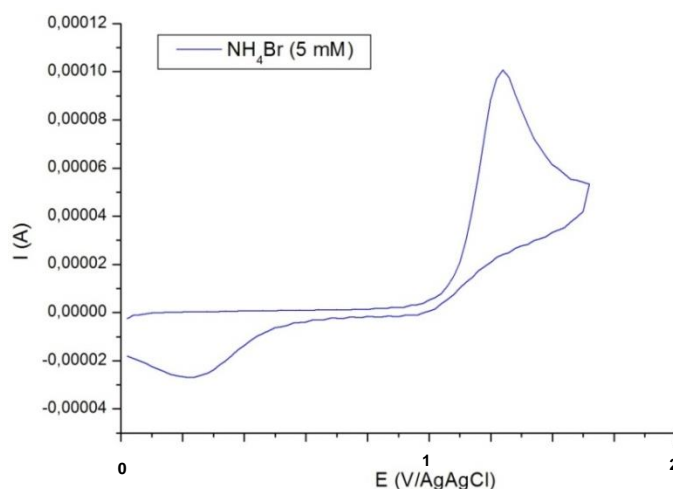


Figure 95 : Processus d'oxydation indirecte du noyau furane par les ions bromures.

L'oxydation des ions bromure a été étudiée sur électrode de carbone graphite dans le méthanol. Le voltampérogramme montre un pic d'oxydation à 1,30 V/AgAgCl. La présence de pic retour caractérise un système quasi-réversible (Figure 96).



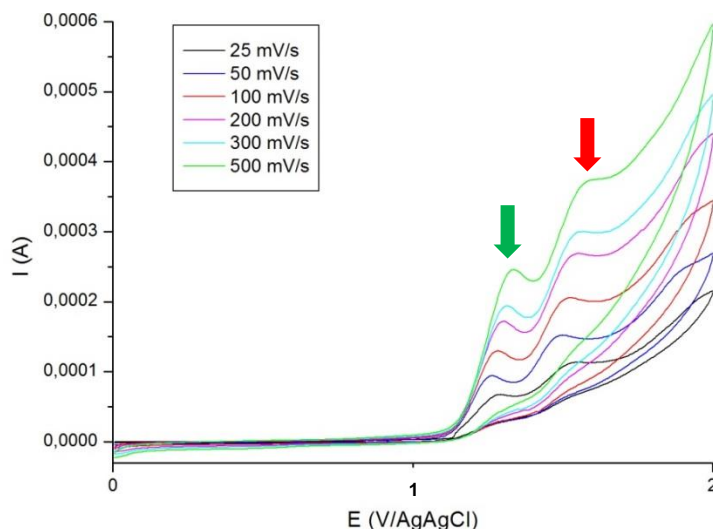
Conditions : NH₄Br (0,1 mmol), vitesse de balayage 300 mV/s, électrode de carbone graphite, MeOH (20 mL), potentiels E exprimés en V/AgAgCl.

Figure 96 : Voltampérogramme des ions bromure.

III.3.2.2.2 Oxydabilité des composés **8**

III.3.2.2.2.1 Etude voltampérométrique des composés **8**

Les voltampérogrammes des composés **8** montrent, comme dans le cas du Furosémide[®], deux pics d'oxydation anodique. Celui présenté ci-après (Figure 97) du composé **8k** (*p*-CN), indique un premier pic à 1,31 V/ECS (à 300 mV/s) attribué à l'oxydation de la fonction amine (flèche verte), le second à 1,55 V/ECS (à 300 mV/s) attribué à l'oxydation du noyau furane (flèches rouge). L'absence de pic retour caractérise deux systèmes irréversibles. L'ensemble des autres composés **8** étudiés par voltampérométrie cyclique ont tous montré un profil comparable.



Conditions : composés **8k** (0,1 mmol), NEt_4BF_4 (2 mmol), électrode de carbone graphite, MeOH (20 mL).

Figure 97 : Voltampérogrammes du composé **8k** à différentes vitesses de balayage.

L'étude menée à différentes vitesses de balayage a permis de tracer l'évolution des intensités de pic en fonction de la racine carrée de la vitesse. Il en est ressorti que le processus électrochimique observé à l'électrode était bien, à chaque fois, associé à un processus de diffusion pure (Figure 98). Ce processus de diffusion pure a également été constaté sur l'ensemble des autres substrats étudiés par voltampérométrie cyclique.

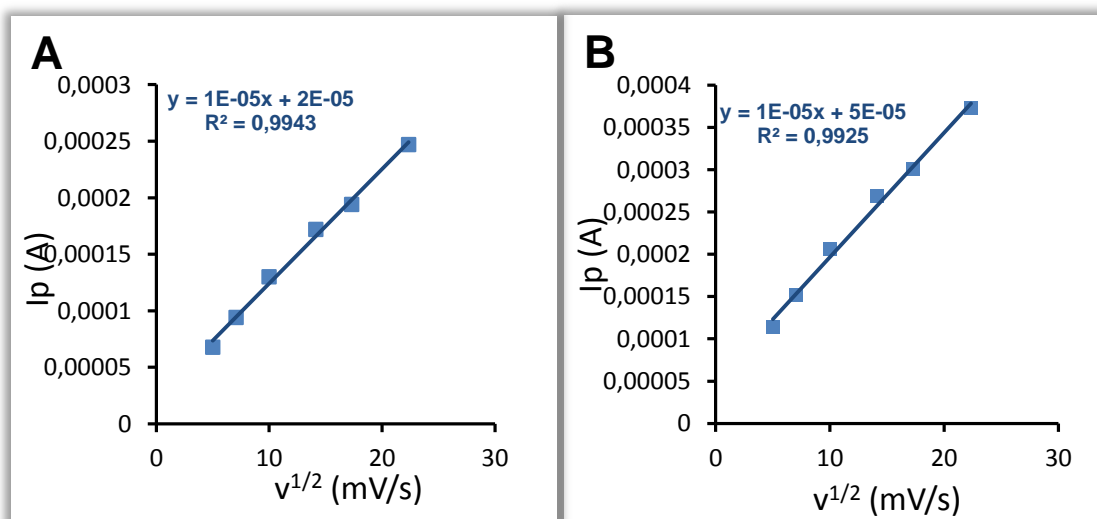
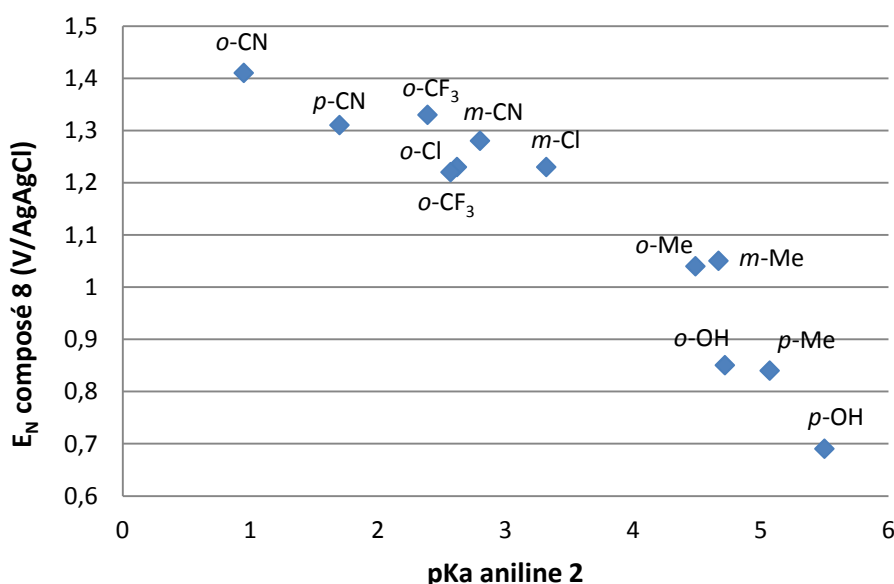


Figure 98 : Variation de l'intensité des pics d'oxydation de la fonction amine (A) et du nouveau furane (B) du composé **8k** en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage.

III.3.2.2.2 Influence du substituant porté par le noyau aromatique

Au cours de ces travaux, il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet du substituant porté par le noyau phényle sur les valeurs de potentiel de pic d'oxydation de la fonction amine des composés **8**. Il est important en effet de rappeler que plus le substituant porté par le noyau phényle désactive l'atome d'azote, plus ce dernier est appauvri en électrons et par conséquent, plus il est difficile de lui arracher des électrons et donc de l'oxyder. Concrètement, un tel effet désactivant a pour conséquence de repousser le potentiel d'oxydation de la fonction amine.

De fait, l'étude voltampérométrique des composés **8** a permis de mettre en évidence une telle évolution des valeurs de potentiels de pic d'oxydation en fonction de la nature et de la position du substituant du noyau phényle. De cette étude, est également ressorti une bonne corrélation entre les valeurs de potentiels de pic d'oxydation et le pK_a des anilines **2** correspondantes (Figure 99).



Conditions : composés **8** (0,1 mmol), NEt_4BF_4 (2 mmol), vitesse de balayage 300 mV/s, électrode de carbone graphite, MeOH (20 mL), potentiels de pic E exprimés en V/AgAgCl. Valeurs pK_a , voir réf. : [232-235](#)

Figure 99 : Variation du potentiel d'oxydation de la fonction amine des composés **8** en fonction du pK_a des anilines **2** correspondantes.

Lorsque le pK_a de l'aniline **2** est inférieur à 3,5 (groupements électroattracteurs), le potentiel du pic d'oxydation de la fonction amine du composé **8** correspondant est compris entre 1,41 et 1,23 V/AgAgCl. Dans le cas des composés **8** dont le pK_a des anilines correspondantes est supérieur à 4,4 (groupements électrodonneurs), la fonction amine devient facilement oxydable, ce qui se traduit par de plus faibles valeurs de potentiel de pic d'oxydation (variant de 1,04 à 0,69 V/AgAgCl).

III.3.2.2.2.3 Cas particulier des aminophénols **8e-g**

L'étude voltampérométrique des aminophénols **8e** (*o*-OH), **8f** (*m*-OH) et **8g** (*p*-OH) a permis de mettre en évidence un pic d'oxydation supplémentaire, lequel est observé à un potentiel inférieur à celui de la fonction amine. Etant donné la structure de ces composés, ce pic a été attribué à l'oxydation de la fonction phénol.

S'agissant en particulier des aminophénols **8g** et **8e**, l'oxydation de cette fonction pourrait possiblement conduire à la formation de composés de type quinone-imines et par suite, à la coupure de la liaison entre l'atome d'azote et le noyau phényle. Pour cette raison, la protection des fonctions phénol est donc apparue tout aussi nécessaire que celle des amines.

III.3.2.2.3 Problème de chimiosélectivité de l'oxydation électrochimique

Comme constaté précédemment, des problèmes de chimiosélectivité peuvent être attendus du fait de la présence au sein de nos molécules d'une autre fonction oxydable : la fonction amine. De tous les composés **8** préparés et étudiés par voltampérométrie, le composé **8j** (*o*-CN) est celui dont le potentiel de pic d'oxydation de la fonction amine s'est révélé être le plus élevé (Figure 99). Pour cette raison, une oxydation électrochimique indirecte, calquée sur le mode opératoire qui avait permis l'oxydation sélective du noyau furane du Furosémide[®], a été tentée.

Après un passage de 2,5 F.mol⁻¹, l'électrolyse a été arrêtée et le milieu réactionnel, analysé par CPG et LRMS. Si le produit d'oxydation du noyau furane **11j** a bien été détecté dans le milieu réactionnel, il a néanmoins été observé en mélange avec l'imine **9j** et l'aniline **2j** obtenues majoritairement (Figure 100).

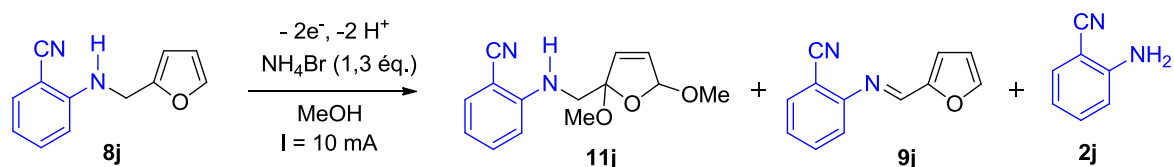


Figure 100 : Oxydation indirecte du composé **8j.**

Ainsi, l'oxydation électrochimique – tout comme l'oxydation chimique – n'a pu être réalisée de manière chimiosélective. Dès lors, quelle qu'allait être la méthode d'oxydation finalement retenue, la protection de l'atome d'azote est apparue comme une étape incontournable pour

effectivement obtenir cette chimiosélectivité. D'emblée, les enseignements tirés de l'oxydation chimique et de l'étude voltampérométrique ont permis d'exclure une protection par protonation, laquelle était insuffisante.

III.3.2.3 Nécessité de protéger les produits d'amination réductrice

Nos tentatives d'oxydation (chimique ou électrochimique) nous ont conduits à la conclusion que l'oxydation sélective du noyau furane impliquait nécessairement la protection préalable de l'atome d'azote. Concrètement, cela devait se traduire par l'installation d'un groupement suffisamment désactivant pour repousser le potentiel d'oxydation de cet atome d'azote au-delà de celui du noyau furane (Figure 101).

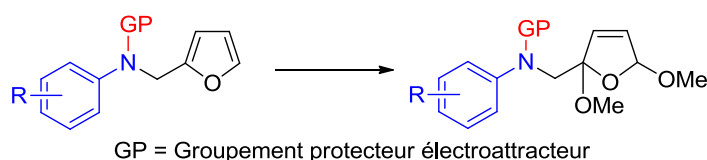


Figure 101 : Oxydation du noyau furane après protection de la fonction amine des composés 8.

Il est à noter qu'au cas général des composés **8** présentant deux fonctions oxydables (furane et amine), s'ajoutait celui – particulier – des aminophénols **8e-g**. Comme indiqué précédemment, l'oxydation des fonctions phénols pouvant conduire à des coupures oxydantes *via* la formation de quinones-imines, ces fonctions devaient donc également être protégées par des groupements adaptés.

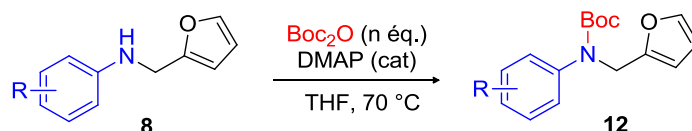
III.3.3 Protection de la fonction amine des composés 8

III.3.3.1 Protection par le dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc₂O)

Comme mentionné dans le précédent paragraphe, la fonction amine des *N*-furanylméthylamines devait être protégée par un groupement capable de repousser suffisamment le potentiel d'oxydation de l'atome d'azote pour que celui-ci devienne moins facilement oxydable que le noyau furane. Par ailleurs, afin de limiter le nombre d'étapes nous séparant des produits finals, l'idée était de combiner la déprotection et la cyclisation. L'expérience du Furosémide[®] nous ayant appris que les conditions acides étaient propices à la formation du pyridinium 3-hydroxylé, c'est donc logiquement vers des groupements protecteurs acido-labiles que notre choix s'est porté.

Ces considérations nous ont amené à envisager une protection par le groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc), par ailleurs très largement utilisé en synthèse peptidique et hétérocyclique pour protéger les fonctions amine.²⁶⁷ L'installation de ce groupement sur les produits d'amination réductrice **8** a été réalisée en les mettant à réagir avec le dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc₂O), en présence d'une quantité catalytique de *p*-diméthylaminopyridine (DMAP), dans le THF à reflux (Tableau 34).

Tableau 34 : Protection de la fonction amine des composés **8 par le dicarbonate de di-*tert*-butyle.**



Entr\u00e9e	R	<i>N</i> -furanylm\u00e9thylamines	n	Rendement isol\u00e9 (%)
1	H	8b	1,1	87
2	<i>p</i> -Cl	8d	1,2	93
3	<i>m</i> -Cl	8c	1,7	51
4	<i>o</i> -CN	8j	2,5	54
5	<i>m</i> -CN	8o	2	77
6	<i>p</i> -CN	8k	2,5	69
7	<i>m</i> -CONH ₂	8t	2	35
8	<i>p</i> -CONH ₂	8s	2	34
9	<i>o</i> -CH ₃	8v	1,4	93
10	<i>m</i> -CH ₃	8x	2	74
11	<i>p</i> -CH ₃	8a	1	58
12	<i>m</i> -CF ₃	8r	2,2	38
13	<i>p</i> -CF ₃	8n	2,5	46
14 ^a	<i>p</i> -OH	8g	2	60
15 ^a	<i>m</i> -OH	8f	2,2 ^b	22 ^b
16 ^c	<i>o</i> -OH	8e	3	64
17	2-COOH, 4-Cl	8ab	1,5	55
18	2-COOH, 5-Cl	8aa	4	pas de r\u00e9action ^d
19	<i>o</i> -Cl	8h	4	pas de r\u00e9action ^d
20	<i>o</i> -CF ₃	8i	4	pas de r\u00e9action ^d

²⁶⁷Bodanszky M. Principles of Peptides Chemistry. Springer-Verlag 1984; New-York : pp 99.

21	<i>o</i> -CONH ₂	8y	4	pas de réaction ^d
----	-----------------------------	-----------	---	------------------------------

a : dans le cas des aminophénols **8f** et **8g**, protection des deux fonctions amine et alcool. b : nombre d'équivalent de Boc₂O par rapport à l'aniline de départ, le produit **8f** se dégradant lors de la purification, il n'a donc pas été isolé et la réaction de protection est lancée sur le brut réactionnel après amination réductrice. Le rendement indiqué est donc sur les deux étapes. c : dans le cas de l'aminophénol *ortho*-substitué **8e**, la protection de la fonction alcool n'a pas pu se faire du fait de l'encombrement stérique. Le produit **12e** obtenu est donc protégé seulement sur la fonction amine. d : absence de réaction constatée par suivi CPG.

La fonction amine des *N*-furanylméthylamines **8** a pu être protégée avec d'assez bons rendements isolés (entrées 1-17). Dans le cas des aminophénols **8e-g**, la fonction phénol a également été protégée (entrées 14-15). Les composés **12f** (*m*-OBoc) et **12g** (*p*-OBoc) ont ainsi pu être obtenus sans difficulté particulière. Néanmoins, concernant le composé **8e** (*o*-OH) seule la fonction amine a pu être protégée, l'encombrement généré autour de l'atome d'azote étant vraisemblablement à l'origine de ce manque de réactivité de la fonction alcool.

Par ailleurs, il convient de rappeler que le composé **8f** (*m*-OH) se dégrade lors de sa purification sur gel de silice. Pour cette raison, le brut réactionnel issu de la réaction d'amination réductrice a été engagé dans la seconde étape de protection, sans purification. Ainsi, le rendement isolé affiché en entrée 15 correspond-il à ces deux étapes d'amination réductrice et de protection.

L'expérience a néanmoins montré les limitations liées au choix de ce groupement protecteur. D'une part, les temps de réaction se sont révélés relativement longs (de 2 à 8 jours), probablement en raison du manque de nucléophilie des fonctions amines des dérivés **8**. D'autre part, l'encombrement stérique lié au groupement Boc a rendu impossible la protection des atomes d'azote dans le cas des composés *ortho*-disubstitués **12aa**, **12h**, **12i** et **12y** (entrées 18-21). Pour ces raisons, un autre groupement protecteur répondant aux spécificités précédemment définies à dû être envisagé.

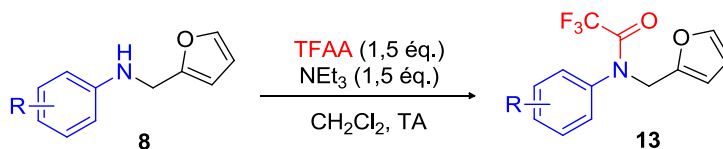
III.3.3.2 Protection par l'anhydride trifluoroacétique (TFAA)

Un rapide aperçu de la bibliographie nous a permis d'opter pour le groupement trifluoroacétamide.²⁶⁸ En effet, ce groupement protecteur est peu encombrant et peut être clivé aussi bien en milieu basique qu'en milieu acide. Les produits d'amination réductrice **8** ont ainsi été

²⁶⁸Wuts PGM, Greene TW. Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Fourth Edition . Wiley 2006.

mis à réagir avec l'anhydride trifluoroacétique (TFAA), en présence de triéthylamine (NEt₃) dans le dichlorométhane, à température ambiante (Tableau 35).²⁶⁹

Tableau 35 : Protection de la fonction amine par l'anhydride trifluoroacétique.



Entrée	R	<i>N</i> -furanylméthylamines	Rendement isolé (%)
1 ^a	<i>o</i> -CONH ₂	8y	45
2	<i>o</i> -CF ₃	8i	51
3	<i>o</i> -Cl	8h	92
4 ^b	<i>o</i> -OH	8e	72
5	<i>o</i> -COOH	8z	44
6	<i>m</i> -COOH	8p	62
7	<i>p</i> -COOH	8m	72
8	2-COOH, 5-Cl	8aa	48
9	2-COOH, 4-Cl	8ab	68

a : le produit **13y** obtenu sous forme cyclisé suite à une réaction intramoléculaire. b : dans le cas de l'aminophénol *ortho*-substitué **8e**, réaction engagée avec 3 éq. de TFAA et 3 éq. de NEt₃. Les fonctions amine et alcool ont pu être protégées, ce qui a été confirmé par LRMS. Néanmoins, après traitement du brut réactionnel après réaction, la fonction alcool s'est rapidement déprotégée. Le produit **13e** obtenu est donc protégé seulement sur la seule fonction amine, ce qui a été confirmé par HRMS et IR (bande OH présente).

Ce protocole s'est révélé particulièrement efficace car après seulement une nuit à température ambiante, la réaction entre les *N*-furanylméthylamines **8** et le TFAA a conduit à l'obtention des produits **13** (entrées 1-4). Néanmoins, dans le cas des dérivés aminés de l'acide benzoïque (entrées 5-9), les réactions ont dû être prolongées jusqu'à 24 h.

Fait intéressant, la réaction entre le TFAA et le dérivé **8y** (*o*-CONH₂) a conduit à l'obtention d'un produit cyclisé suite à la réaction de condensation entre l'atome d'azote de la fonction benzamide et le carbonyle du groupement protecteur (Figure 102). Cette réaction

²⁶⁹Barrett AGM, Lana JCA. Selective acylation of amines using 18-crown-6. *J Chem Soc Comm* 1978; **221**: 471-2.

intramoléculaire a déjà été décrite dans la littérature et exploitée pour la synthèse de molécules anti-inflammatoires, les quinazolinones.²⁷⁰

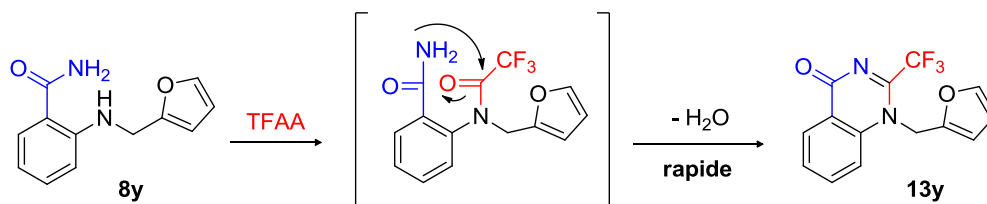


Figure 102 : Formation du composé cyclique 13y via une réaction de cyclisation intramoléculaire.

Concernant l'aminophénol **8e** (*o*-OH), les fonctions amine et alcool ont pu être protégées, ce qui a été confirmé par LRMS (Figure 103).

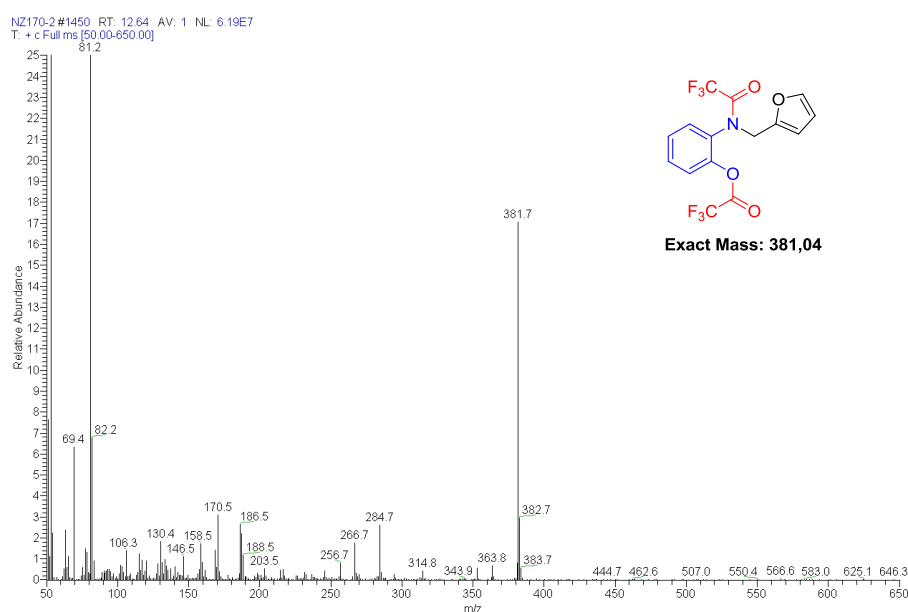


Figure 103 : Spectre de masse GC (LRMS) du composé obtenu après protection des fonctions amine et alcool du composé **8e.**

Néanmoins, la fonction alcool s'est rapidement déprotégée lors du traitement du brut réactionnel. Ainsi, le produit **13e** protégé sur sa seule fonction amine a-t-il été finalement obtenu, ce qui a été confirmé par analyse HRMS et IR (bande OH présente). En conséquence, une stratégie de protection spécifique du composé **8e** a donc dû être mise au point.

²⁷⁰Ozaki KI, Yamada Y, Oine T, Ishizuka T, Iwasawa Y. Studies on 4(1*H*)-Quinazolinones. 5. Synthesis and anti-inflammatory activity of 4(1*H*)-Quinazolinone derivatives. *J Med Chem* 1985; **28**: 568-76.

III.3.3.3 Protection de l'aminophénol *ortho*-substitué **8e**

Afin de pouvoir protéger les fonctions amine et alcool du composé **8e**, nous avons opté pour l'utilisation du diphosgène,²⁷¹ équivalent liquide du phosgène gazeux. La réaction de ce dernier avec le composé **8e** conduit à la formation du composé cyclique **14e**, avec libération d'une molécule de phosgène, selon le mécanisme suivant (Figure 104) :

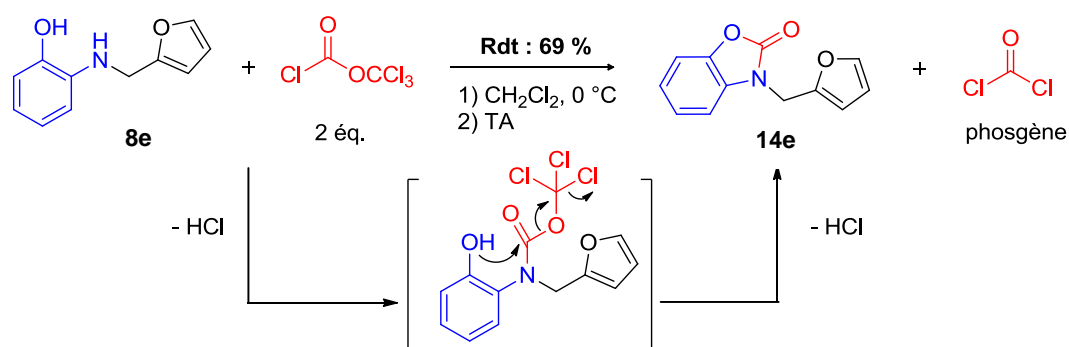


Figure 104 : Réaction entre le composé **8e et le diphosgène et mécanisme de formation du composé **14e**.**

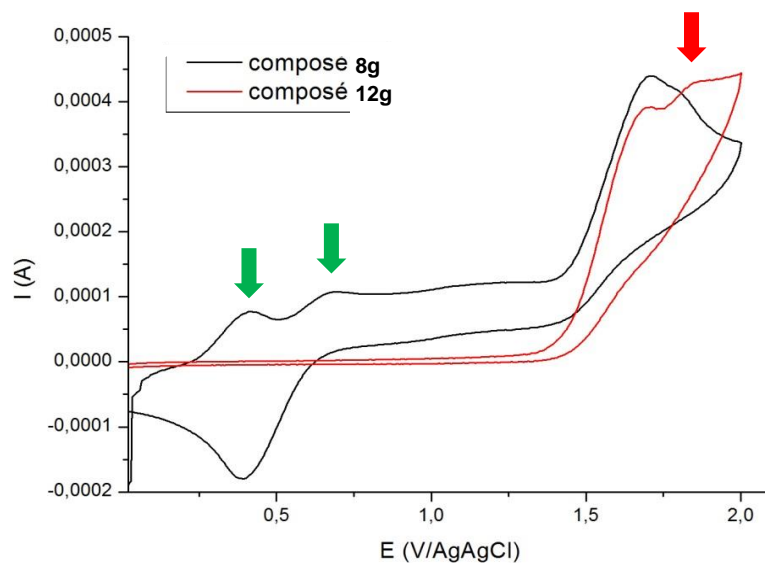
Suivant ce protocole, le composé **14e** a été isolé avec un rendement de 69 %.

III.3.4 Oxydation anodique sélective des noyaux furane

III.3.4.1 Etude de voltampérométrie cyclique

Suite à la protection de la fonction amine (et éventuellement phénol) des produits d'amination réductrice **8**, une étude voltampérométrique a été menée afin de s'assurer de son efficacité sur l'oxydation sélective des noyaux furane. Ayant précédemment montré que le composé **8g** (*p*-OH) était le plus facilement oxydable de sa série (Cf.III.3.2.2.2), une étude comparée avec son dérivé di-protégé **12g** a été réalisée.

²⁷¹ Nakane M, Masami T, Ito F et al. Preparation of anti allergy/anti-inflammatory 4,5,6,7-tetrasubstituted benzoxazolones. *Eur Pat Appl* 1991; 0409484.



Conditions : composés **8g** ou **12g** (0,1 mmol), NEt_4BF_4 (2 mmol), vitesse de balayage 300 mV/s, électrode de carbone graphite, MeOH (20 mL), potentiels *E* exprimés en V/AgAgCl.

Figure 105 : Voltampérommes des composés 8g (courbe noire) et 12g (courbe rouge).

Le voltampéromme du composé **8g** a mis en évidence deux pics d'oxydation à 0,41 et 0,69 V/ AgAgCl (flèches vertes) correspondant respectivement à l'oxydation des fonctions phénol (pour laquelle est observé un pic retour) et amine. Un troisième pic, survenant à un potentiel plus élevé de 1,71 V/ AgAgCl, a été attribué à l'oxydation du noyau furane.

Le voltampéromme du composé **12g**, a simultanément mis en évidence la disparition des deux premiers pics (ainsi que la réversibilité qui y était associée) et l'apparition d'un nouveau – au-delà du pic d'oxydation du furane – à 1,85 V/AgAgCl (flèche rouge). Ce dernier pic a été attribué à l'atome d'azote protégé sous forme de carbamate. Très logiquement, le pic attribué au noyau furane est resté inchangé. Cette étude a donc permis de confirmer l'efficacité de la protection des atomes d'azote et la possibilité de procéder sélectivement à l'oxydation des noyaux furane.

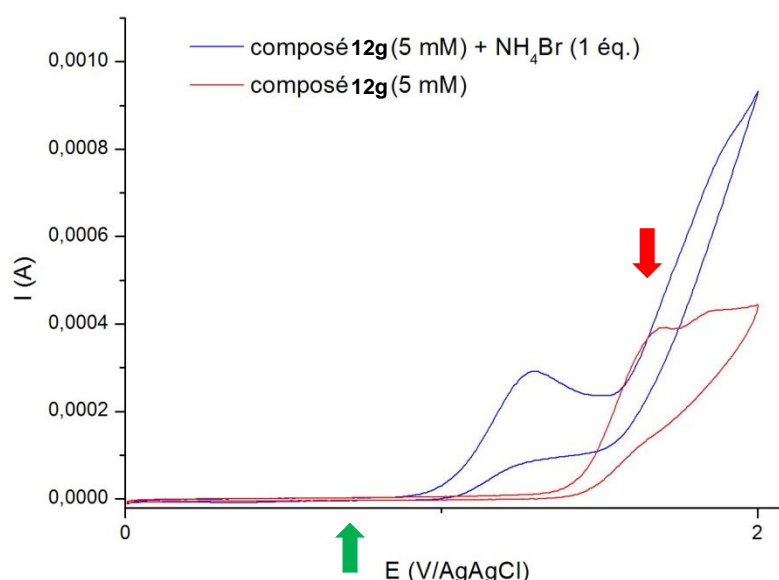
III.3.4.2 Oxydation chimique vs. oxydation électrochimique indirecte

Comme mentionné précédemment, si les oxydations chimique et électrochimique indirecte des noyaux furane recourent à la même espèce oxydante (en l'occurrence, au dibrome), ces deux méthodes se distinguent toutefois de par la nature du milieu qu'elles génèrent. Alors que l'oxydation chimique est acidifiante, la méthode électrochimique indirecte (lorsqu'elle est

menée en monocompartiment) permet de conserver un milieu neutre, les protons libérés lors de l'oxydation étant en effet réduits à la cathode.

La sensibilité à l'acidité des groupements protecteurs installés sur les produits d'amination-réductrice **8** a donc d'emblée exclu une oxydation des noyaux furane selon un processus chimique. De fait, l'oxydation sélective des noyaux furane ne pouvait donc être menée que par voie électrochimique indirecte.

Pour s'assurer de la faisabilité de l'oxydation électrochimique indirecte de nos substrats **12-14**, l'étude voltampérométrique du composé **12g** a été poursuivie. L'oxydation de ce composé a été comparée avec et sans ions bromure (Figure 106).



Conditions : NH₄Br et/ou composé **12g** (0,1 mmol), NEt₄BF₄ (2 mmol), vitesse de balayage 300 mV/s, électrode de carbone graphite, MeOH (20 mL), potentiels E exprimés en V/AgAgCl.

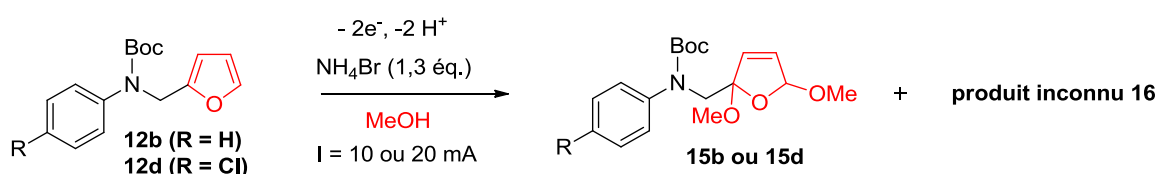
Figure 106 : Voltampéromogrammes du composé 12g avec (courbe bleu) et sans ions bromure (courbe rouge).

En présence d'ions bromure, le voltampéromogramme du composé **12g** indique simultanément la disparition du pic retour des ions bromure (flèche verte, Figure 106) ainsi que celle du pic d'oxydation du noyau furane (flèche rouge). Ce comportement, caractéristique d'une catalyse redox, a conforté l'idée de procéder à l'oxydation sélective des noyaux furane des composés **12-14** par médiation redox.

III.3.4.3 Oxydation anodique

Les réactions d'électrolyse ont été réalisées dans le méthanol, à température ambiante, dans une cellule non divisée avec des électrodes en carbone graphite, en présence de 1,3 équivalents de bromure d'ammonium (NH₄Br). Dans un premier temps, il a été procédé à l'électrolyse des composés **12b** et **12d**, aux intensités imposées de 10 et 20 mA. Suivies par CPG, les réactions ont été prolongées jusqu'à consommation complète des substrats de départ (Tableau 36).

Tableau 36 : Réactions d'oxydation indirecte des composés 12b et 12d en faisant varier l'intensité imposée.



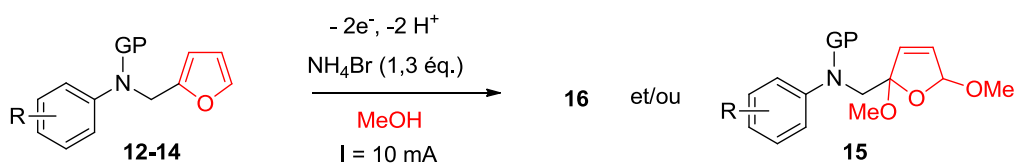
entrée	R	réactifs	I (mA)	F.mol ⁻¹	Rendement faradique (%) ^a
1			20	5,0	40
2	H	12b	10	2,5	80
3			20	5,0	40
4	Cl	12d	10	2,5	80

Conditions : composés **12** (1 g), MeOH (25 mL), NH₄Br (1,3 éq.), électrode de carbone graphite. a : la disparition des réactifs **12** est suivie par CPG.

La formation des composés **15b** et **15d** a bien été confirmée par l'analyse LRMS. Par ailleurs, il ressort de cette étude que les rendements faradiques étaient les meilleurs en travaillant à basse intensité. Ainsi à 20 mA, la totalité des réactifs a été consommée après un passage de 5 F.mol⁻¹ (entrées 1 et 3), donnant un rendement faradique de 40 %. En travaillant avec une intensité imposée de 10 mA (entrées 2 et 4), le rendement faradique passe à 80 %.

Il est à noter également la formation au cours de la réaction d'un sous-produit **16**, obtenu sous la forme d'un mélange de diastéréomères et à hauteur d'environ 20 % de rendement. L'élucidation structurale de ce composé ainsi que son mécanisme de formation seront abordés plus loin (Cf.III.3.4.4).

Sur la base de ces premiers essais, l'oxydation anodique des composés **12-14** a été réalisée à une intensité imposée de 10 mA. Les réactions ont été suivies par CPG jusqu'à consommation totale des réactifs et la formation des di-acétals **15** a été contrôlée par LRMS (Tableau 37).

Tableau 37 : Réactions d'oxydation indirecte des composés 12-14.

Entrée	R	réactifs	F.mol ⁻¹	Rendement faradique (%) ^a
1	<i>m</i> -Cl	10c	2,5	80
2	<i>o</i> -CN	10j	2,5	80
3	<i>m</i> -CN	10o	2,5	80
4	<i>p</i> -CN	10k	2,5	80
5	<i>m</i> -CONH ₂	10r	2,5	80
6	<i>p</i> -CONH ₂	10s	2,5	80
7	<i>o</i> -CH ₃	10v	3,5	57
8	<i>m</i> -CH ₃	10x	5,0	40
9	<i>p</i> -CH ₃	10a	2,5	80
10	<i>m</i> -CF ₃	10r	2,5	80
11	<i>p</i> -CF ₃	10n	2,5	80
12	<i>m</i> -OBoc	10f	3,0	67
13	<i>p</i> -OBoc	10g	5,0	40
14	<i>o</i> -Cl	11h	3,0	67
15	<i>o</i> -CF ₃	11i	3,0	67
16	<i>o</i> -CONH ₂ ^b	11y	3,5	57
17	<i>o</i> -COOH	11z	3,5	57
18	<i>m</i> -COOH	11p	2,5	80
19	<i>p</i> -COOH	11m	2,5	80
20	2-COOH, 5-Cl	11aa	5,0	40
21	2-COOH, 4-Cl	11ab	5,0	40
22	<i>o</i> -OH ^b	12e	2,5	80

Conditions : composés **12-14** (1 g), MeOH (25 mL), NH₄Br (1,3 éq.), électrode de carbone graphite, Intensité imposée de 10 mA. a : la disparition des réactifs **12-14** est suivie par CPG. b : les produits **13y** et **14e** sont sous forme cyclisée.

Par cette méthode, la préparation des composés **15** attendus a été réalisée. Selon le substituant porté par le phényle, le rendement faradique varie entre 40 et 80 %.

Par ailleurs, comme dans le cas des composés **12b** et **12d**, il a été constaté la formation d'un sous-produit de réaction **16**. Fait intéressant, ce sous-produit n'était formé que lorsque la fonction amine était protégée par le groupement *tert*-butyloxycarbonyle (série de composés **12**). L'isolement du produit inconnu issu du composé **12b** a permis d'en identifier la structure.

III.3.4.4 Elucidation structurale d'un sous-produit de réaction

III.3.4.4.1 Propositions successives de structures

Après électrolyse, l'analyse du mélange réactionnel par GC-MS a montré la formation de deux autres produits de formule brute identique et de structure très voisine (tr très proches : $tr_1 = 20,77$ min et $tr_2 = 21,27$ min). La structure initialement envisagée correspondait à un produit de réarrangement de type *Aza*-Achmatowicz^{253,254} conduisant au composé suivant :

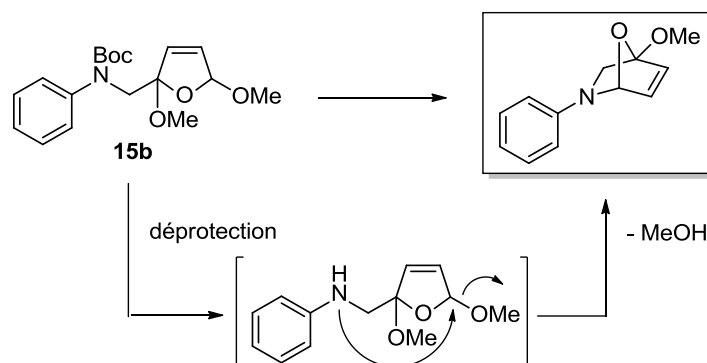


Figure 107 : Première proposition de structure du composé 16b et possible mécanisme de formation.

Cette structure n'était cependant pas en accord avec la LRMS ni même avec la GC, ce composé ne pouvant en effet être envisagé comme existant sous la forme de deux diastéréoisomères. De même, elle ne correspondait pas à la formule brute que la HRMS, la LRMS et la microanalyse avaient établie comme étant $C_{13}H_{13}NO_4$.

Par ailleurs, alors que l'analyse IR ($\nu = 1750\text{ cm}^{-1}$) confirmait la présence d'un groupement carbonyle, la RMN ^{13}C permettait quant à elle de préciser les choses en proposant la présence d'une fonction carbonate ou uréthane (carbone quaternaire à $\delta = 151,9$ et $151,8$ ppm pour les deux diastéréoisomères).

Dès lors, une autre proposition de structure pouvait être faite. Il s'agissait en l'occurrence d'une structure tricyclique portant un carbone spiranique et pour laquelle, deux diastéréomères pouvaient être envisagés (Figure 108).

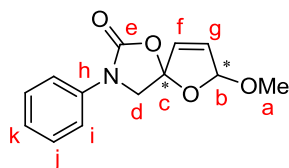


Figure 108 : Deuxième proposition de structure du composé 16b.

III.3.4.4.2 Mécanisme de formation du produit secondaire

Dans la mesure où les sous-produits de réaction **16** n'ont été observés qu'à partir des composés protégés par le groupement Boc, il est apparu évident que ce groupement devait nécessairement participer à la formation de ces produits secondaires.

Par ailleurs, un aperçu de la bibliographie indique que le groupement Boc est effectivement capable dans certains cas, de piéger des espèces intermédiaires électrophiles après départ d'*iso*-butène et de conduire à la formation de composés cycliques.^{272,273,274,275,276,277} Un mécanisme comparable peut être proposé pour expliquer la formation des composés **16** à partir des composés **15** (Figure 109).

²⁷² Boto A, Hernandez R, Montoya A, Suarez E. Synthesis of alkaloids from aminol derivatives by b-fragmentation of primary alkoxy radicals. *Tetrahedron Lett* 2004; **45**: 1559-63.

²⁷³ Harrison TJ, Dake GR. An expeditious, high-yielding construction of the food aroma compounds 6-acetyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine and 2-acetyl-1-pyrroline. *J Org Chem* 2005; **70**: 10872-4.

²⁷⁴ Aydillo C, Jimenez-Oses G, Busto JH, Peregrina JM, Zurbano MM, Avenoza A. Theoretical evidence for pyramidalized bicyclic serine enolates in highly diastereoselective alkylations. *Chem Eur J* 2007; **13**: 4840-8.

²⁷⁵ Aydillo C, Avenoza A, Busto JH, Jimenez-Oses G, Peregrina JM, Zurbano MM. α -alkylation versus retro-O-Michael/ γ -alkylation of bicyclic N,O-acetals: an entry to α -methylthreonine. *Tetrahedron Asymmetry* 2009; **19**: 2829-34.

²⁷⁶ Sirijindalert T, Hansuthirakul K, Rashatasakhon P, Sukwattanasinitt M, Ajavakom A. Novel synthetic route to 1,4-dihydropyridines from β -amino acrylates by using titanium (IV) chloride under facile conditions. *Tetrahedron* 2010; **66**: 5161-7.

²⁷⁷ Fenster E, Fehl C, Aubé J. Use of a tandem Prins/Friedel-Craft reaction in the construction of the indeno-tetrahydropyridine core of the haouamine alkaloids: Formal synthesis of (-)-Haouamine A. *Org Lett* 2011; **13**: 2614-7.

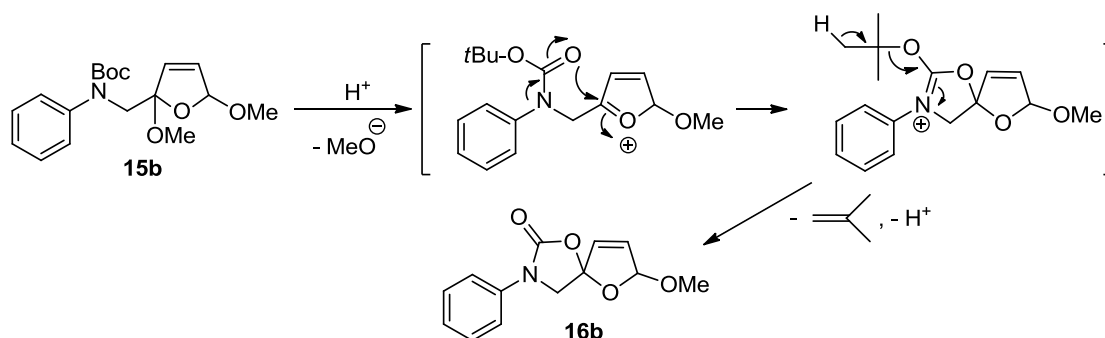


Figure 109 : Mécanisme de formation plausible du composé 16b.

Dans notre cas, il est possible que l'acidité localement générée à la surface de l'anode soit suffisante pour induire la formation de ces composés.

III.3.4.4.3 Confirmation de structure

La structure **16b** a pu être confirmée par RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY, HSQC et HMBC). Par ailleurs, il convient de signaler que, du fait de la présence des deux diastéréomères, tous les signaux RMN sont dédoublés avec une faible variation de déplacement chimique. Pour aider à sa compréhension, l'analyse qui va être présentée ici s'appuiera sur l'interprétation des signaux d'un seul des deux diastéréoisomère (même si l'analyse a bien été effectuée et confirmée pour l'autre diastéréomère).

Une analyse rapide du spectre HSQC montre qu'il n'y a pas de proton acide dans la molécule et qu'il y a trois carbones quaternaires ($\delta = 151,8$; $136,6$ et $107,7$ ppm).

Le point de départ de cette étude est le méthyle extérieur à la molécule d'intégration 3H présentant un déplacement chimique caractéristique d'un méthoxy (Figure 110), correspondant donc au méthyle a.

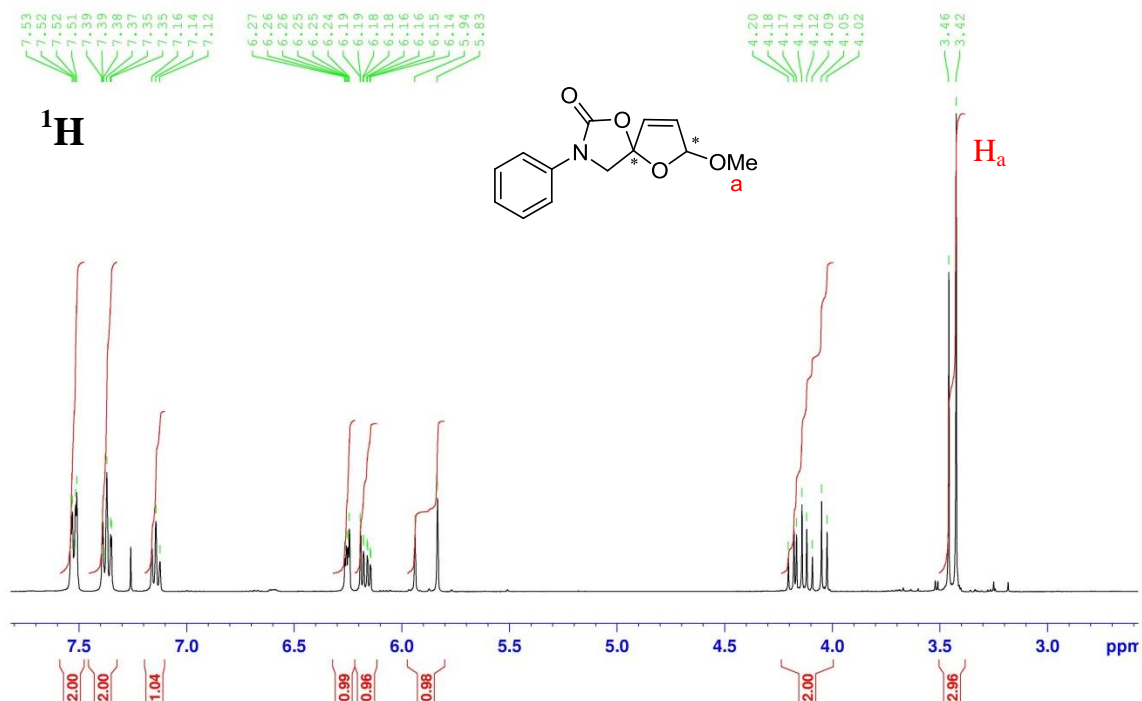


Figure 110 : Spectre RMN ^1H du composé 16b.

Ensuite le déplacement chimique ^1H de ce méthoxy a été corrélé à celui du ^{13}C de ce même méthoxy dans le spectre HSQC (Figure 111, point A).

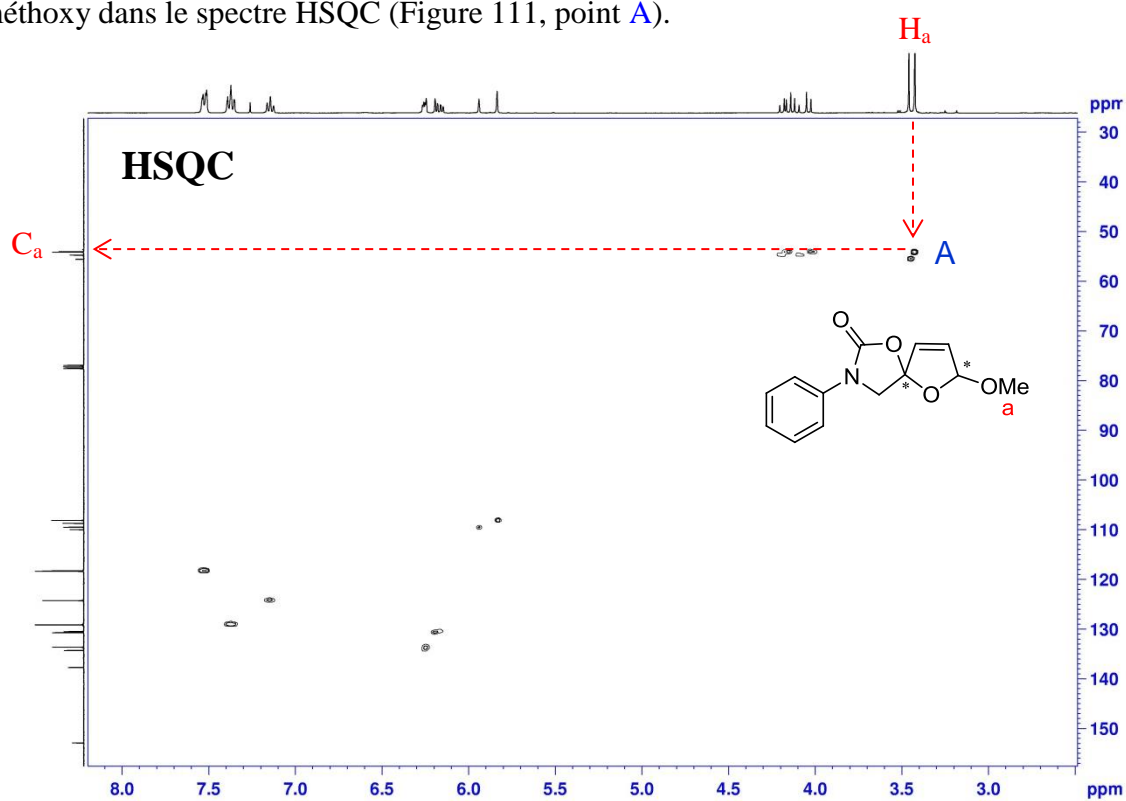


Figure 111 : spectre HSQC du composé 16b.

Afin d'attribuer le signal du proton b, la HMBC a été mise à contribution (Figure 112). En partant du ^{13}C du méthoxy, une tache de corrélation apparaît avec un signal C-H intégrant pour 1H en RMN ^1H à $\delta = 5,83$ ppm (point B).

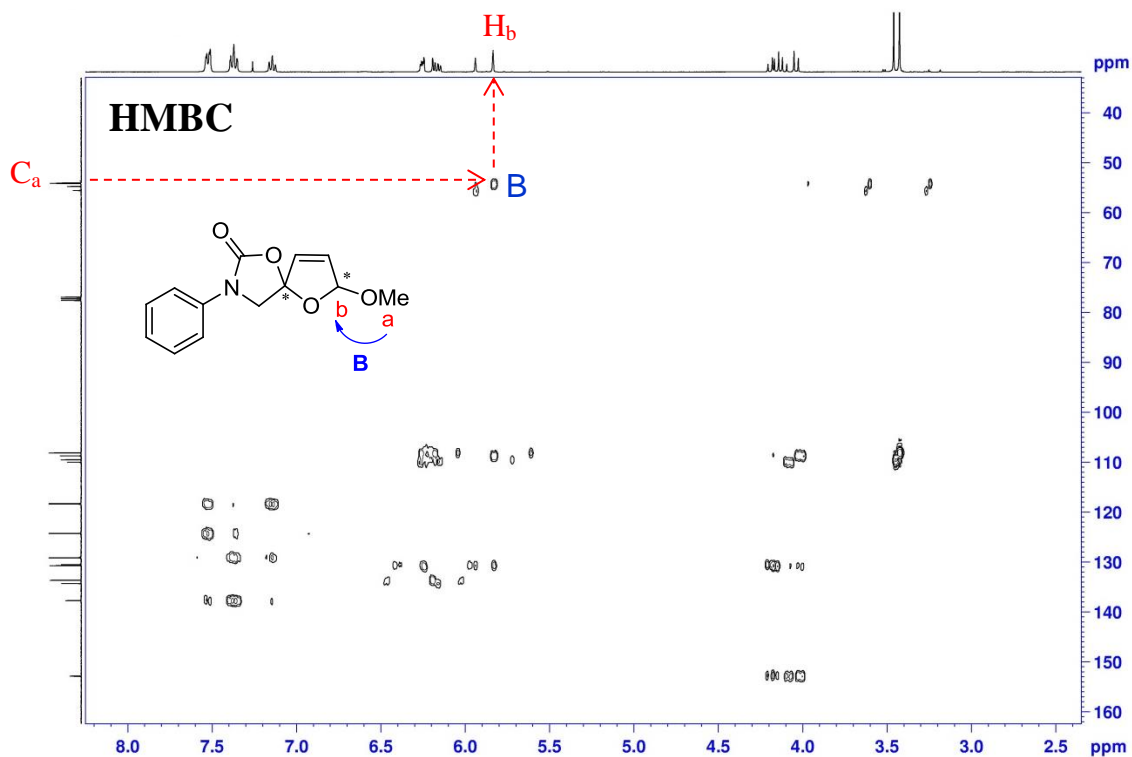


Figure 112 : Spectre HMBC du composé 16b.

Ce proton b est corrélé en COSY avec le proton g éthylénique (Figure 113, point C).

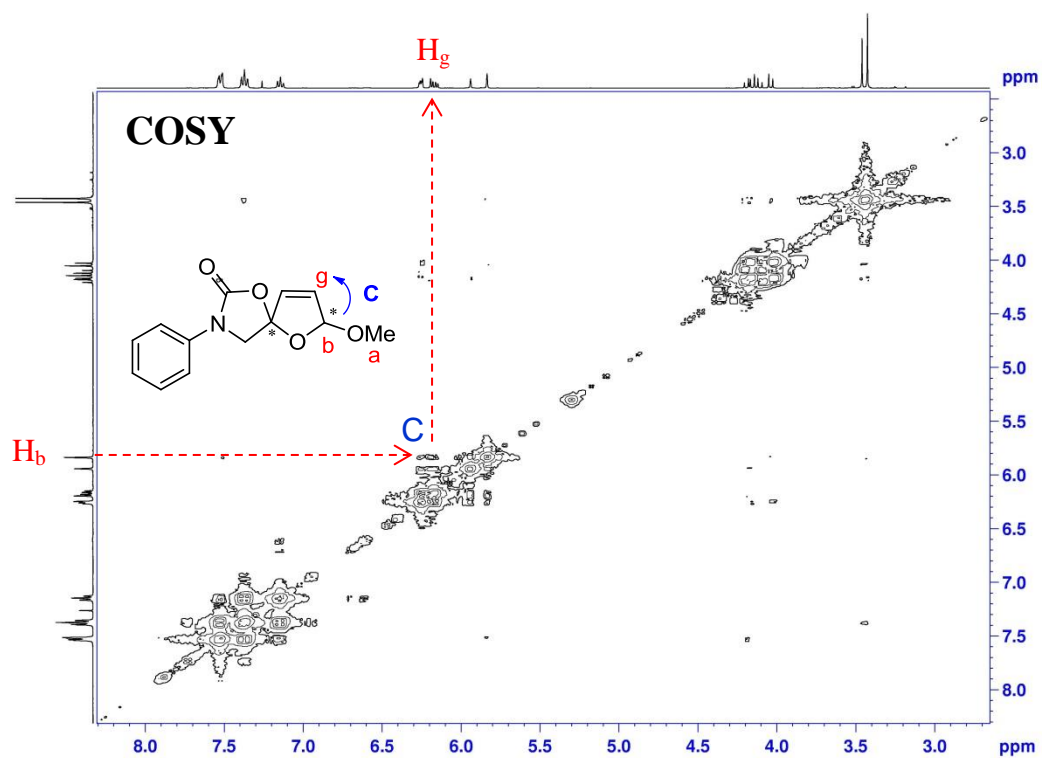


Figure 113 : Spectre COSY du composé 16b.

Le proton g éthylénique est lui-même couplé avec un autre proton (Figure 114, point D) avec une constante de couplage $J = 8,2$ Hz typique d'une configuration cis de double liaison. Cette constante de couplage est également retrouvée dans le signal à $\delta = 6,19$ ppm ; que l'on peut donc attribuer au proton f (point E).

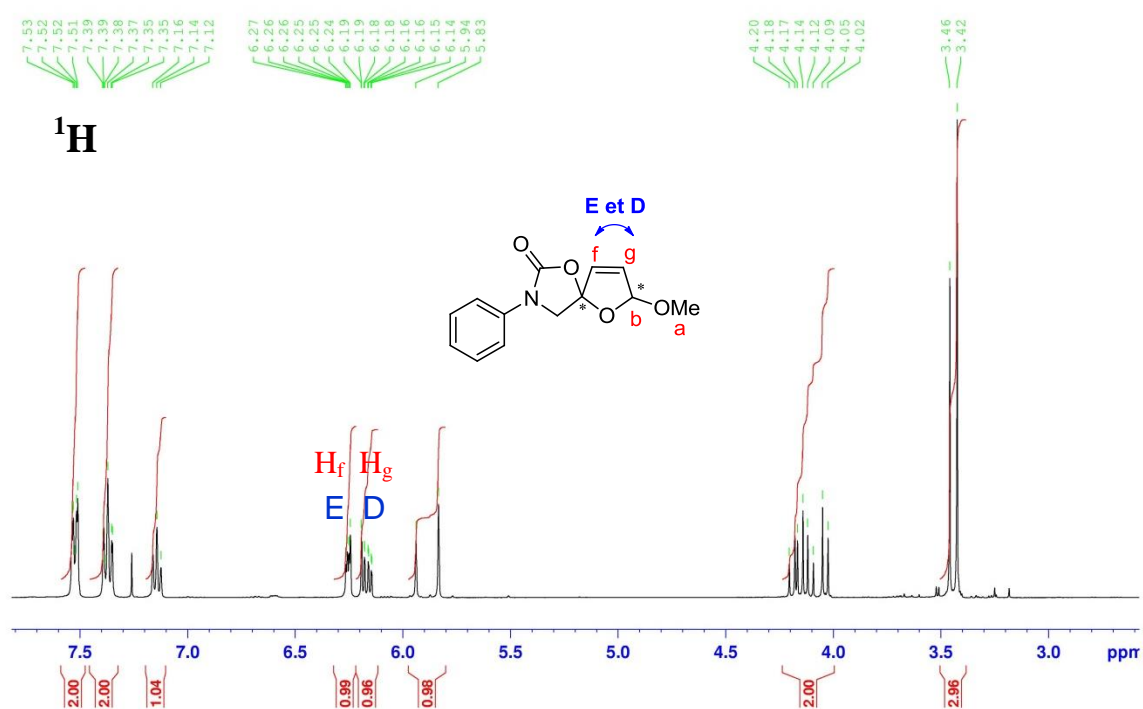
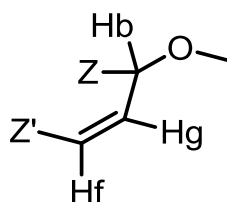


Figure 114 : Spectre RMN ^1H du composé 16b.

A ce stade il convient de rappeler que d'après leurs figures de couplage, les hydrogènes b, g, et f sont entourés par Z et Z' qui sont des atomes ne portant pas d'hydrogène. Z et Z' peuvent donc être soit des atomes de carbone quaternaire soit des hétéroatomes (O ou N selon la formule brute).



Ces diverses possibilités ont été étudiées en évaluant les déplacements chimiques ^1H et ^{13}C . L'hypothèse retenue est celle proposant $Z = \text{oxygène}$ et $Z' = \text{carbone quaternaire}$.

Une lecture fine de la HMBC montre que H_b , H_g et H_f corrèlent également avec le même carbone quaternaire c (Figure 115, point **F**) de déplacement chimique $\delta = 108,8$ ppm. Ce carbone quaternaire est corrélé à 2 hydrogènes d en HMBC (point **G**). Ces protons d sont corrélés en HMBC au carbone quaternaire d 'un carbonyle e (Figure 115, point **I**) dont le déplacement chimique est caractéristique d'un uréthane.

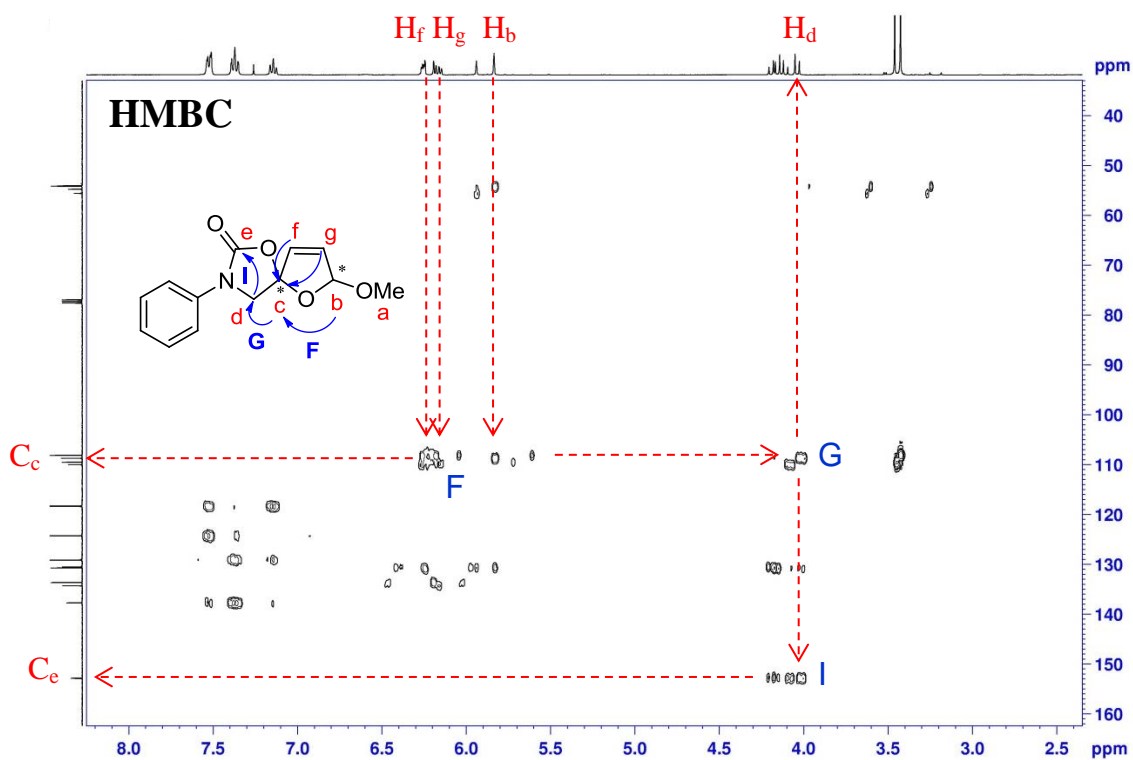


Figure 115 : Spectre HMBC du composé 16b.

La présence en HSQC d'une seule tache de corrélation pour ces deux atomes d'hydrogènes (Figure 116, point **H**) indique qu'ils sont diastéréotopes, portés par un même carbone d.

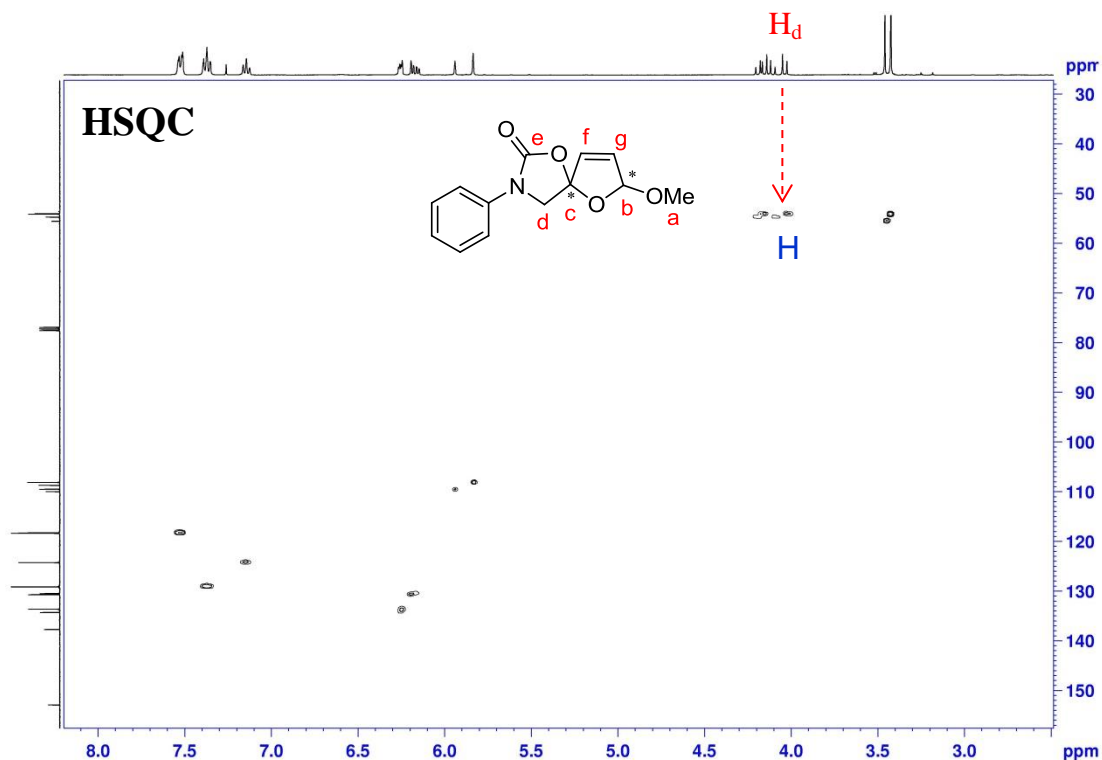


Figure 116 : Spectre HSQC du composé 16b.

Le déplacement chimique du carbone quaternaire **c** étant relativement élevé ($\delta = 108,8$ ppm), il s'agit d'un carbone lié à 2 hétéroatomes. De plus, la zone des déplacements chimiques supérieurs à 7 ppm indique clairement la présence d'un groupement phényle (t 1H ; t 2H ; d 2H), qui ne peut être lié qu'à l'atome d'azote. Le nombre d'insaturation et/ou de cycle (égal à 7) nous permet d'en conclure que le carbone **c** est un carbone spiranique. Ainsi, à ce stade, deux structures **A** et **B** peuvent être envisagées (Figure 117).

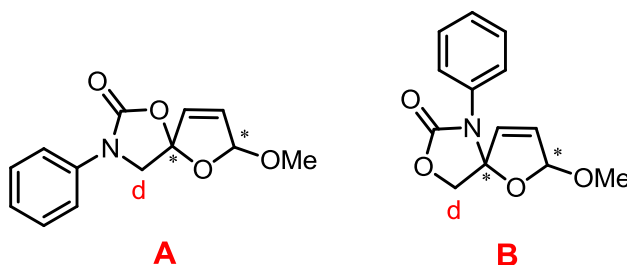


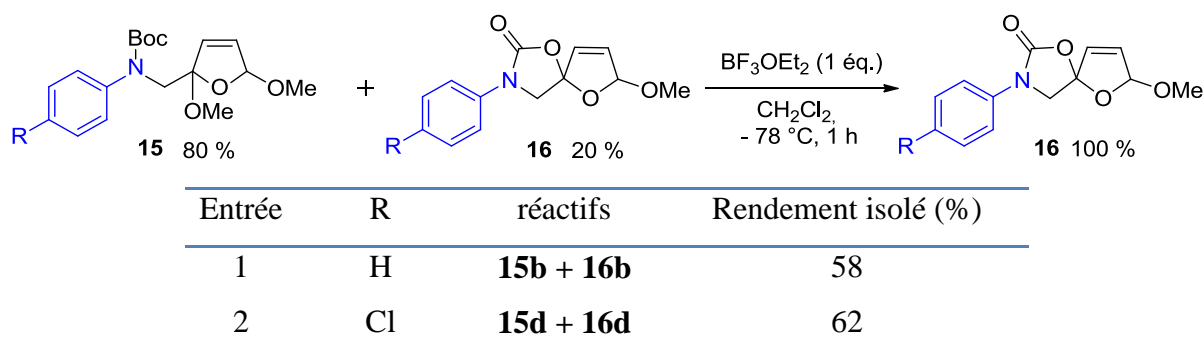
Figure 117 : Deux structures possibles du composé 16b.

Prenant en compte la structure du composé de départ **15b**, il apparaît toutefois que seule la proposition **A** est « chimiquement » cohérente au contraire de la proposition **B**.

III.3.4.4.4 Préparation des composés 16

Il est à noter que les produits de réarrangement peuvent être obtenus quantitativement après traitement du brut réactionnel d'électrolyse par un équivalent d'éthérate de trifluoroborane (BF_3OEt_2) dans le dichlorométhane, à -78°C (Tableau 38).

Tableau 38 : Traitement du brut réactionnel après électrolyse par BF_3OEt_2 .

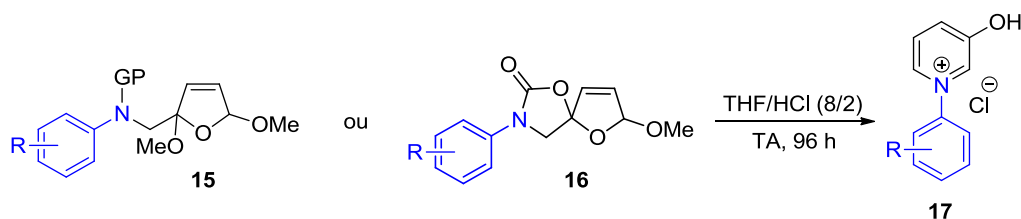


Comme il sera démontré (Cf.III.3.5.1), ces dérivés spiraniques peuvent conduire après hydrolyse aux pyridiniums ciblés dans notre étude. Ils constituent donc de potentielles protoxines et en tant que tel, peuvent – au même titre que les dérivés diméthoxylés **15** – être envisagés comme précurseurs d'inducteurs chimiques parkinsoniens.

III.3.5 Accès aux 3-hydroxypyridiniums

III.3.5.1 Hydrolyse acide

Le brut réactionnel issu de l'oxydation anodique est dissous dans un mélange THF/HCl (6 N) 80/20 (Tableau 39). Le tout est laissé sous agitation à température ambiante, pendant 96 h. Après évaporation du mélange de solvants, la formation des *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés est confirmée par RMN ^1H du brut réactionnel.

Tableau 39 : Traitement acide du brut réactionnel après électrolyse conduisant à la formation des *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés.

Entrée	R	réactifs	Rendement isolé (%)
1	<i>o</i> -CH ₃	15v + 16v	32
2	<i>m</i> -CH ₃	15x + 16x	38
3	<i>p</i> -CH ₃	15a + 16a	36
4	<i>m</i> -OH	15f + 16f	42
5	<i>p</i> -OH	15g + 16g	31
6	H	16b	13
7	<i>m</i> -CONH ₂	15t + 16t	---
8	<i>p</i> -CONH ₂	15s + 16s	12
9	<i>o</i> -Cl	15h	11
10	<i>m</i> -Cl	15c + 16c	---
11	<i>p</i> -Cl	16d	12
12	<i>o</i> -CF ₃	15i	---
13	<i>m</i> -CF ₃	15r + 16r	5
14	<i>p</i> -CF ₃	15n + 16n	17
15	<i>o</i> -CN	15j + 16j	32
16	<i>m</i> -CN	15o + 16o	5
17	<i>p</i> -CN	15k + 16k	21
18	<i>o</i> -COOH	15z	---
19	<i>m</i> -COOH	15p	---
20	<i>p</i> -COOH	15m	---
21	2-COOH, 5-Cl	15aa	---
22	2-COOH, 4-Cl	15ab	---

--- : dégradation

de groupements électrodonneurs, l'équilibre apparaît très déplacé vers la formation du sel (sens 2). A l'inverse, les groupements électroattracteurs, en rendant l'atome d'hydrogène de la fonction alcool très acide, déplacent l'équilibre vers la forme zwitterionique (sens 1). De fait, selon la nature du (des) substituant(s) présent(s) sur le phényle, il est vraisemblable que les composés **17** présentent une gamme de pK_a relativement large.

Conséquence des propriétés acido-basiques des pyridiniums 3-hydroxylés **17**, l'existence de deux formes sous lesquelles ces composés doivent être envisagés selon le pH du milieu dans lequel ils se trouvent. Ces deux formes ont d'ailleurs été mises en évidence par RMN 1H pour le composé **17f** (Figure 120).

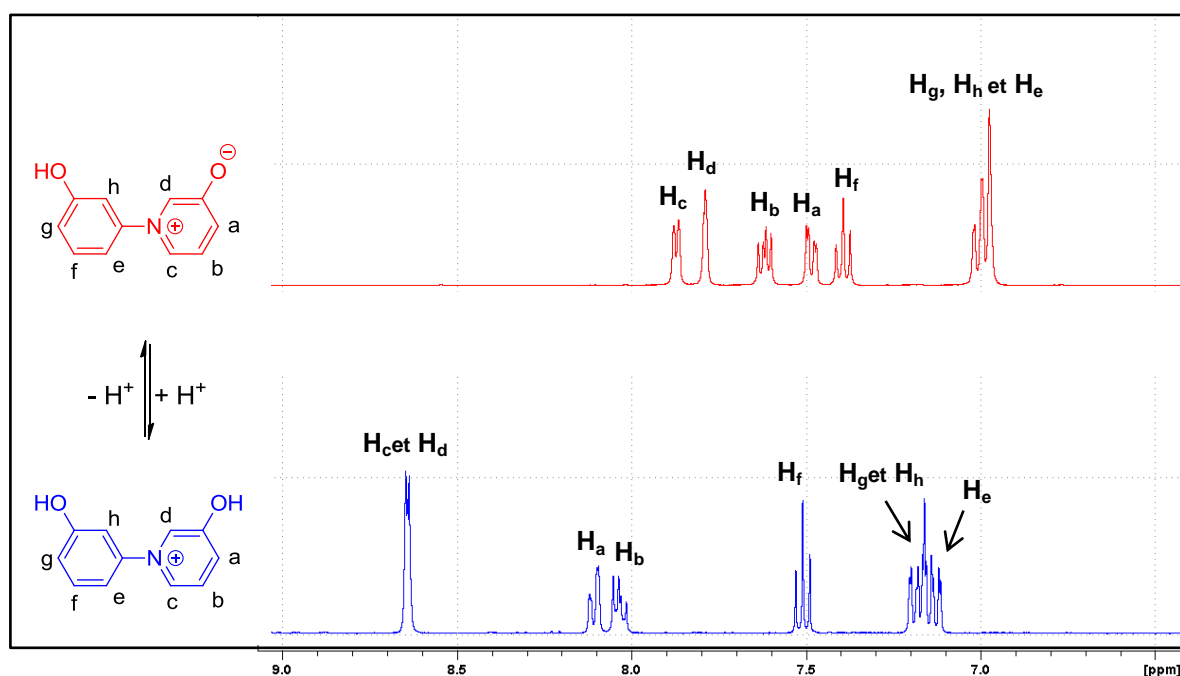


Figure 120 : Spectre RMN 1H du composé **17f en milieu acide (spectre bleu) et basique (spectre rouge).**

Conséquence plus inattendue de ces propriétés acido-basiques, le risque de perdre ces composés nous est apparu dans la mesure où – pour certains cas de cette série – la forme zwitterionique a semblé être en effet associée à une certaine instabilité. Cette perte de produit a ainsi pu être constatée lors de tentatives de purification (sur gel de silice, sous forme de zwitterion) de pyridiniums substitués par des groupements électroattracteurs et est vraisemblablement à l'origine des faibles rendements obtenus (Tableau 39).

Partie III : Evaluation
toxicologique des *N*-
aryle pyridiniums

Partie III : Evaluation toxicologique des N-aryle pyridiniums

Le travail exposé dans la suite de ce manuscrit s'attache à l'évaluation toxicologique des N-aryle pyridiniums dont la synthèse a été décrite en partie II. Pour ce faire, le pouvoir inhibiteur sur le complexe I de ces composés sera évalué (chapitre I). Ensuite, l'effet de ces molécules sur la viabilité cellulaire et la production d'EROs sera mesuré (chapitre II).

Cette évaluation permettra dans un premier temps de s'assurer que les toxicités éventuellement observées correspondent effectivement à des toxicités caractéristiques d'inducteurs chimiques parkinsoniens (spécificité dopaminergique, induction de la mortalité cellulaire par induction d'un stress oxydant consécutif d'une inhibition du complexe I).

Dans un deuxième temps, il s'agira d'identifier le/les paramètre(s) permettant de moduler l'activité de ces composés. Enfin, une étude de relation structure/activité basée sur l'ensemble des résultats obtenus sera présentée.

I. Etude d'inhibition du complexe I

I.1 Dosage de l'activité du complexe I

I.1.1 Réaction d'oxydation du NADH en NAD⁺

Le complexe I possède un rôle central dans la CRM où il catalyse le transfert de deux électrons depuis le NADH jusqu'à l'ubiquinone (ou coenzyme Q, notée CoQ), lequel transfert s'accompagne de l'expulsion de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire (Figure 121).²⁷⁸

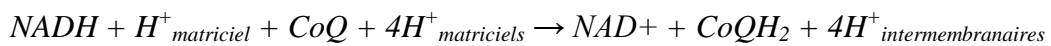


Figure 121: Réaction d'oxydo-réduction se produisant au niveau du complexe I.

Toutes les réactions d'oxydo-réduction se produisent dans le domaine hydrophile du complexe I. Sur son site, le NADH lié au complexe I transfère tout d'abord deux électrons à la flavine mononucléotide (FMN) du groupe prosthétique de l'enzyme (Figure 122).

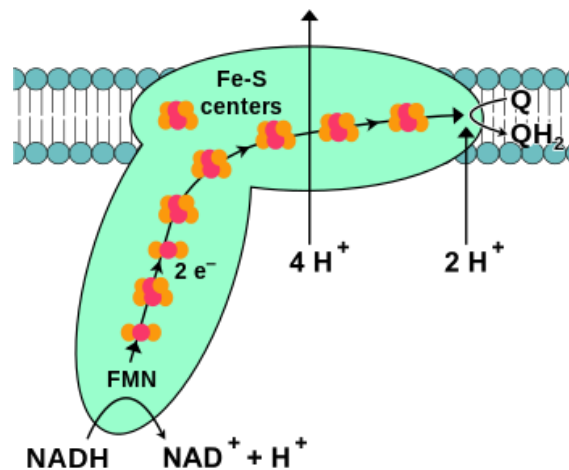


Figure 122: Complexe I de la CRM.

Par la suite, les électrons sont transférés à travers la FMN par l'intermédiaire d'une série de centres fer-soufre (Fe-S) jusqu'à l'ubiquinone. Ce flux d'électrons amène à un changement

²⁷⁸Efremov RG, Baradaran R, Sazanov LA. The architecture of respiratory complex I. *Nature* 2010; **465**: 441-5.

d'état d'oxydation de la protéine, induisant des changements de conformation et provoque l'expulsion de quatre protons hors de la matrice mitochondriale.²⁷⁹ En gagnant ces deux électrons, l'ubiquinone est quant à elle réduite en ubiquinol (CoQH₂).²⁸⁰

I.1.2 Dosage spectrophotométrique de l'activité du complexe I

La cinétique de disparition du NADH permet de suivre l'évolution de l'activité du complexe I et ainsi d'évaluer l'effet de potentiels inhibiteurs. Cette cinétique est suivie par spectrophotométrie suivant la loi de Beer-Lambert. Dans la mesure où seul le NADH absorbe à 340 nm (Figure 123), il est donc possible de doser sa disparition à cette longueur d'onde. Ainsi, une diminution d'absorbance à 340 nm indique que le NADH est consommé et donc que le complexe I catalysant son oxydation en NAD⁺ est fonctionnel.

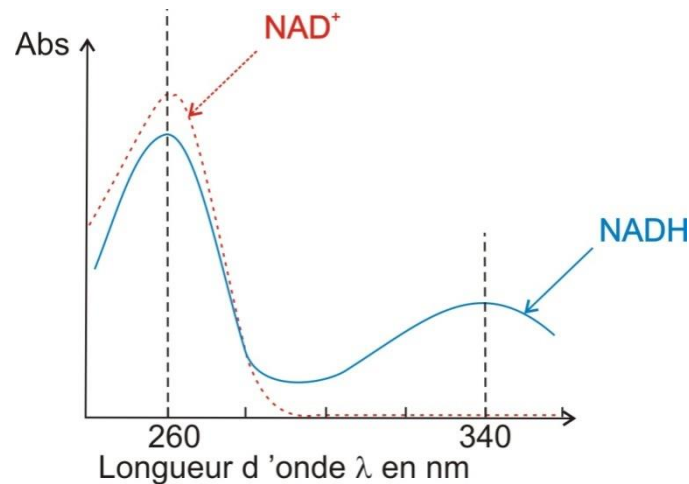


Figure 123 : Spectres UV du NADH (forme réduite) et du NAD⁺ (forme oxydée).

I.1.3 Résultats et discussion

Dans une première étape, 100 µg d'extraits de mitochondries sont introduits dans le tampon hypotonique pendant 2 minutes de manière à faire éclater les membranes des mitochondries et accéder à la chaîne respiratoire.²⁸¹ S'en suit les ajouts successifs de BSA, de décylubiquinone, de KCN et de NADH, ce dernier étant introduit juste avant le début des mesures. Dans ce mélange, la BSA permet d'optimiser l'activité du complexe I, la décylubiquinone remplace

²⁷⁹ Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Biochemistry, New York, *WH Freeman & Company* 2006.

²⁸⁰ Voet JD, Voet GJ, Pratt WC. Mitochondrial ATP synthesis, Chapitre 18, *Wiley* 2008.

²⁸¹ Chretien D, Bénit P, Chol M, Lebon S, Rötig A, Munnich A, Rustin P. Assay of mitochondrial respiratory chain complex I in human lymphocytes and cultured skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **301**: 222-4.

l'accepteur naturel des électrons du complexe I qu'est l'ubiquinone^{281,282} et les ions cyanure servent d'inhibiteur du complexe IV de la CRM. Les premières mesures réalisées permettent de définir les témoins positif et négatif (Figure 124).

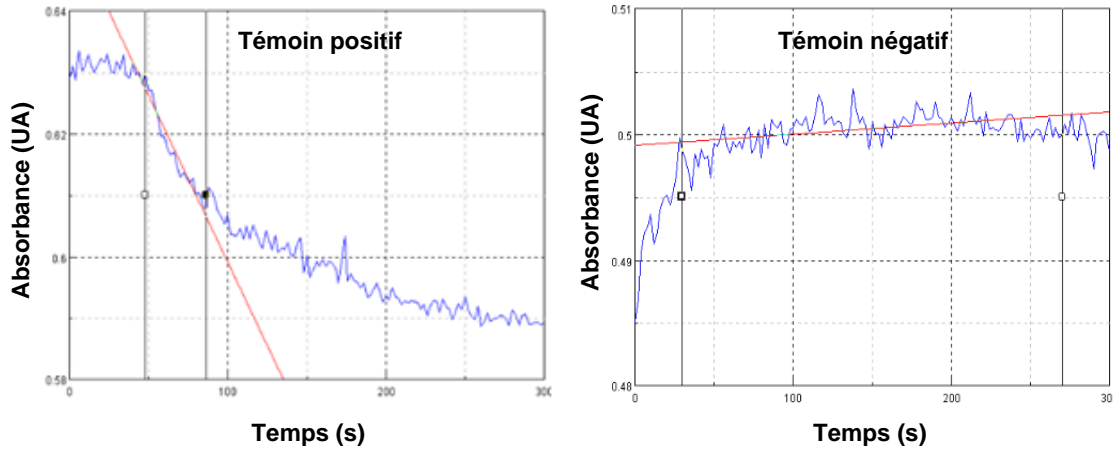


Figure 124 : Témoins positif et négatif de l'activité du complexe I mesurés en suivant la cinétique de consommation du NADH à 340 nm dans 100 µg d'extraits mitochondriaux issus de cortex de rat.

Le témoin positif (Figure 124) présente la cinétique de disparition du NADH des extraits seuls : il rend ainsi compte de la fonctionnalité du complexe I. On observe une courbe sigmoïde qui peut être décomposée en 3 phases :

- premier plateau, correspondant à reconnaissance du substrat par l'enzyme,
- exponentielle, correspondant à l'oxydation du NADH,
- deuxième plateau, indiquant la saturation du site actif du NADH.

La pente de la partie exponentielle renseigne sur l'activité de l'enzyme.

Le témoin négatif est réalisé en présence de 20 µM de roténone, un inhibiteur connu du complexe I. La pente nulle constatée indique l'absence de consommation du NADH et par suite, l'inhibition par la roténone de l'activité enzymatique.

L'activité du complexe I a ensuite été évaluée en présence de nos composés. Malheureusement, cette technique a très vite montré certaines limitations en raison de la co-absorbance à 340 nm du NADH et de certains de nos composés. La faible quantité de NADH (~ 160 µM) présente dans le milieu d'analyse comparée à celle du composé à évaluer (1 mM), n'a pas permis d'en mesurer les variations de manière fiable.

²⁸² Anssen AJM, Trijbels FJM, Sengers RCA, Smeitink JAM, Al E. Spectrophotometric Assay for Complex I of the Respiratory Chain in Tissue Samples and Cultured Fibroblasts. *Clinical Chem* 2007; **53**: 729-34.

I.2 Dosage de l'activité des complexes I à III

Sur mitochondries entières, il avait été montré par polarographie que le **PF** inhibait le complexe I de la CRM, alors même qu'il n'avait aucune activité sur l'activité des complexes II à V (Cf. Partie I. Chap2.IV.3.1.3). De même, la mesure de l'activité NADH oxydoréductase du complexe I par spectrophotométrie avait permis de confirmer l'action spécifique du **PF** sur ce complexe mitochondrial. A l'image de tous les analogues du MPP⁺ décrits dans la littérature (Cf. Partie I.Chap2.III.3.1), il en avait été conclu que le **PF** était spécifique du complexe I de CRM.

Profitant de cette spécificité, nous avons donc décidé de tester l'effet de nos composés sur l'activité des complexes I à III, le complexe III étant utilisé comme une enzyme auxiliaire permettant de révéler l'activité de l'enzyme d'intérêt : le complexe I. Dans la présentation qui va suivre des résultats obtenus avec nos pyridiniums, nous interpréterons donc l'inhibition des complexes I-III comme étant celle du complexe I.

I.2.1 Réaction de réduction du cytochrome c oxydé

Comme mentionné précédemment, le complexe I catalyse la réduction de l'ubiquinone (CoQ) en ubiquinol (Figure 121). Le complexe III quant à lui, catalyse la réoxydation d'une molécule d'ubiquinol, réaction couplée à la réduction de deux molécules de cytochrome c oxydé (Figure 125).

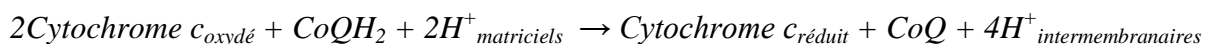


Figure 125 : Réaction d'oxydo-réduction se produisant au niveau du complexe III.

Contrairement à l'ubiquinone qui transporte deux électrons par molécule, le cytochrome c ne transporte qu'un seul électron par molécule. Ainsi, le mécanisme réactionnel du complexe III se déroule-t-il en deux étapes au cours de chacune desquelles deux protons sont libérés dans l'espace intermembranaire (Figure 126).

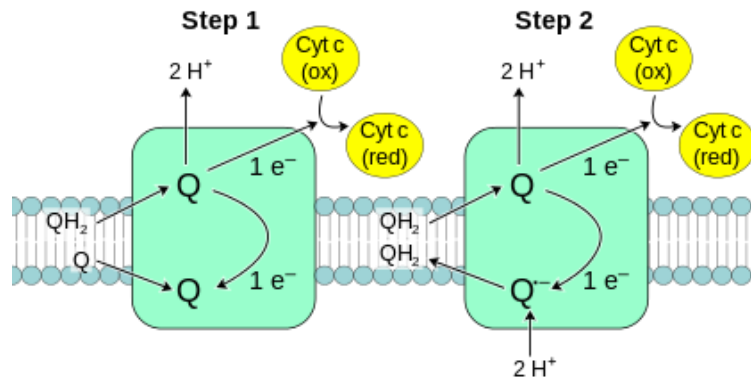


Figure 126: Complexe III de la CRM.

I.2.2 Dosage spectrophotométrique de l'activité des complexes I à III

La cinétique de formation du cytochrome c réduit permet de suivre l'évolution de l'activité des complexes I à III et ainsi d'évaluer l'effet de potentiels inhibiteurs. Pour ce faire, les mesures sont effectuées à 550 nm, longueur d'onde caractéristique du cytochrome c réduit. Les courbes d'absorbance obtenues en fonction du temps permettent ensuite d'évaluer la vitesse d'apparition du cytochrome c réduit et par suite, l'activité des complexes I-III dans 100 µg d'extraits mitochondriaux de rat. Ayant à évaluer des analogues du **PF**, nous attribuerons – pour les raisons qui ont été précédemment exposées – les effets observés à une inhibition du complexe I.

I.2.3 Résultats et discussion

La cinétique d'apparition du cytochrome c réduit est suivie à 37 °C par spectrophotométrie à 550 nm pendant 300 secondes. Pour ce faire, les mitochondries réparties dans plusieurs aliquotes sont décongelées puis soumises à des ultrasons pendant 30 secondes avant le début des mesures. Le cytochrome c oxydé, le KCN, la roténone et le NADH sont ensuite ajoutés dans la cuve de référence. Dans la cuve de mesure, la roténone est remplacée par le composé à tester. Les premières mesures réalisées permettent de définir les témoins positif et négatif (Figure 127).

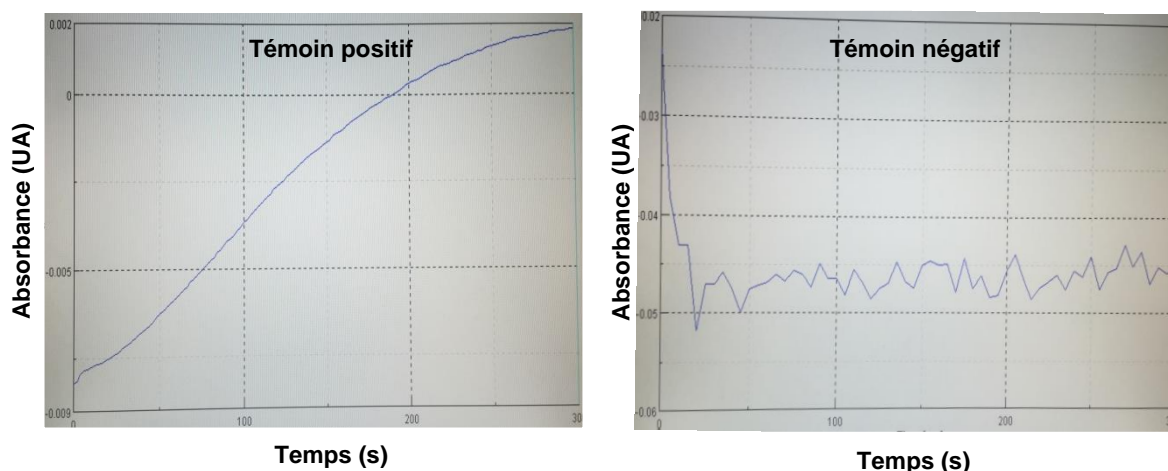


Figure 127 : Témoins positif et négatif de l'activité des complexes I à III mesurés en suivant la cinétique de formation du cytochrome c réduit à 550 nm dans 100 μ g d'extraits mitochondriaux issus de cortex de rat.

Le témoin positif présente la cinétique de réduction du cytochrome c oxydé en présence d'extraits mitochondriaux seuls (dans la cuve de mesure), rendant ainsi compte de la fonctionnalité du complexe I. La pente de la partie exponentielle renseigne sur l'activité de l'enzyme.

Le témoin négatif est réalisé en présence de 20 μ M de roténone dans la cuve de mesure. Une pente nulle est constatée correspondant à l'absence d'apparition de cytochrome c réduit et traduisant l'inhibition du complexe I par la roténone.

Dans la suite de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'activité du complexe I en présence de nos composés. En série *N*-aryle pyridinium non hydroxylé, l'influence de deux principaux facteurs a été constatée :

- la lipophilie des composés testés,
- l'encombrement stérique autour de l'atome d'azote.

Une différence d'activité entre les pyridiniums non hydroxylés et 3-hydroxylés a également été observée

1.2.3.1 Influence de la lipophilie sur l'inhibition du complexe I

En série *N*-aryle pyridinium non hydroxylé, la présence de substituants lipophiles semble favoriser l'inhibition du complexe I (Figure 128). En effet, une diminution significative de l'activité du complexe I a été constatée en présence des composés porteurs de groupements lipophiles (CH_3 , CN , Cl , CF_3). Une explication raisonnable à cet effet des substituants

lipophiles pourrait être une plus grande affinité des pyridiniums pour le site d'inhibition hydrophobe.

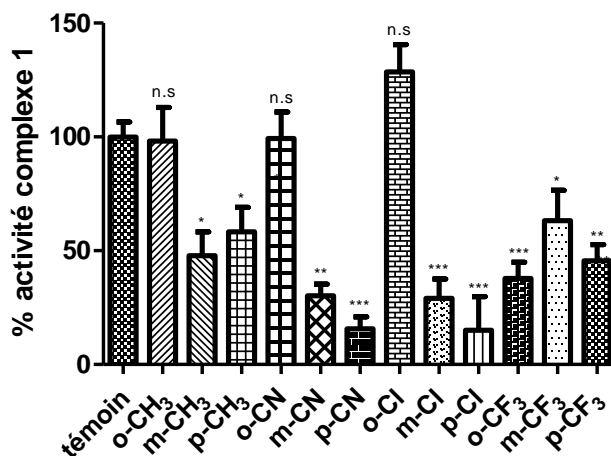


Figure 128: Activité des complexes I à III après exposition aux *N*-aryle pyridiniums non hydroxylés substitués par des groupements lipophiles (1 mM).

A l'inverse, les composés porteurs de substituants polaires (CONH₂, *o*- et *m*-OH) n'ont présenté aucune (ou une très faible) activité vis-à-vis du complexe I (Figure 129).

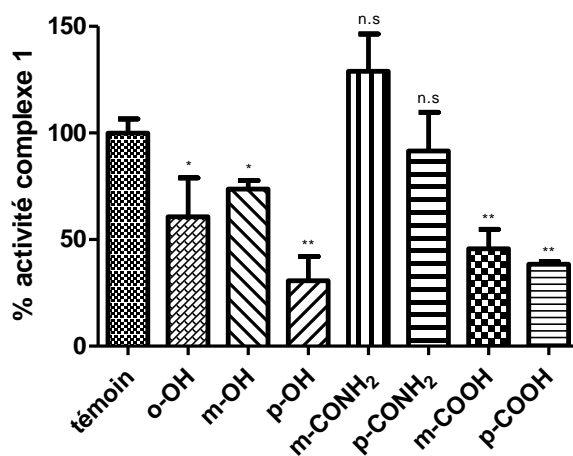


Figure 129 : Activité des complexes I à III après exposition aux *N*-aryle pyridiniums non hydroxylés substitués par des groupements polaires (1 mM).

Il est intéressant de noter que les composés pouvant exister sous forme zwitterionique, c'est-à-dire porteurs de substituants susceptibles de se déprotonner (*p*-OH et COOH) inhibent le complexe I. Ainsi le fait que ces composés puissent exister sous des formes zwitterioniques, globalement moins polaires que les formes cationiques, pourrait expliquer – au moins en partie – cette inhibition.

I.2.3.2 Influence de l'encombrement stérique sur l'inhibition du complexe I

Nous avons pu constater l'influence de l'encombrement stérique autour de l'atome d'azote sur l'inhibition du complexe I. En effet, les composés substitués par un groupement volumineux en position *ortho* (CH₃, CN et Cl) n'ont induit aucune inhibition du complexe I (Figure 128).

Il est intéressant de noter que les études de relation structure/activité rapportées dans la littérature font le lien entre cette notion d'encombrement stérique dans la structure de certains inhibiteurs et la faible activité inhibitrice de ces mêmes composés. D'une manière générale, cette réduction d'effet a été attribuée à une perte de coplanarité entre les deux systèmes aromatiques conduisant à une diminution de la délocalisation de la charge positive. Néanmoins, dans le cas de nos *N*-aryle pyridiniums, la délocalisation de la charge positive entre les deux cycles aromatiques n'est pas possible. Ainsi, cette perte d'affinité pour les sites d'inhibition du complexe I serait bien due à un phénomène purement stérique, ce qui n'a, à notre connaissance jamais été décrit dans la littérature.

Enfin, il est intéressant de noter que dans le cas du composé *ortho*-substitué par un groupement trifluorométhyle (CF₃), l'inhibition du complexe I est maintenue bien qu'à l'évidence, ce substituant soit très encombrant (Figure 128). Dans ce cas, il est possible que l'effet favorable lié à la lipophilie apportée par ce groupement surpasse l'effet défavorable apporté par l'encombrement stérique. De ce fait la position du groupement trifluorométhyle n'aurait pas d'influence dès lors que l'accès au site hydrophobe est favorisé.

I.2.3.3 Influence du substituant 3-hydroxyle sur l'inhibition du complexe I

Dans la suite de cette étude, nous nous sommes intéressés à évaluer l'influence du groupement hydroxyle en position 3 du cycle pyridinium, en comparant l'inhibition du complexe I induite en série *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés à celle induite par leur équivalents non hydroxylés (Figure 130).

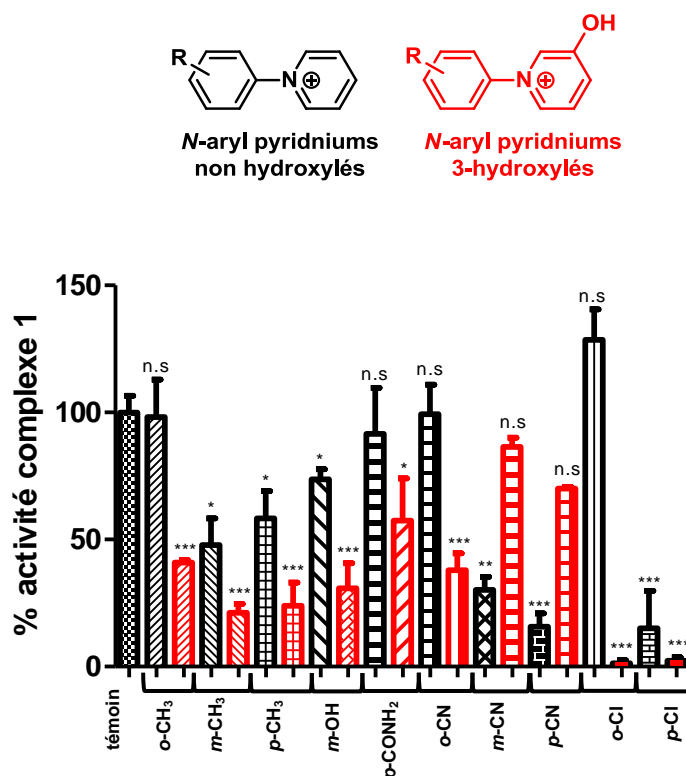


Figure 130 : Activité des complexes I à III après exposition aux *N*-aryle pyridiniums.

Cette comparaison a permis de mettre en évidence la forte influence qu'exerçait la présence du groupe hydroxyle sur l'activité du complexe I. Ainsi, à l'exception notable – et inexplicable – des composés *m*-CN et *p*-CN, tous les pyridiniums hydroxylés ont-ils présenté une capacité d'inhibition bien plus forte que leurs équivalents non hydroxylés.

Le cas des composés *o*-CN, *o*-Cl en est l'illustration. Alors qu'en série non hydroxylée ils n'induisaient aucune inhibition du complexe I (en raison vraisemblablement d'un encombrement stérique), leurs équivalents 3-hydroxylés ont induit une diminution spectaculaire de l'activité du complexe I, laquelle est ainsi passée de 100 % à 38 % (*o*-CN) et 1 % (*o*-Cl).

Selon toute vraisemblance, l'affinité pour le site d'inhibition hydrophile des composés de type pyridinium semble être le résultat de l'interaction entre le noyau pyridinium de ces composés et ce site hydrophile. Partant de cette hypothèse, il est possible que la présence du groupement 3-hydroxyle sur le noyau pyridinium permette d'augmenter cette interaction.

II. Etudes *in cellulo* : production d'EROs et viabilité cellulaire

II.1 Lignée cellulaire neuroblastique humaine SH-SY5Y

A l'origine, la lignée cellulaire SH-SY5Y est issue du troisième sous-clonage de la lignée SK-N-SH (SK-N-SH- > SH-SY- > SH-SY5- > SH-SY5Y), établie à partir d'une biopsie de moelle osseuse effectuée dans les années 70 chez un patient atteint de neuroblastome (tumeur maligne).²⁸³ Les cellules SH-SY5Y partagent de nombreuses caractéristiques biochimiques avec les neurones dopaminergiques humains. Elles ont en effet la capacité de synthétiser la DA (et la norépinephrine) et elles expriment le DAT. Elles ont également la capacité de se différencier et de développer un phénotype neuronal spécifique. Outre ces caractéristiques spécifiques, ces cellules ont la capacité d'être cultivées pendant de longues périodes et surtout en l'absence de contamination, un pré-requis pour le développement d'un modèle cellulaire *in vitro*.²⁸³ C'est sur ce modèle cellulaire qu'a été évalué le potentiel neurotoxique de nos composés.

II.2 Quantification de la production d'EROs

La production d'EROs par les cellules SH-SY5Y a été quantifiée après 72 h d'exposition à nos composés à une concentration de 1 mM. La quantité d'EROs produite a été mesurée à l'aide d'une sonde : la 2',7'-dichlorofluorescéine-diacétate (H₂DCF-DA, Figure 131).

²⁸³Xie HR, HU LS, LI GY. SH-SY5Y Human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)* 2010; **123**:1086-92.

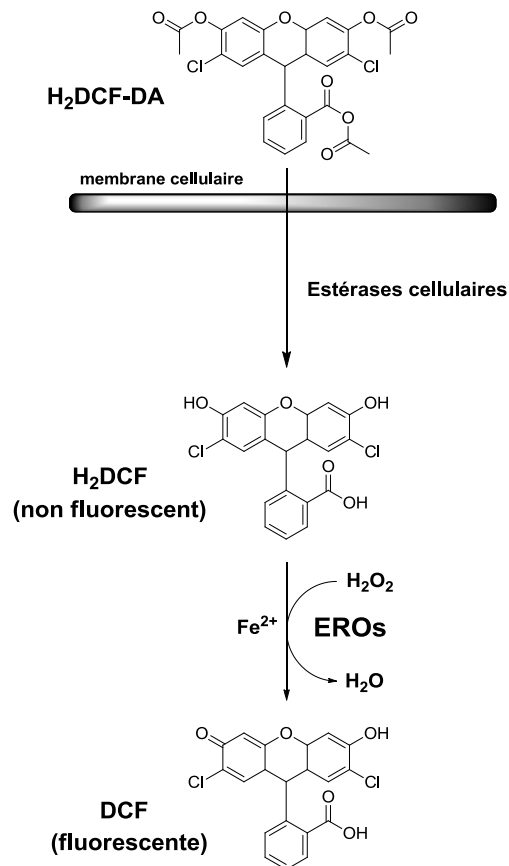


Figure 131 : Métabolisation de la H₂DCF-DA en DCF (fluorescente) en présence d'EROs.

Après désacétylation par les estérases intracellulaires et oxydation par les EROs en présence de peroxyde d'hydrogène et de Fe²⁺, la dichlorofluorescéine (DCF) est formée. La concentration de ce composé fluorescent peut être mesurée par spectrophotométrie aux longueurs d'ondes d'excitation (485 nm) et d'émission (560 nm) qui lui sont spécifiques.

II.3 Quantification de la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules SH-SY5Y a été quantifiée après 96 h d'exposition à nos composés à une concentration de 1 mM. Cette quantification a été réalisée par l'ajout d'un sel de tétrazolium : le réactif WST-8 (Figure 132).

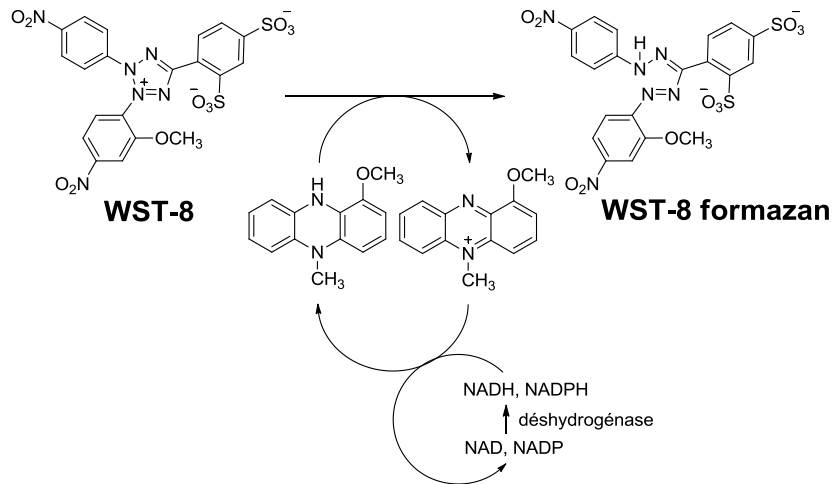


Figure 132 : Métabolisation du WST-8 en WST-8 formazan par les cellules vivantes.

Le cycle tétrazolium du WST-8 est réduit par les déshydrogénases intracellulaires des cellules vivantes actives en WST-8 formazan qui est soluble dans le milieu de culture cellulaire. La quantité de WST-8 formazan générée est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Ce WST-8 formazan peut être dosé par spectrophotométrie à 450 nm.

II.4 Résultats et discussion

Dans la suite de cette étude, nous nous sommes intéressés au potentiel neurotoxique *in cellulo* de nos composés. Il convient de rappeler qu'une inhibition du complexe I associée à une absence d'activité *in cellulo* ne peut être due qu'à une incapacité de passage membranaire et non à l'absence d'accumulation mitochondriale, dans la mesure où il a été démontré que les espèces cationiques s'accumulaient dans la mitochondrie du fait du gradient électrochimique (Cf. Partie I.Chap2.III.3.2.1). Ainsi nous avons pu constater que certains composés ne traversaient pas la membrane cellulaire. De plus, cette étude a révélé, là encore, une différence significative d'activité entre la série *N*-aryle pyridiniums non hydroxylés et la série 3-hydroxylée.

II.4.1 Influence du substituant porté par le noyau phényle dans le cas des N-aryle pyridiniums non hydroxylés

II.4.1.1 N-aryle pyridiniums ne traversant pas la membrane cellulaire

Certains pyridiniums non hydroxylés n'ont présenté aucune activité *in cellulo*, alors même qu'ils avaient démontré leur capacité à inhiber le complexe I de la CRM (Figure 133).

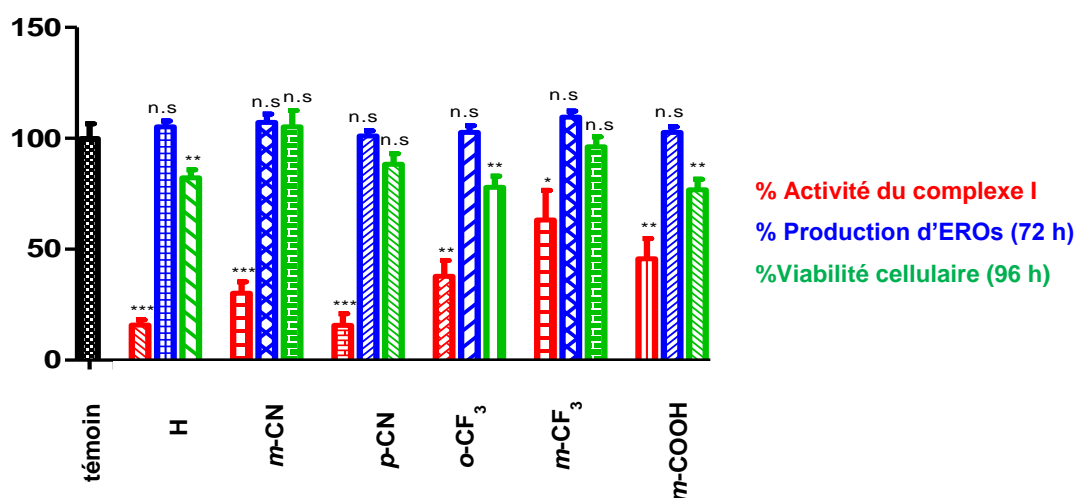


Figure 133 : Activités sur le complexe I et *in cellulo* des N-aryle pyridiniums non hydroxylés ne traversant pas la membrane cellulaire.

Cette faible activité *in cellulo* peut s'expliquer par l'incapacité des composés testés à traverser la membrane cellulaire, que ce soit de manière passive ou active. Dans le premier cas, il est à noter que l'absence de passage membranaire passif est observée y compris pour les composés portant des substituants lipophiles tel que trifluorométhyle. Dans le deuxième cas, la faible activité observée doit quant à elle être associée à une affinité extrêmement faible (voire nulle) de ces mêmes composés pour le DAT. Il est à noter que ce manque d'affinité a été constaté pour des composés portant des substituants aussi bien lipophiles qu'hydrophiles, indifféremment disposés sur l'une ou l'autre des 3 positions du noyau phényle. De fait, l'absence d'affinité pour le DAT – et par suite, d'activité *in cellulo* – constatée avec cette série de composés n'a pu être définitivement reliée à quelque élément structural probant ou propriété physico-chimique claire.

II.4.1.2 *N*-aryle pyridiniums traversant la membrane cellulaire

Au contraire de la série de composés précédemment évoquée, certains *N*-aryle pyridiniums non hydroxylés capables d'induire une inhibition du complexe I de la CRM, ont également présenté une activité *in cellulo*. Cette activité qui s'est traduite par une augmentation de la production d'EROs, associée à l'induction d'une mortalité cellulaire (Figure 134) a permis de mettre en évidence la capacité de ces composés à pénétrer la membrane cellulaire.

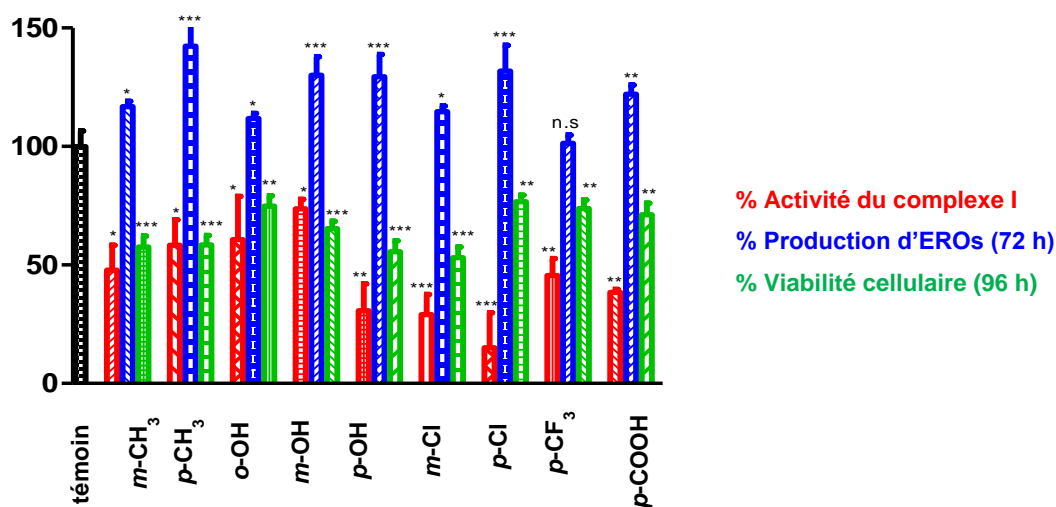


Figure 134 : Activités sur le complexe I et *in cellulo* des *N*-aryle pyridiniums non hydroxylés traversant la membrane cellulaire.

Là encore cependant, il n'a pas été possible à ce stade de nos investigations de relier cette activité à un élément structural ou à une propriété physico-chimique claire.

II.4.2 Influence du substituant 3-hydroxyle sur l'activité *in cellulo*

Il est important de rappeler que les *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés peuvent, à pH physiologique, exister sous deux formes selon la nature du substituant porté par le noyau phényle (Cf. Partie II.Chap2.III.3.5.2). Les composés porteurs de substituants électro-donneurs resteraient ainsi majoritairement sous une forme cationique, quand les composés porteurs de substituants électro-attracteurs seraient davantage sous une forme zwitterionique (Figure 119). Il convient également de rappeler que les études effectuées sur le complexe I

n'ont pas permis de mettre en évidence une différence d'activité entre ces deux formes de pyridiniums (Figure 130).

II.4.2.1 Activité des N-aryle pyridiniums 3-hydroxylés cationiques et zwitterioniques

La production d'EROs et la viabilité cellulaire ont été évaluées sur deux séries de pyridiniums 3-hydroxylés actifs sur le complexe I. La première série était constituée de pyridiniums substitués par des groupements électro-donneurs ; la deuxième, par des groupements électro-attracteurs (Figure 135).

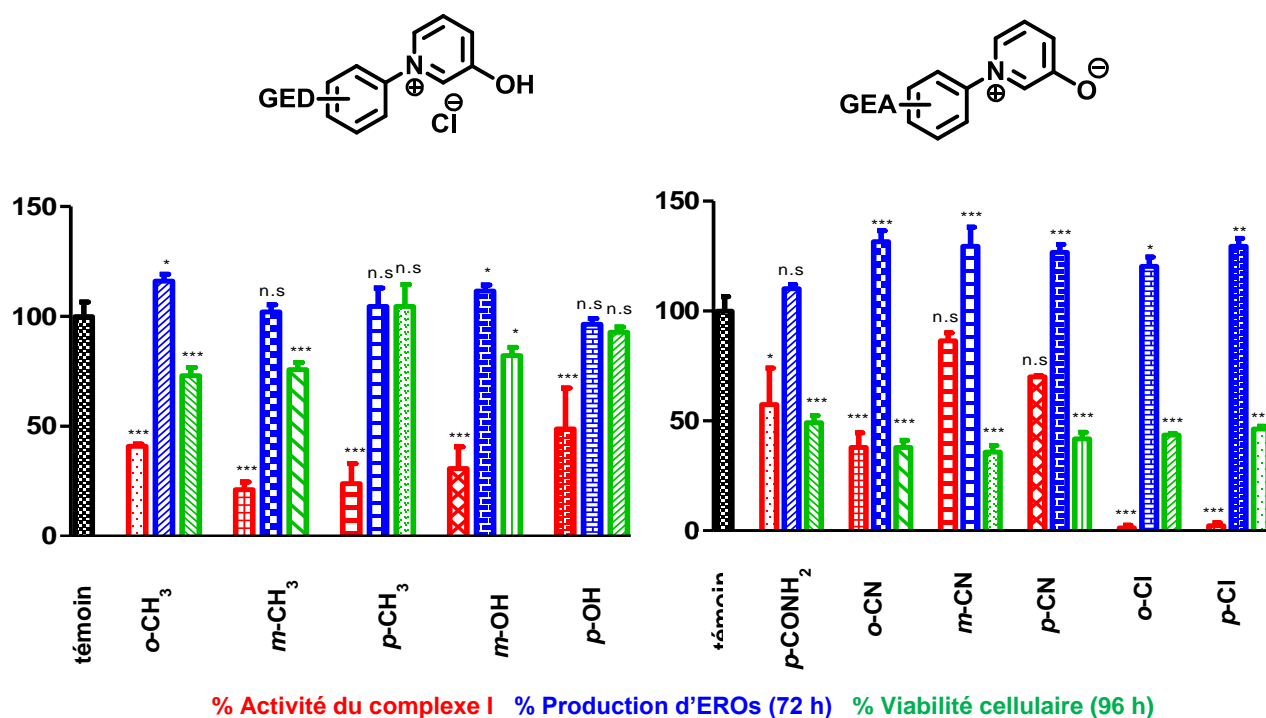


Figure 135 : Activités sur le complexe I et *in cellulo* des N-aryle pyridiniums 3-hydroxylés.

La différence d'activité *in cellulo* entre ces deux séries de composés 3-hydroxylés est particulièrement bien illustrée par comparaison des pyridiniums **17f** (*m*-OH, principalement cationique) et **17j** (*o*-CN, principalement zwitterionique), deux composés présentant une activité comparable sur le complexe I. Alors que l'effet sur la production d'EROs, de même que sur la viabilité cellulaire est resté limité avec le composé **17f**, il a en revanche été beaucoup plus significatif avec le composé **17j**, suggérant pour ce dernier un meilleur passage membranaire. Plus généralement, il est ressorti de cette étude que les pyridiniums 3-hydroxylés substitués par un groupement électro-donneur (essentiellement cationiques) tendaient à n'être que modérément (voire pas du tout) toxiques. A l'inverse, les pyridiniums

3-hydroxylés substitués par un groupement électro-attracteur (et existant donc sous une forme essentiellement zwitterionique), se sont révélés beaucoup plus efficaces pour induire l'apparition des marqueurs cellulaires attendus et caractéristiques d'une toxicité dopaminergique (Figure 135).

Il est à noter qu'en termes d'effet, ce résultat pourrait suggérer une plus grande efficacité *in cellulo* des composés zwitterioniques par rapport à ceux existant sous forme cationique. Ceci conviendrait toutefois d'être relativisé dans la mesure où en série pyridinium non hydroxylé, un composé existant à l'évidence sous forme zwitterionique à pH physiologique tel que **3p** (*m*-COOH), n'a présenté aucune activité (Figure 133). La substitution du noyau pyridinium en position 3 par un groupement hydroxylate semblerait en conséquence être un élément très favorable (quoique non déterminant, cf. Figure 134) pour l'activité *in cellulo* recherchée. Ce groupement 3-hydroxylate pourrait en l'occurrence aider à la pénétration cellulaire du fait d'une meilleure reconnaissance par le DAT (l'inactivité *in cellulo* des composés substitués par un groupement électro-donneur suggérant l'absence de passage passif avec ce type de composés).

Fait particulièrement intéressant, ces résultats permettent de faire le lien entre d'une part la capacité constatée *in vitro* de ces composés à inhiber le complexe I (Figure 128 et Figure 129) et d'autre part leur capacité *in cellulo* à induire une production d'EROs à 72 h puis la mort cellulaire à 96 h. Une cascade d'évènements se dessine donc, tendant à confirmer la pertinence de ces structures en matière d'induction spécifique de toxicité dopaminergique.

III. Conclusions et perspectives

III.1 Conclusions

III.1.1 Résumé de l'étude de relation structure/activité

Il apparait assez clairement que les modifications structurales apportées à nos composés ont permis la modulation de leur activité sur le complexe I de la CRM mais également de leur affinité pour le DAT et avec elle, leur facilité à passer la membrane cellulaire dopaminergique (Figure 136).

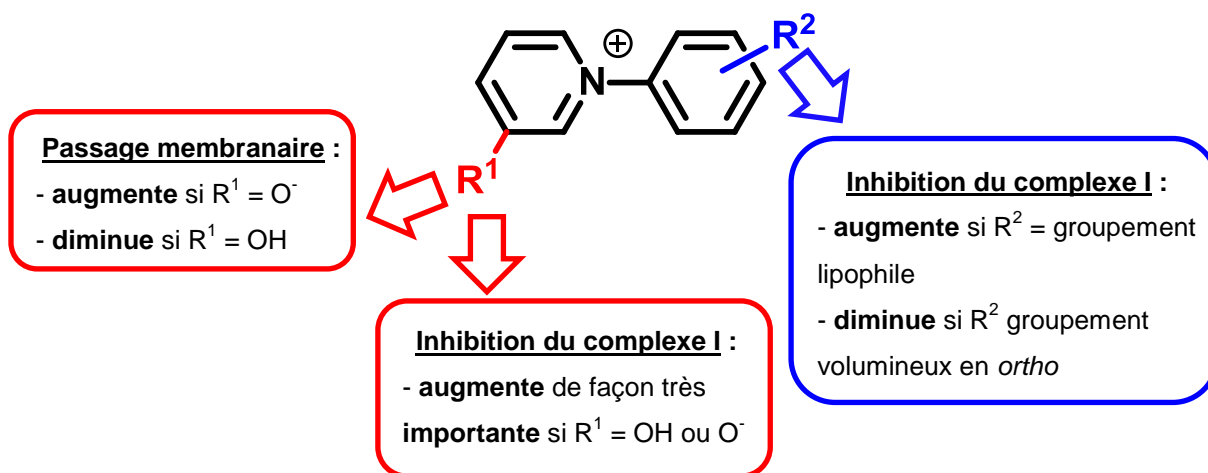


Figure 136 : Relation structure/activité des *N*-aryle pyridiniums.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc pu mettre en évidence le fait que les *N*-aryle pyridiniums porteurs d'un groupement lipophile sur noyau phényle induisaient une forte inhibition du complexe I. Il a été montré à l'inverse que la substitution par des groupements polaires diminuait l'activité de ces composés. Enfin, la présence d'un groupement hydroxyle ou hydroxylate en position 3 du cycle pyridinium s'est révélée favorable sur l'inhibition du complexe I, probablement en raison d'une plus forte affinité pour le site d'inhibition hydrophile.

Il a été également montré que l'encombrement stérique autour de l'atome d'azote diminuait (dans une certaine mesure) l'inhibition du complexe I. A ce sujet, il est intéressant de noter que l'influence de l'encombrement stérique a – dans la littérature – toujours été associée à une perte de la délocalisation de la charge positive. S'agissant toutefois de nos *N*-aryle pyridiniums, cette délocalisation entre les deux cycles aromatiques n'est pas possible. Dans notre cas, il semble donc bien que l'effet constaté soit authentiquement lié à un problème purement stérique et non électronique.

Par ailleurs, les études *in cellulo* ont mis en évidence une différence d'activité entre les formes cationiques, porteuses d'un groupement hydroxyle et les formes zwitterioniques, porteuses d'un groupement hydroxylate. Ainsi, la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 a eu pour effet de diminuer le passage membranaire de ces composés. A l'inverse, la présence d'un groupement hydroxylate, a semble-t-il permis d'augmenter leur affinité pour le DAT et donc leur passage membranaire.

Il convient enfin de souligner le fait qu'à chaque fois, la mortalité cellulaire observée était associée à une production d'EROs et à une inhibition du complexe I. La neurotoxicité

constatée *in cellulo* et induite par nos composés résulterait donc bien d'un stress oxydant consécutif à l'inhibition du complexe I de la CRM et ne serait donc pas associé à un autre phénomène cytotoxique.

III.1.2 Modulation de la neurotoxicité des pyridiniums 3-hydroxylés

Cette étude nous a aussi permis d'identifier, pour la première fois, un paramètre permettant de moduler l'activité des pyridiniums 3-hydroxylés : le pK_a associé à l'équilibre acido-basique entre la forme cationique et la forme zwitterionique. Nous avons en effet démontré que dans cette série, le passage membranaire était particulièrement favorisé pour les composés existant sous forme zwitterionique à pH physiologique, alors même que l'inhibition du complexe I était restée indifférente à l'état d'ionisation de ces composés.

Ce résultat laisse entrevoir la possibilité d'une modulation – selon la nature du/des substituant(s) – de l'équilibre cation/zwitterion permettant de contrôler l'entrée des composés à l'intérieur de la cellule (Figure 137).

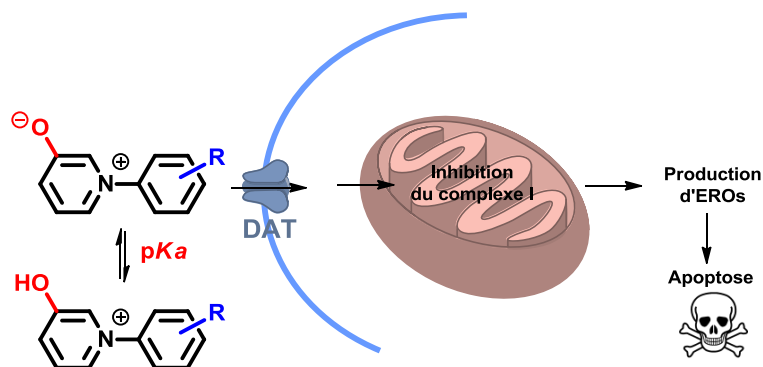


Figure 137 : Modulation de l'activité *in vitro* des *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés en fonction du pK_a .

Une fois la membrane cellulaire franchie, la forte affinité – que nous avons montrée – des *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés pour les sites d'inhibition du complexe I, permettrait l'induction d'un stress oxydant entraînant la mort de la cellule par apoptose.

Il semble donc possible d'envisager la modulation de la neurotoxicité *in cellulo* des *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés en jouant sur le pK_a de ces composés. Cette modulation pourrait être apportée par l'insertion d'un second substituant. Rappelons, que l'un des objectifs de ce travail de recherche était la synthèse d'inducteurs de la MP présentant, comme dans le cas du **PF**, une cinétique d'action beaucoup plus lente que le MPP^+ . Ainsi, le fait de savoir comment

freiner – par le biais de cet équilibre acido-basique – l'activité de ces composés apparaît comme un élément d'information essentiel dans la recherche de meilleurs inducteurs chimiques de la MP, mimant plus fidèlement l'apparition des marqueurs cellulaires de la MP.

Enfin, il convient de rappeler que l'optimisation de la voie d'accès aux *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés (protection/oxydation électrochimique), nous permet aujourd'hui d'envisager de nouvelles structures en lien avec ces résultats.

III.2 Perspectives

Le passage des composés à travers la membrane cellulaire *via* le DAT doit être confirmé afin de vérifier la réelle spécificité dopaminergique de nos composés. A cette fin, l'évaluation – en présence d'un inhibiteur du DAT – de l'activité *in cellulo* des composés pour lesquels un tel passage a été suggéré, est actuellement en cours. Dans ces conditions, l'absence de neurotoxicité permettrait de confirmer le transport actif de nos composés au travers de la membrane cellulaire.

Par ailleurs, nous avons montré l'influence du substituant 3-hydroxyle en fonction de son état d'ionisation. Une autre perspective de ce travail serait la synthèse de *N*-aryle pyridiniums 3-méthoxylés, pour lesquels l'existence d'un équilibre acido-basique entre des formes cationique et zwitterionique serait empêchée. Ce travail de synthèse a d'ores et déjà débuté et permettra de confirmer (ou d'infirmer) le rôle essentiel que ces travaux tendent à attribuer au groupement 3-hydroxyle du noyau pyridinium.

Par des travaux menés en parallèle de ceux présentés ici, il a été démontré que le **PF** était capable d'induire sa neurotoxicité sur des modèles *vivo* après administration par voie orale. La capacité de ce composé à franchir la BHE pourrait notamment s'expliquer par une forme zwitterionique neutre, favorisant ce passage. S'agissant des suites à donner à notre étude sans doute sera-t-il intéressant de vérifier si, parmi les composés qui ont été présentés ici, ceux capables de donner des zwitterions peuvent également passer la BHE. Dans une telle hypothèse, la préparation d'une série de composés zwitterioniques, inducteurs chimiques parkinsoniens, à l'activité modulée et administrables par voie orale deviendrait envisageable.

Enfin, des études de modélisation visant à mieux comprendre les interactions entre les *N*-aryle-pyridiniums et les sites d'inhibition du complexe I de CRM devraient débiter prochainement. Ces études, menées en collaboration avec l'Equipe de Chimie Théorique (Laboratoire de Modélisation et Simulation Multi Echelle, UPEM) devraient aider à la collecte d'informations utiles à l'élaboration de meilleurs inducteurs chimiques de la MP voire à la compréhension des mécanismes précoces d'apparition de cette maladie.

Partie IV : Partie expérimentale



Chapitre I : Partie expérimentale relative à la Partie II

I. Méthodes d'analyse

Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) : La quasi-totalité des réactions ont été suivies par CPG (sauf les étapes de préparation des sels de pyridiniums). Il a fallu adapter la nature et la taille des colonnes de CPG ainsi que les méthodes utilisées en fonction de la nature et du poids moléculaire des composés. Ainsi, plusieurs colonnes et méthodes ont été utilisées :

- ❖ Appareil A : chromatographe Varian 3400 CX avec colonne capillaire BP1 (5 % phényle, longueur = 5 m, diamètre intérieur = 0.32 mm ; épaisseur du film = 0,5 µm)
- ❖ Appareil B : chromatographe SHIMADZU 2025, équipée d'une colonne capillaire apolaire ZB-5-GC-MSi (longueur = 30 m, diamètre intérieur = 0,25 mm; épaisseur du film = 0,25 µm).
- ❖ Appareil C : chromatographe Varian, équipée d'une colonne capillaire AT-1000 (longueur = 3 m, diamètre intérieur = 0,32 mm; épaisseur du film = 0,30 µm).
- ❖ Méthode 1 : 60+6, Méthode 2 : 50+10, Méthode 3 : 100+6, Méthode 4 : 130+10

Techniques de purification :

- ❖ **Chromatographie en phase normale/inverse :** Les purifications ont été réalisées en utilisant un chromatographe automatisé puriFlash® SPOT II d'Interchim. Les purifications sur phase inverse ont été réalisées en utilisant des cartouches pré-packées GraceReveleris C₁₈ de 40 g. Les purifications sur gel de silice ont été faites en utilisant des cartouches pré-packées de silice GraceResolv Silica.
- ❖ **Chromatographie de partage centrifuge (CPC) :** Les purifications ont été réalisées en utilisant un chromatographe automatisé Armen SCPC-250 couplé à un système Spot prep II de chez Armen Instrument équipé d'un rotor de 250 mL (contenant 2500 cellules-jumelles). Les produits ont été purifiés en utilisant un mélange ternaire butan-1-ol/MeOH/H₂O (v/v) (35,7/12,5/50).

RMN : Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil Brüker Advance 400 opérant à 400 MHz pour le ¹H, 100 MHz pour le ¹³C et 376 MHz pour le ¹⁹F. Les échantillons sont en solution dans CDCl₃, DMSO, MeOD selon précisions. Les expériences ont été réalisées à température ambiante. Les déplacements chimiques sont exprimés « ppm » et la multiplicité

des signaux est indiquée à l'aide des abréviations suivantes : s, se, d, t, dd, m signifiant respectivement singulet, singulet élargi, doublet, triplet, doublet de doublets et multiplet.

Point de fusion : Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un appareil de point de fusion Büchi B-545.

Spectrométrie Infrarouge : Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un spectromètre FT-IR Bruker Tensor 27 en mode ATR (Attenuated Total Reflexion) entre 500 et 4000 cm^{-1} . Les nombres d'onde sont exprimés à leur intensité maximale en cm^{-1} avec ν , γ et δ respectivement vibration d'élongation, vibration de déformation dans le plan et vibration de déformation hors du plan.

Spectrométrie de masse :

- ❖ **GC-MS :** Les spectres de masse ont été obtenus à l'aide d'un chromatographe Trace Serie 2000 (mode ESI) équipé d'une colonne capillaire CPSIL 5 CB/MS (longueur = 25 m, diamètre intérieur = 0,25 mm ; épaisseur du film = 0,12 μm) couplé à un spectromètre de masse ITQ 700 Thermo ScientificCGQ.
- ❖ **HRMS :** Les nouveaux produits ont été analysés par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS, mode ESI⁺) par le Service de Spectrométrie de Masse de l'institut de Chimie Organique et Analytique localisé à Orléans. Les valeurs d'incertitude notées ΔHRMS sont calculées d'après la formule suivante :

$$\Delta\text{HRMS} = \frac{|M_{\text{trouvée}} - M_{\text{calculée}}|}{M_{\text{calculée}}}$$

Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) et LC-MS : Les spectres de masse ainsi que les temps de rétention en CLHP ont été obtenus par un appareil LC-MS : chromatographe Ultimate 3000 de chez Thermo Scientific équipé d'une colonne BETASIL Phenyl-hexyl (150 mm x 2,1 mm x 3 μm) et couplé à un spectromètre de masse MSQ Plus de chez Thermo Scientific.

Analyse élémentaire : Les analyses élémentaires ont été effectuées par la plate-forme de microanalyse à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles localisée à Gif sur Yvette.

Voltampérométrie cyclique : Dans une cellule électrochimique pentacol, le méthanol (20 mL) et le tétrafluoroborate de tétraéthylammonium (434 mg ; 2 mmol) sont introduits. L'électrode de travail, la contre électrode, l'électrode de référence, une arrivée et une sortie

d'argon sont mis en place dans la cellule. Après un dégazage de 15 minutes, les composés (0,1 mmol) sont introduits puis les courbes sont enregistrées à différentes vitesses de balayage (25 à 500 mV.s⁻¹).

Micro-ondes : Les réactions ont été réalisées grâce à un micro-onde CEM Discover dans des réacteurs de 10 mL en utilisant le mode sous-pression (discover) et travaillant avec un capteur fibre optique permettant de mesurer la pression à l'intérieure du réacteur.

II. Procédures générales

P-1 Procédure générale d'amination réductrice

Méthode 1 : Dans un ballon sont introduits n_1 mmol d'aniline et n_2 de furaldéhyde distillé dans V mL d'acétonitrile. Ensuite 3 équivalents de NaBH₃CN et 0.48 équivalents d'acide acétique sont ajoutés. L'ajout d'acide est renouvelé 1 h après le début de la réaction. Le mélange est chauffé à 40 °C et laissé sous agitation pendant une nuit. La réaction est suivie par CPG jusqu'à disparition du produit de départ (temps t). Une fois la réaction terminée, la phase organique est extraite à l'acétate d'éthyle et lavée avec une solution de NaCl sat. La phase aqueuse est également lavée à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée par Na₂SO₄ avant d'être filtrée sur fritté. Après évaporation du solvant, la *N*-aryl, *N*-furanylméthylamine est purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice.

Méthode 2 : Dans un ballon sont introduits n_1 mmol d'aniline, n_2 de furaldéhyde distillé et une quantité catalytique d'acide sulfurique dans V mL de benzène. Le mélange est chauffé à 80 °C sous agitation en utilisant un équipement Dean-Stark. La formation de l'imine est suivie par CPG. Une fois la disparition totale de l'aniline constatée (temps t_1), le mélange réactionnel est évaporé puis repris dans V mL de THF distillé. Ensuite, le mélange est placé à 0 °C et n_1 mmol de NaBH₄ sont ajoutés au mélange. Une fois l'ajout terminé, le mélange est laissé sous agitation et placé à reflux (~ 70 °C) jusqu'à réduction totale de l'imine contrôlée par CPG (temps t_2). Enfin, la phase organique est extraite à l'acétate d'éthyle et lavée avec une solution de NaCl saturée. La phase aqueuse est également lavée à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée par Na₂SO₄ avant d'être filtrée sur fritté. Après évaporation du

solvant, la *N*-aryl, *N*-furanylméthylamine est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice.

Méthode 3 : Dans un ballon sont introduits n_1 mmol d'aniline, n_2 équivalents de furaldéhyde distillé et une quantité catalytique d'acide sulfurique dans V mL de dichlorométhane distillé et placé sur Na_2SO_4 . Le mélange est placé sous agitation à reflux du solvant (~ 40 °C) et la formation de l'imine est suivie par CPG. Une fois la disparition totale de l'aniline constatée (temps t_1), le mélange est placé à 0 °C et n_1 mmol de NaBH_4 sont ajoutés au mélange. Une fois l'ajout terminé, le mélange est laissé sous agitation et placé à reflux jusqu'à réduction totale de l'imine contrôlée par CPG (temps t_2). Enfin, la phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée. La phase aqueuse est également lavée au dichlorométhane. La phase organique est séchée par Na_2SO_4 avant d'être filtrée sur fritté. Après évaporation du solvant, la *N*-aryl, *N*-furanylméthylamine est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice.

P-2 Procédure générale de protection des *N*-aryl, *N*-furanylméthylamine

Méthode 1 : Dans un schlenk sont introduits n_1 mmol de *N*-aryl, *N*-furanylméthylamine, n_2 de di-*tert*-butyl dicarbonate et une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine dans V mL de THF distillé. Le mélange est laissé sous agitation à reflux du THF (~ 70 °C). La réaction est terminée lorsque le *N*-aryl, *N*-furanylméthylamine est totalement consommé (temps t). A l'issue de la réaction, le composé protégé est récupéré par extraction au dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée. La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont séchées par Na_2SO_4 avant d'être filtrée sur fritté. Enfin, le dichlorométhane est évaporé et le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice.

Méthode 2 : Dans un ballon, n mmol de *N*-aryl, *N*-furanylméthylamine sont introduits dans V mL de dichlorométhane distillé et placées à 0 °C. Ensuite, 1.5 équivalents de triéthylamine et d'anhydride trifluoroacétique sont ajoutés goutte à goutte au mélange réactionnel. Une fois l'ajout terminé, le mélange est laissé sous agitation à température ambiante toute la nuit. La réaction est terminée lorsque la *N*-aryl, *N*-furanylméthylamine est totalement consommée (temps t). A l'issue de la réaction, le mélange réactionnel est versé dans un erlenmeyer

contenant une solution de NaHCO₃ saturée, puis la phase organique est récupérée et séchée par Na₂SO₄ avant d'être filtrée sur fritté. Enfin, le dichlorométhane est évaporé et le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice.

P-3 Procédure générale de préparation des sels de pyridinium par activation anodique

Etape 1 : Oxydation électrochimique

Dans une cuve électrochimique, sont introduits **n** mmol de réactif et 1,3 équivalents de NH₄Br dans 25 mL de méthanol. La solution est soumise à une intensité **I** pendant un temps **t** soit à une charge électrique **Q= I x t**. La disparition du produit de départ ainsi que la formation des diacétals sont suivies par CPG et GC-MS. A l'issue de la réaction, le méthanol est évaporé puis le NH₄Br est éliminé par lavage à l'acétate d'éthyle et filtration sur fritté. Enfin, l'acétate d'éthyle est évaporé.

Etape 2 : Hydrolyse acide

Le brut réactionnel issu de l'oxydation anodique est dissous dans **V** mL d'un mélange 80/20 THF/HCl (6 N). Le tout est laissé sous agitation à température ambiante pendant 96 h. Après évaporation du mélange de solvant, les sels de pyridiniums sont purifiés par chromatographie éclair sur phase inverse ou par CPC.

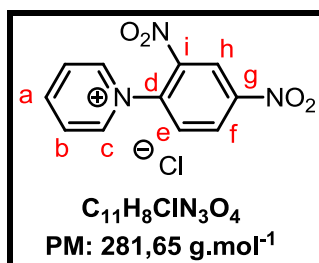
P-4 Procédure générale de transannélation du sel de Zincke par des dérivés de l'aniline

Dans un réacteur micro-onde de 10 mL, sont introduits 0.2 mmol (56.2 mg) de chlorure de 1-(2, 4-dinitropheny) pyridinium et **n** mmol d'aniline dans 1 mL de mélange EtOH/H₂O (60/40). Le mélange est laissé sous agitation et chauffé à la température **θ** aux micro-ondes pendant un temps **t**. Après évaporation du solvant, le sel de pyridium est purifié par chromatographie sur phase inverse selon 3 méthodes. Méthode 1 : 100 % Et₂O pendant 5 volumes colonnes (VC), 100 % MeCN pendant 5 VC puis 100 % MeOH pendant 3 VC. Le produit pur est récupéré après évaporation de la fraction méthanolique. Méthode 2 : 100 % MeCN pendant 5 VC puis 100 % MeOH pendant 3 VC. Le produit pur est récupéré après

évaporation de la fraction méthanolique. Méthode 3 : H₂O/MeCN (95/5) pendant 3 VC. Le produit pur est élué au volume mort.

III. Préparation et description des produits

❖ Chlorure de 1-(2, 4-dinitrophenyl) pyridinium (1) :



Préparation : Dans un schlenk, sont introduits 2.00 g (9.90 mmol) de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène et 0.80 mL (9.90 mmol) de pyridine dans 50 mL d'acétone. Le mélange est laissé sous agitation et chauffé à 60 °C pendant deux jours. Le chlorure de 1-(2, 4-dinitrophenyl) pyridinium précipite et est récupéré sous forme de poudre beige (Tf = 198-200 °C) par filtration sur fritté et lavage au diethyl éther (2.42 g, 87 %).

Aspect : poudre beige

Point de fusion : 198-200 °C

Rendement isolé : 87 %

CAS number: 4185-69-7

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 9.40 (d, 2H, $J_{c-b} = 5.3$ Hz, **c**), 9.12 (d, 1H, $J_{h-f} = 2.6$ Hz, **h**), 8.99 (dd, 1H, $J_{f-e} = 8.0$ Hz, $J_{f-h} = 2.6$ Hz, **f**), 8.95 (t, 1H, $J_{a-b} = 7.0$ Hz, **a**), 8.43 (massif, 3H, **b** et **e**)

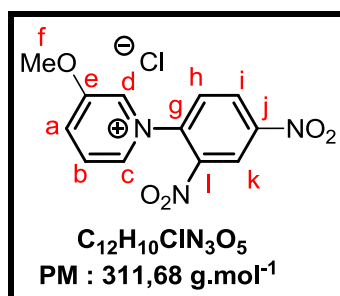
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 149.1 (**g**), 148.8 (**a**), 146.0 (**c**), 143.1 (**i**), 138.7 (**d**), 131.8 (**e**), 130.2 (**f**), 128.0 (**b**), 121.4 (**h**)

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3102$ (ν_{C-H}), 2980 (ν_{C-H}), 1562 (ν_{NO_2}), 1457 (ν_{NO_2}), 1350 (ν_{NO_2}), 808 (γ_{C-H}), 780 (γ_{C-H}), 675 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP: (95 % MeOH / 5 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 2.85 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 246 (C₁₁H₈N₃O₄⁺, 100 %), 247 (C₁₁H₉N₃O₄²⁺, 11 %)

❖ **1-(2,4-dinitrophenyl)-3-methoxypyridin-1-ium chloride (1a) :**



Préparation : Dans un schlenk, sont introduits 7.59 g (37.46 mmol) de 1-chloro-2,4-dinitrobenzene et 4.09 g (20 mmol) de 3-méthoxypyridine dans 80 mL de toluène. Le mélange est laissé sous agitation et chauffé à 110 °C pendant 6 jours. Après évaporation du solvant, les impuretés sont éliminées par lavage au diethyl éther et le sel de pyridinium est récupéré sous forme de poudre blanchâtre (Tf = 182-184 °C) par filtration sur fritté (8.12 g, 70 %).

Rendement isolé : 70 %

CAS number : 104642-51-5

Aspect : poudre blanchâtre

Point de fusion : 182-184 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.26 (d, 1H, $J_{d-c} = 2.5$ Hz, **d**), 9.24 (d, 1H, $J_{k-i} = 2.2$ Hz, **k**), 8.97 (d, 1H, $J_{a-b} = 5.9$ Hz, **a**), 8.92 (dd, 1H, $J_{c-b} = 8.7$ Hz, $J_{c-d} = 2.5$ Hz, **c**), 8.56 (dd, 1H, $J_{i-h} = 7.7$ Hz, $J_{i-k} = 2.2$ Hz, **i**), 8.38-8.30 (massif, 2H, **b** et **h**)

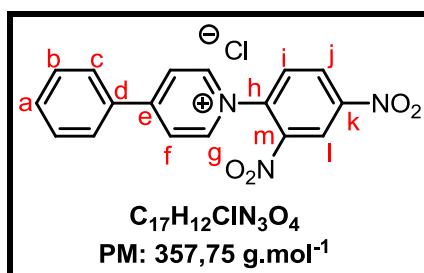
RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 160.5 (**e**), 151.2 (**j**), 144.6 (**l**), 140.2 (**g**), 139.8 (**a**), 135.2 (**i**), 134.7 (**d**), 132.8 (**b**), 131.3 (**c**), 130.0 (**h**), 123.3 (**k**), 58.8 (**f**)

ATR-FTIR (neat) : ν = 3087 (ν_{C-H}), 2888 (ν_{C-H}), 1606 (ν_{C=C}), 1535 (ν_{-NO₂}), 1346 (ν_{-NO₂}), 1305 (ν_{-NO₂}), 867 (γ_{C-H}), 744 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 1.99 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 276 (C₁₂H₁₀N₃O₅⁺, 100 %), 277 (C₁₂H₁₁N₃O₅²⁺, 14 %),

❖ **1-(2,4-dinitrophenyl)-4-phenylpyridin-1-ium chloride (1d) :**



Préparation : Dans un schlenk, sont introduits 4.05 g (20 mmol) de 1-chloro-2,4-dinitrobenzene et 3.1 g (20 mmol) de 4-phenylpyridine dans 50 mL d'acétonitrile. Le mélange est laissé sous agitation et chauffé à 80 °C pendant 3 jours. Après évaporation du solvant, les impuretés sont éliminées par lavage au diethyl éther et le sel de pyridinium est récupéré sous forme de poudre jaune (Tf = 179-181 °C) par filtration sur fritté (7.15 g, 100 %).

Rendement isolé : 100 %

CAS number : 26863-15-0

Aspect : poudre jaune

Point de fusion : 179-181 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 9.43 (d, 2H, $J_{g-f} = 7.1$ Hz, **g**), 9.15 (d, 1H, $J_{l-j} = 2.5$ Hz, **l**), 8.99 (dd, 1H, $J_{j-i} = 8.7$ Hz, $J_{j-l} = 2.4$ Hz, **j**), 8.85 (d, 2H, $J_{f-g} = 7.1$ Hz, **f**), 8.46 (d, 1H, $J_{i-j} = 8.7$ Hz, **i**), 8.27 (dd, 2H, $J_{c-b} = 7.8$ Hz, $J_{c-a} = 1.2$ Hz, **c**), 7.76-7.70 (massif, 3H, **a** et **b**)

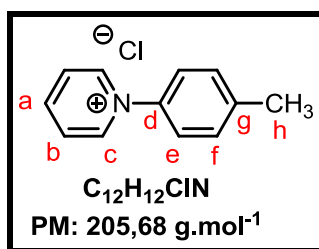
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 157.4 (**e**), 149.0 (**k**), 145.9 (**g**), 143.2 (**m**), 138.5 (**h**), 133.1 (**a**), 133.0 (**d**), 132.0 (**i**), 130.2 (**j**), 129.9 (**b**), 128.7 (**c**), 124.1 (**f**), 121.4 (**l**)

ATR-FTIR(neat) : ν = 3648 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3378 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3081 (ν_{C-H}), 2985 (ν_{C-H}), 1633 (ν_{C=C}), 1594 (ν_{C=C}), 1532 (ν_{NO₂}), 1475 (ν_{C=C}), 1438 (ν_{NO₂}), 1337 (ν_{NO₂}), 876 (γ_{C-H}), 835 (γ_{C-H}), 779 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.03 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 322 (C₁₇H₁₂N₃O₄⁺, 100 %), 323 (C₁₇H₁₃N₃O₄²⁺, 33 %)

❖ **1-(*p*-tolyl)pyridin-1-ium chloride (3a) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.24 mmol (25.7 mg), **θ** = 130 °C et **t** = 20 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 96 %

CAS number : 17434-91-2

Aspect : poudre beige

Point de fusion : 96-99 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.26 (dd, 2H, $J_{c-b} = 7.5$ Hz, $J_{c-a} = 1.2$ Hz, **c**), 8.80 (tt, 1H, $J_{a-b} = 7.5$ Hz, $J_{a-c} = 1.2$ Hz, **a**), 8.31 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 7.5$ Hz, **b**), 7.75 (d, 2H, $J_{e-f} = 8.3$ Hz, **e**), 7.75 (d, 2H, $J_{f-e} = 8.3$ Hz, **f**), 2.51 (s, 3H, **h**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 147.8 (**a**), 146.1 (**c**), 143.8 (**g**), 142.3 (**d**), 132.3 (**f**), 129.7 (**b**), 125.4 (**e**), 21.3 (**h**)

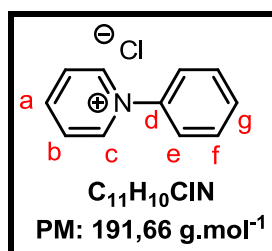
ATR-FTIR (neat) : ν = 3451 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3397 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3015 (ν_{C-H}), 1778 (ν_{C=C}), 1477 (ν_{C=C}), 1453 (δ_{CH₃}), 833 (γ_{C-H}), 787 (γ_{C-H}), 694 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.08 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 170 (C₁₂H₁₂N⁺, 100 %), 171 (C₁₂H₁₃N²⁺, 12 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₁₂ClN.4/3H₂O] : C (62.75 %), H (6.44 %), N (6.10 %) ; trouvée C (62.58 %), H (6.19 %), N (6.51 %)

❖ **1-phenylpyridin-1-ium chloride (3b) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.24 mmol (22.3 mg), **θ** = 130 °C et **t** = 20 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 100 %

CAS number : 13958-90-2

Aspect: poudre marron

Point de fusion : 110-112 °C litt 106-107 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 9.37 (d, 2H, $J_{c-b} = 7.1$ Hz, **c**), 8.80 (t, 1H, $J_{a-b} = 7.1$ Hz, **a**), 8.32 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 7.1$ Hz, **b**), 7.90 (dd, 2H, $J_{e-f} = 5.9$ Hz, $J_{e-g} = 1.9$ Hz, **e**), 7.75 (massif, 3H, **f** et **g**)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 146.6 (**a**), 145.0 (**c**), 142.8 (**d**), 131.2 (**g**), 130.2 (**f**), 128.1 (**b**), 124.8 (**e**)

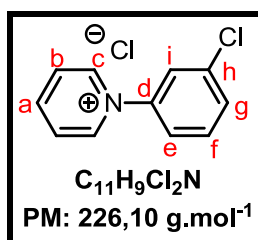
ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3626$ (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3363 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3093 (ν_{C-H}), 3020 (ν_{C-H}), 1625 ($\nu_{C=C}$), 1590 ($\nu_{C=C}$), 1474 ($\nu_{C=C}$), 870 (γ_{C-H}), 843 (γ_{C-H}), 777 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.04 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 190 (C₁₁H₁₀N⁺, 100 %), 191 (C₁₁H₁₁N²⁺, 13 %), 192 (C₁₁H₁₂N³⁺, 26 %), 415 (C₂₂H₂₃N₂⁵⁺.MeOH, 4 %), 418 (C₂₂H₂₆N₂⁸⁺.MeOH, 7 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₁₀ClN.3/2H₂O] : C (60.42 %), H (5.99 %), N (6.41 %) ; trouvée C (60.35 %), H (5.68 %), N (6.14 %)

❖ **1-(3-chlorophenyl)pyridin-1-ium chloride (3c):**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.6 mmol (76.5 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 40 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 91 %

CAS number : 52884-97-6

Aspect: solide marron clair

Point de fusion : 68-70 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.40 (d, 2H, $J_{c-b} = 5.7$ Hz, **c**), 8.83 (t, 1H, $J_{a-b} = 7.8$ Hz, **a**), 8.34 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 6.9$ Hz, **b**), 8.15 (s, 1H, **i**), 7.91 (d, 1H, $J_{g-f} = 7.9$ Hz, **g**), 7.85 (d, 1H, $J_{e-f} = 8.5$ Hz, **e**), 7.76 (t, 1H, $J_{f-e} = J_{f-g} = 8$ Hz, **f**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 147.0 (**a**), 145.1 (**c**), 143.6 (**d**), 134.1 (**h**), 131.7 (**b**), 131.2 (**i**), 128.0 (**g**), 125.2 (**f**), 123.8 (**e**)

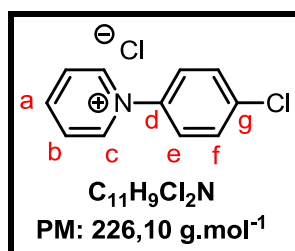
ATR-FTIR (neat) : 3360 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3071 (ν_{C-H}), 3025 (ν_{C-H}), 1627 ($\nu_{C=C}$), 1588 ($\nu_{C=C}$), 1471 ($\nu_{C=C}$), 1093 (ν_{Ar-Cl}), 874 (γ_{C-H}), 780 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (50 % MeOH / 50 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 2.20 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 190 (C₁₁H₉ClN⁺, 100 %), 192 (C₁₁H₁₀ClN⁺, 29 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₉Cl₂N.7/8H₂O] : C (53.56 %), H (4.61 %), N (5.68 %) ; trouvée C (53.05 %), H (4.49 %), N (6.17 %)

❖ 1-(4-chlorophenyl)pyridin-1-ium chloride (3d) :



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.4 mmol (51.0 mg), **θ** = 130 °C et **t** = 30 min.

Purification : méthode 1

Rendement isolé : 93 %

CAS number : 17434-93-4

Aspect: poudre marron clair

Point de fusion : 121-123 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 9.34 (d, J_{c-b} = 7.5 Hz 2H, **c**), 8.80 (t, 1H, J_{a-b} = 7.5 Hz, **a**), 8.32 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 7.5$ Hz, **b**), 7.94 (d, 2H, $J_{e-f} = 8.9$ Hz, **e**), 7.86 (d, 2H, $J_{f-e} = 8.9$ Hz, **f**)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 146.8 (**a**), 145.0 (**c**), 141.5 (**d**), 136.0 (**g**), 130.0 (**f**), 128.0 (**b**), 126.8 (**e**)

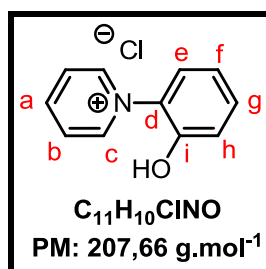
ATR-FTIR(neat) : ν = 3626 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3363 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3093 (ν_{C-H}), 3020 (ν_{C-H}), 1625 ($\nu_{C=C}$), 1590 ($\nu_{C=C}$), 1474 ($\nu_{C=C}$), 1093 (ν_{Ar-Cl}), 870 (γ_{C-H}), 843 (γ_{C-H}), 777 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.04 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 190 (C₁₁H₉ClN⁺, 100 %), 191 (C₁₁H₁₀ClN²⁺, 13 %), 192 (C₁₁H₁₁ClN³⁺, 26 %), 415 (C₂₂H₂₁ClN⁵⁺.MeOH, 4 %), 418 (C₂₂H₂₄ClN⁸⁺.MeOH, 7 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₉Cl₂N.H₂O] : C (54.12 %), H (4.54 %), N (5.74 %) ; trouvée C (54.55 %), H (4.58 %), N (5.72 %)

❖ **1-(2-hydroxyphenyl)pyridin-1-ium chloride (3e) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : 0.4 mmol (112.4 mg) de chlorure de 1-(2, 4-dinitropheny) pyridinium, **n** = 0.8 mmol (85.3 mg), **θ** = 130 °C et **t** = 30 min.

Purification : méthode 3

Rendement isolé : 31 %

CAS number : 69326-82-5

Aspect : solide jaune très visqueux (hygroscopique)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.09 (d, 2H, J_{c-b} = 6.8 Hz, **c**), 8.76 (t, 1H, J_{a-b} = 6.8 Hz, **a**), 8.27 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c}$ = 6.8 Hz, **b**), 7.59 (d, 1H, J_{e-f} = 7.8 Hz, **e**), 7.52 (t, 1H, $J_{g-f} = J_{g-h}$ = 7.8 Hz, **g**), 7.21 (d, 1H, J_{h-g} = 7.8 Hz, **h**), 7.10 (t, 1H, $J_{f-g} = J_{f-e}$ = 7.8 Hz, **f**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 152.5 (**i**), 147.8 (**c** et **a**), 134.2 (**g**), 132.1 (**d**), 129.3 (**b**), 127.4 (**e**), 121.3 (**f**), 118.9 (**h**)

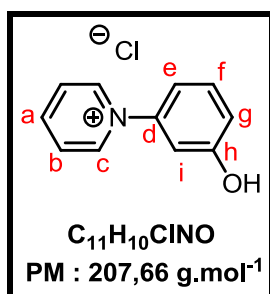
ATR-FTIR (neat) : ν = 3252 (ν_{O-H}), 3024 (ν_{C-H}), 2924 (ν_{C-H}), 1595 (ν_{C=C}), 1453 (ν_{C=C}), 1384 (δ_{O-H}), 1284 (δ_{O-H}), 1203 (ν_{C-O}), 839 (γ_{C-H}), 776 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.06 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 172 (C₁₁H₁₀NO⁺, 100 %), 173 (C₁₁H₁₁NO²⁺, 13 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₁₀ClNO.H₂O] : C (58.54 %), H (5.36 %), N (6.21 %) ; trouvée C (58.22 %), H (5.46 %), N (5.89 %)

❖ **1-(3-hydroxyphenyl)pyridin-1-ium chloride (3f) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.4 mmol (43.6 mg), **θ** = 130 °C et **t** = 40 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 63 %

CAS number: 156246-94-5

Aspect : solide noir très visqueux (hygroscopique)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.22 (d, 2H, J_{c-b} = 6.5 Hz, **c**), 8.78 (t, 1H, J_{a-b} = 6.5 Hz, **a**), 8.27 (t, 2H, J_{b-a} = J_{b-c} = 6.5 Hz, **b**), 7.54 (t, 1H, J_{f-e} = J_{f-g} = 9.8 Hz, **f**), 7.24 (d, 1H, J_{e-f} = 9.8 Hz, **e**), 7.22 (s, 1H, **i**), 7.15 (d, 1H, J_{g-f} = 9.8 Hz, **g**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 160.8 (**h**), 148.0 (**a**), 146.1 (**c**), 145.6 (**d**), 132.7 (**f**), 129.7 (**b**), 119.7 (**g**), 116.1 (**i**), 112.6 (**e**)

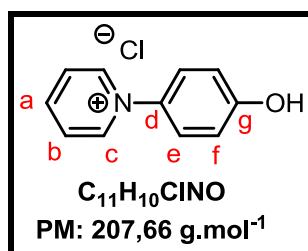
ATR-FTIR (neat) : ν = 3485 (ν_{O-H}), 3047 (ν_{C-H}), 3026 (ν_{C-H}), 1567 (ν_{C=C}), 1480 (ν_{C=C}), 1335 (δ_{O-H}), 1297 (δ_{O-H}), 1252 (δ_{C-O}), 805 (γ_{C-H}), 794 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 3.47 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 172 (C₁₁H₁₀NO⁺, 100 %), 173 (C₁₁H₁₁NO²⁺, 13 %), 343 (C₂₂H₁₉N₂O₂⁺, 17 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₁₀ClNO.2H₂O] : C (54.22 %), H (5.79 %), N (5.75 %) ; trouvée C (54.59 %), H (5.88 %), N (5.59 %)

❖ **1-(4-hydroxyphenyl)pyridin-1-ium chloride (3g) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.24 mmol (26.2 mg), **θ** = 130 °C et **t** = 20 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 63 %

CAS number : 77806-33-8

Aspect: poudre marron clair, **Point de fusion :** 217-219 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.04 (dd, 2H, $J_{c-b} = 7.8$ Hz, $J_{c-a} = 2.1$ Hz, **c**), 8.59 (tt, 1H, $J_{a-b} = 7.8$ Hz, $J_{a-c} = 2.1$ Hz, **a**), 8.11 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 7.8$ Hz, **b**), 7.52 (d, 2H, $J_{e-f} = 8.1$ Hz, **e**), 6.94 (d, 2H, $J_{f-e} = 8.1$ Hz, **f**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 161.9 (**g**), 147.0 (**a**), 145.9 (**c**), 136.4 (**d**), 129.5 (**b**), 126.8 (**e**), 117.9 (**f**)

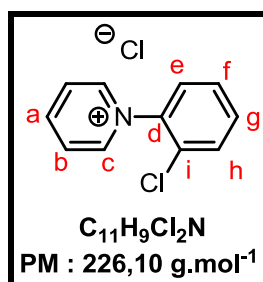
ATR-FTIR (neat) : ν = 3307 (ν_{O-H}), 3111 (ν_{C-H}), 3054 (ν_{C-H}), 1594 (ν_{C=C}), 1512 (ν_{C=C}), 1478 (ν_{C=C}), 1312 (δ_{O-H}), 1293 (δ_{O-H}), 1233 (δ_{O-H}), 850 (γ_{C-H}), 776 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP: (95 % MeOH / 5 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 1.96 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 172 (C₁₁H₁₀NO⁺, 100 %), 173 (C₁₁H₁₁NO²⁺, 12 %), 197 (C₁₁H₁₂NNaO⁴⁺, 1 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₁₀ClNO.6/5H₂O] : C (57.62 %), H (5.45 %), N (6.11 %) ; trouvée C (57.96 %), H (5.37 %), N (5.69 %)

❖ **1-(2-chlorophenyl)pyridin-1-ium chloride (3h):**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 2.4 mmol (306.2 mg), **θ** = 150°C et **t** = 75 min.

Purification : méthode 1

Rendement isolé : 84 %

CAS number : 147308-72-3

Aspect : solide verdâtre très visqueux (hygroscopique)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.22 (d, 2H, J_{c-b} = 7.1 Hz, **c**), 8.92 (t, 1H, J_{a-b} = 7.1 Hz, **a**), 8.39 (t, 2H, J_{b-a} = J_{b-c} = 7.1 Hz, **b**), 7.91 (d, 1H, J_{e-f} = 7.8 Hz, **e**), 7.85 (d, 1H, J_{h-g} = 7.8 Hz, **h**), 7.79 (t, 1H, J_{g-h} = J_{g-f} = 7.8 Hz, **g**), 7.72 (t, 1H, J_{f-e} = J_{f-g} = 7.8 Hz, **f**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 149.4 (**a**), 147.9 (**c**), 141.5 (**d**), 134.7 (**g**), 132.4 (**h**), 130.4 (**f**), 130.0 (**i**), 129.8 (**b**), 129.1 (**e**)

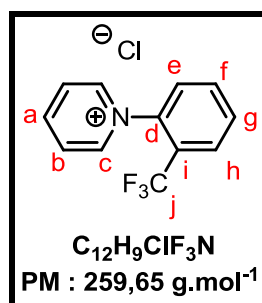
ATR-FTIR (neat) : ν = 3363 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3024 (ν_{C-H}), 1470 (ν_{C=C}), 762 (γ_{C-H}), 681 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.05 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 190 (C₁₁H₉ClN⁺, 100 %), 191 (C₁₁H₁₀ClN²⁺, 16 %), 192 (C₁₁H₁₁ClN³⁺, 49 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₉Cl₂N.H₂O] : C (54.12 %), H (4.54 %), N (5.74 %) ; trouvée C (53.80 %), H (4.48 %), N (5.57 %)

❖ **1-(2-(trifluoromethyl)phenyl)pyridin-1-ium chloride (3i) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 2.4 mmol (386.7 mg), mélange EtOH/H₂O 80/20, **θ** = 150 °C et **t** = 60 min.

Purification : méthode 1

Rendement isolé : 8 %

Aspect : poudre marron

Point de fusion : décomposition ≤ 250 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.31 (d, 2H, J_{c-b} = 7.0 Hz, **c**), 8.96 (t, 1H, J_{a-b} = 7.0 Hz, **a**), 8.40 (t, 2H, J_{b-a} = J_{b-c} = 7.0 Hz, **b**), 8.12 (dd, 1H, J_{e-f} = 7.0 Hz, J_{e-g} = 1.7 Hz, **e**), 8.08-7.99 (massif, 3H, **f**, **g** et **h**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 148.9 (**a**), 147.2 (**c**), 139.8 (**d**), 135.0 (**e**), 133.1 (**f**), 129.0 (**g**), 128.5 (**b**), 128.2 (q, J_{h-F} = 4.9 Hz, **h**), 127.2-119.1 (q, J_{j-F} = 32.0 Hz, **j**), 125.8-124.9 (q, J_{i-F} = 273.0 Hz, **i**)

RMN ¹⁹F (376 MHz, MeOD) : δ (ppm) = -59.81

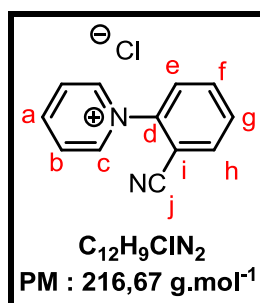
ATR-FTIR (neat) : ν = 3385 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3033 (ν_{C-H}), 1502 (ν_{C=C}), 1486 (ν_{C=C}), 1469 (ν_{C=C}), 1129 (δ_{-CF₃}), 1109 (δ_{-CF₃}), 1074 (δ_{-CF₃}), 793 (γ_{C-H}), 685 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.03 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 224 (C₁₂H₉F₃N⁺, 100 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₉ClF₃N.1/2H₂O] : C (53.65 %), H (3.75 %), N (5.21 %) ; trouvée C (53.27 %), H (3.70 %), N (5.40 %)

❖ 1-(2-cyanophenyl)pyridin-1-ium chloride (3j) :



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 2.4 mmol (283.5 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 60 min.

Purification : méthode 1

Rendement isolé : 84 %

Aspect : solide bleu turquoise très visqueux (hygroscopique)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.42 (d, 2H, J_{c-b} = 6.7 Hz, **c**), 8.97 (t, 1H, J_{a-b} = 6.7 Hz, **a**), 8.45 (t, 2H, J_{b-a} = J_{b-c} = 6.7 Hz, **b**), 8.18 (d, 1H, J_{e-f} = 8.1 Hz, **e**), 8.13-8.07 (massif, 2H, **f** et **h**), 7.99 (m, 1H, **g**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 149.9 (**a**), 147.5 (**c**), 145.1 (**d**), 136.5 (**f**), 135.9 (**e**), 133.8 (**g**), 130.0 (**b**), 128.6 (**h**), 115.4 (**j**), 110.8 (**i**)

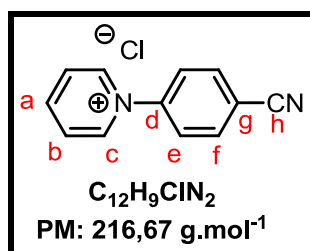
ATR-FTIR (neat) : ν = 3357 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3016 (ν_{C-H}), 2240 (ν_{C≡N}), 1494 (ν_{C=C}), 1469 (ν_{C=C}), 1356 (ν_{C=C}), 779 (γ_{C-H}), 689 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.02 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 181 (C₁₂H₉N₂⁺, 100 %), 182 (C₁₂H₁₀N₂²⁺, 13 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₉ClN₂.5/4H₂O] : C (60.26 %), H (4.85 %), N (11.71 %) ; trouvée C (60.43 %), H (4.85 %), N (11.63 %)

❖ **1-(4-cyanophenyl)pyridin-1-ium chloride(3k) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 2.4 mmol (283.5 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 60 min.

Purification : méthode 1

Rendement isolé : 78 %

CAS number:100922-79-0

Aspect : poudre blanche

Point de fusion : 67-69 °C

Rendement isolé : 88 %

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 9.38 (d, 2H, J_{c-b} = 7.6 Hz, **c**), 8.84 (t, 1H, J_{a-b} = 7.6 Hz, **a**), 8.35 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c}$ = 7.6 Hz, **b**), 8.30 (d, 2H, J_{e-f} = 8.7 Hz, **e**), 7.53 (d, 2H, J_{f-e} = 8.7 Hz, **f**)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 147.4 (**a**), 145.6 (**d**), 145.0 (**c**), 134.2 (**e**), 128.1 (**b**), 126.2 (**f**), 117.6 (**h**), 114.0 (**g**)

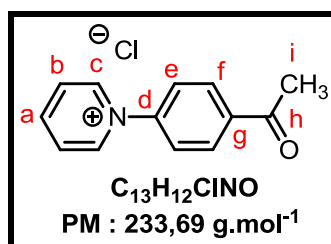
ATR-FTIR (neat) : ν = 3366 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3031 (ν_{C-H}), 3006 (ν_{C-H}), 2235 (ν_{C≡N}), 1486 (ν_{C=C}), 1471 (ν_{C=C}), 784 (γ_{C-H}), 678 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) : Rt = 3.94 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 181 (C₁₂H₉N₂⁺, 100 %), 182 (C₁₂H₁₀N₂²⁺, 14 %), 183 (C₁₂H₁₁N₂³⁺, 1 %), 246 (C₁₂H₁₀N₂²⁺.MeOH, 17 %), 247 (C₁₂H₁₁N₂³⁺.MeOH, 2 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₉ClN₂.5/4H₂O] : C (60.26 %), H (4.85 %), N (11.71 %) ; trouvée C (60.70 %), H (4.96 %), N (11.25 %)

❖ 1-(4-acetylphenyl)pyridin-1-ium chloride (3l) :



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 2.4 mmol (324 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 60 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 84 %

CAS number: 17434-91-2

Aspect : poudre marron

Point de fusion : 113-115 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.37 (d, 2H, J_{c-b} = 7.1 Hz, **c**), 8.88 (t, 1H, J_{a-b} = 7.1 Hz, **a**), 8.38 (t, 2H, J_{b-a} = J_{b-c} = 7.1 Hz, **b**), 8.34 (d, 2H, J_{e-f} = 7.9 Hz, **e**), 8.05 (d, 2H, J_{f-e} = 7.9 Hz, **f**), 2.73 (s, 3H, **j**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 198.7 (**h**), 148.5 (**a**), 147.2 (**d**), 146.0 (**c**), 140.5 (**g**), 131.6 (**e**), 129.7 (**b**), 126.2 (**f**), 27.1 (**i**)

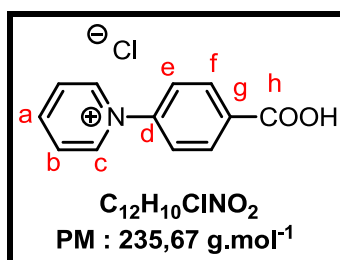
ATR-FTIR (neat) : ν = 3334 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3031 (ν_{C-H}), 1674 (ν_{C=O}), 1597 (ν_{C=C}), 1475 (ν_{C=C}), 1362 (δ_{CH₃}), 1257 (ν_{C-O}), 786 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.02 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 198 (C₁₃H₁₂NO⁺, 100 %), 199 (C₁₃H₁₃NO²⁺, 19 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₃H₁₂ClNO.7/5H₂O] : C (60.31 %), H (5.76 %), N (5.41 %) ; trouvée C (60.35 %), H (6.04 %), N (5.25 %)

❖ **1-(4-carboxyphenyl)pyridin-1-ium chloride (3m) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.6 mmol (82.3 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 60 min.

Purification : méthode 1

Rendement isolé : 38 %

Aspect : solide marron

Point de fusion : > 250 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.32 (d, 2H, J_{c-b} = 7.8 Hz, **c**), 8.84 (t, 1H, J_{a-b} = 7.8 Hz, **a**), 8.34 (massif, 4H, **b** et **f**), 7.96 (d, 2H, J_{e-f} = 8.5 Hz, **e**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 168.1 (**h**), 148.6 (**a**), 147.3 (**d**), 146.3 (**c**), 135.7 (**g**), 133.0 (**f**), 129.8 (**b**), 126.1 (**e**)

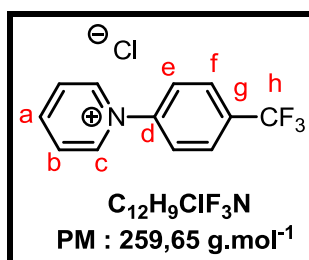
ATR-FTIR (neat) : ν = 3382 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3015 (ν_{C-H}), 2776 (ν_{O-H}), 2584 (ν_{O-H}), 1699 ($\nu_{C=O}$), 1624 ($\nu_{C=O}$), 1473 (ν_{O-H}), 1385 (ν_{C-O}), 1328 (ν_{C-O}), 1236 (ν_{C-O}), 791 (γ_{C-H}), 682 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.07 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 200 (C₁₂H₁₀NO₂⁺, 100 %), 202 (C₁₂H₁₂NO₂³⁺, 13 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₁₀ClNO₂.H₂O] : C (56.81 %), H (4.77 %), N (5.52 %) ; trouvée C (56.83 %), H (4.64 %), N (5.49 %)

❖ **1-(4-(trifluorométhyl)phényl)pyridin-1-ium chloride (3n) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : l'EtOH comme solvant, **n = 6**, **θ = 150 °C** et **t = 60 min**

Purification : méthode 1

Rendement isolé : 34 %

Aspect : solide jaune

Point de fusion : 218-220 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.33 (d, 2H, $J_{c-b} = 7.6$ Hz, **c**), 8.85 (t, 1H, $J_{a-b} = 7.6$ Hz, **a**), 8.34 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 7.6$ Hz, **b**), 8.11 (d, 2H, $J_{e-f} = 8.8$ Hz, **e**), 8.07 (d, 2H, $J_{f-e} = 8.8$ Hz, **f**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 148.8 (**a**), 147.1 (**d**), 146.4 (**c**), 135.0-134.0 (q, $J_{g-F} = 33.2$ Hz, **g**), 129.9 (**b**), 129.0 (q, $J_{f-F} = 3.8$ Hz, **f**), 128.9-120.9 (q, $J_{h-F} = 272.0$ Hz, **h**), 127.2 (**e**)

RMN ¹⁹F (376 MHz, MeOD) : δ (ppm) = -61.23

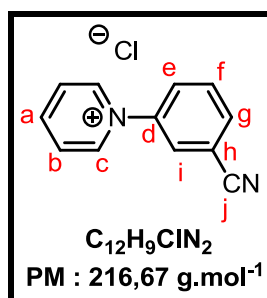
ATR-FTIR (neat) : ν = 3366 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3016 (ν_{C-H}), 1536 (ν_{C=C}), 1479 (ν_{C=C}), 1372 (ν_{C=C}), 1170 (δ_{-CF₃}), 1128 (δ_{-CF₃}), 855 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.02 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 224 (C₁₂H₉F₃N⁺, 100 %), 225 (C₁₂H₁₀F₃N²⁺, 16 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₉ClF₃N.3/2H₂O] : C (50.28 %), H (4.22 %), N (4.89 %) ; trouvée C (50.27 %), H (4.11 %), N (5.10 %)

❖ **1-(3-cyanophenyl)pyridin-1-ium chloride (3o) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.6 mmol (70.8 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 60 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 100 %

Aspect : poudre marron

Point de fusion : 162-164 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.37 (d, 2H, J_{c-b} = 7.0 Hz, **c**), 8.90 (t, 1H, J_{a-b} = 7.0 Hz, **a**), 8.40 (s, 1H, **i**), 8.37 (d, 2H, J_{b-a} = J_{b-c} = 7.0 Hz, **b**), 8.26 (d, 1H, J_{e-f} = 8.1 Hz, **e**), 8.17 (d, 1H, J_{g-f} = 8.1 Hz, **g**), 7.99 (t, 1H, J_{f-g} = J_{f-e} = 8.1 Hz, **f**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 148.8 (**a**), 146.4 (**c**), 144.7 (**d**), 136.4 (**g**), 133.1 (**f**), 130.7 (**e**), 129.9 (**i**), 129.8 (**b**), 118.2 (**j**), 115.5 (**h**)

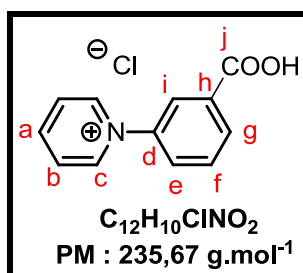
ATR-FTIR (neat) : ν = 3389 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3015 (ν_{C-H}), 2234 (ν_{C≡N}), 1490 (ν_{C=C}), 1468 (ν_{C=C}), 776 (γ_{C-H}), 681 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.07 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 181 (C₁₂H₉N₂⁺, 100 %), 182 (C₁₂H₁₀N₂²⁺, 14 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₉ClN₂.7/8H₂O] : C (62.01 %), H (4.66 %), N (12.05 %) ; trouvée C (62.00 %), H (4.39 %), N (12.27 %)

❖ **1-(3-carboxyphenyl)pyridin-1-ium chloride (3p) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.6 mmol (82.2 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 60 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 78 %

Aspect : solide violet clair

Point de fusion : 159-161 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.32 (d, 2H, J_{c-b} = 6.8 Hz, **c**), 8.84 (t, 1H, J_{a-b} = 6.8 Hz, **a**), 8.46 (s, 1H, **i**), 8.36 (massif, 3H, **b** et **g**), 8.09 (dd, 1H, J_{e-f} = 7.0 Hz, J_{e-g} = 2.3 Hz, **e**), 7.88 (t, 1H, J_{f-e} = J_{f-g} = 7.0 Hz, **f**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 167.6 (**j**), 148.4 (**a**), 146.4 (**d**), 144.7 (**c**), 135.0 (**h**), 133.6 (**f**), 132.2 (**g**), 130.0 (**i**), 129.8 (**b**), 126.9 (**e**)

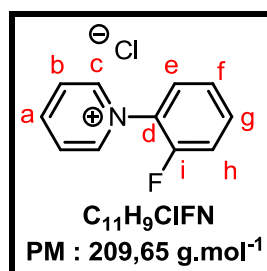
ATR-FTIR (neat) : ν = 3378 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3041 (ν_{C-H}), 2688 (ν_{O-H}), 2535 (ν_{O-H}), 1704 ($\nu_{C=O}$), 1625 ($\nu_{C=O}$), 1469 (ν_{O-H}), 1443 (ν_{O-H}), 1378 (ν_{C-O}), 1290 (ν_{C-O}), 1257 (ν_{C-O}), 756 (γ_{C-H}), 682 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.17 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 200 (C₁₂H₁₀NO₂⁺, 100 %), 201 (C₁₂H₁₁NO₂²⁺, 13 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₁₀ClNO₂.H₂O] : C (56.81 %), H (4.77 %), N (5.52 %) ; trouvée C (56.78 %), H (4.69 %), N (5.53 %)

❖ **1-(2-fluorophenyl)pyridin-1-ium chloride (3q) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 2.4 mmol (266.4 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 60 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 90 %

Aspect : solide marron

Point de fusion : 144-146 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.25 (dd, 2H, $J_{c-b} = 6.8$ Hz, $J_{c-a} = 1.3$ Hz, **c**), 8.87 (tt, 1H, $J_{a-b} = 6.8$ Hz, $J_{a-c} = 1.3$ Hz, **a**), 8.34 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 6.8$ Hz, **b**), 7.88 (td, 1H, $J_{f-e} = J_{f-g} = 7.7$ Hz, $J_{f-h} = 1.5$ Hz, **f**), 7.85-7.78 (m, 1H, **e**), 7.64-7.55 (massif, 2H, **h** et **g**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 159.9-152.7 (q, $J_{i-F} = 254.5$ Hz, **i**), 149.2 (**a**), 147.8 (**c**), 135.4 (q, $J_{e-F} = 8.3$ Hz, **e**), 131.9 (q, $J_{d-F} = 13.2$ Hz, **d**), 129.8 (**b**), 128.5 (**f**), 127.4 (q, $J_{g-F} = 4.2$ Hz, **g**), 118.8 (q, $J_{h-F} = 19.0$ Hz, **h**)

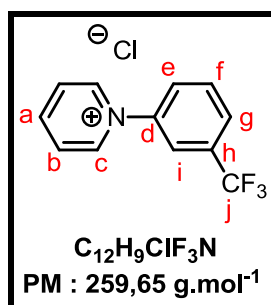
RMN ¹⁹F (376 MHz, MeOD) : δ (ppm) = -127.48

ATR-FTIR (neat) : ν = 3362 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 2950 (ν_{C-H}), 1627 (ν_{C=C}), 1476 (ν_{C=C}), 1451 (ν_{C=C}), 1256 (ν_{Ar-F}), 1222 (ν_{Ar-F}), 770 (γ_{C-H}), 687 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.05 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 174 (C₁₁H₉FN⁺, 100 %), 175 (C₁₁H₁₀FN²⁺, 18 %)

❖ **1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)pyridin-1-ium chloride (3r) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.6 mmol (96.7 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 60 min.

Purification : méthode 1

Rendement isolé : 73 %

Aspect : poudre marron

Point de fusion : 67-69 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.39 (d, 2H, J_{c-b} = 6.7 Hz, **c**), 8.90 (t, 1H, J_{a-b} = 6.7 Hz, **a**), 8.40 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c}$ = 6.7 Hz, **b**), 8.35 (s, 1H, **i**), 8.25 (d, 1H, J_{e-f} = 8.0 Hz, **e**), 8.13 (d, 1H, J_{g-f} = 8.0 Hz, **g**), 8.03 (t, 1H, $J_{f-e} = J_{f-g}$ = 8.0 Hz, **f**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 148.7 (**a**), 146.6 (**c**), 144.9 (**d**), 134.2-133.3 (q, J_{h-F} = 33.6 Hz, **h**), 133.2 (**e**), 130.1 (**f**), 129.9 (**b**), 129.6 (q, J_{g-F} = 3.6 Hz, **g**), 128.8-120.7 (q, J_{j-F} = 221.1 Hz, **j**), 123.4 (q, J_{i-F} = 3.9 Hz, **i**)

RMN ¹⁹F (376 MHz, MeOD) : δ (ppm) = -63.87

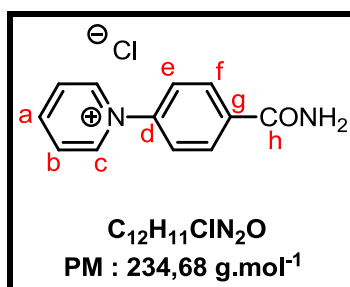
ATR-FTIR (neat) : ν = 3301 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3003 (ν_{C-H}), 1502 (ν_{C=C}), 1474 (ν_{C=C}), 1326 (ν_{C=C}), 1176 (δ_{-CF₃}), 1102 (δ_{-CF₃}), 775 (γ_{C-H}), 680 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.06 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 224 (C₁₂H₉F₃N⁺, 100 %), 225 (C₁₂H₁₀F₃N²⁺, 13 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₉ClF₃N.3/2H₂O] : C (50.28 %), H (4.22 %), N (4.89 %) ; trouvée C (50.35 %), H (4.25 %), N (5.22 %)

❖ **1-(4-carbamoylphenyl)pyridin-1-ium chloride (3s) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.6 mmol (81.6 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 60 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 85 %

Aspect : poudre marron

Point de fusion : décomposition ≤ 250 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.32 (d, 2H, J_{c-b} = 6.9 Hz, **c**), 8.84 (t, 1H, J_{a-b} = 6.9 Hz, **a**), 8.33 (t, 2H, J_{b-a} = J_{b-c} = 6.9 Hz, **b**), 8.23 (d, 2H, J_{f-e} = 8.6 Hz, **f**), 7.97 (d, 2H, J_{e-f} = 8.6 Hz, **e**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 170.0 (**h**), 148.4 (**a**), 146.5 (**d**), 146.1 (**c**), 138.2 (**g**), 131.0 (**f**), 129.7 (**b**), 126.0 (**e**)

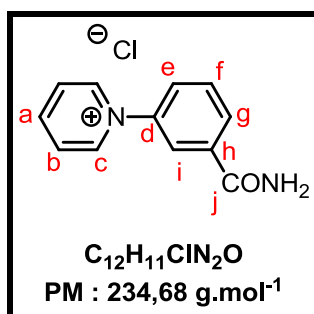
ATR-FTIR (neat) : ν = 3392 (ν_{N-H}), 3034 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 1683 ($\nu_{C=O}$), 1466 ($\nu_{C=C}$), 1389 ($\nu_{C=C}$), 711 (γ_{C-H}), 672 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) R_t = 2.03 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 199 (C₁₂H₁₁N₂O⁺, 100 %), 200 (C₁₂H₁₂N₂O²⁺, 13 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₁₁ClN₂O.1/2H₂O] : C (59.14 %), H (4.96 %), N (11.50 %) ; trouvée C (59.06 %), H (4.50 %), N (11.59 %)

❖ **1-(3-carbamoylphenyl)pyridin-1-ium chloride (3t) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.6 mmol (81.6 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 20 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 68 %

Aspect : poudre marron

Point de fusion : décomposition $\geq 250^\circ\text{C}$

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.34 (dd, 2H, $J_{c-b} = 6.9$ Hz, $J_{c-a} = 1.2$ Hz, **c**), 8.85 (tt, 1H, $J_{a-b} = 6.9$ Hz, $J_{a-c} = 1.2$ Hz, **a**), 8.36 (s, 1H, **i**), 8.33 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 6.9$ Hz, **b**), 8.24 (d, 1H, $J_{g-f} = 8.5$ Hz, **g**), 8.06 (d, 1H, $J_{e-f} = 8.5$ Hz, **e**), 7.87 (t, 1H, $J_{f-e} = J_{f-g} = 8.5$ Hz, **f**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 169.8 (**j**), 148.4 (**a**), 146.4 (**c**), 144.6 (**d**), 137.8 (**h**), 132.2 (**f**), 131.7 (**g**), 129.8 (**b**), 128.8 (**e**), 125.3 (**i**)

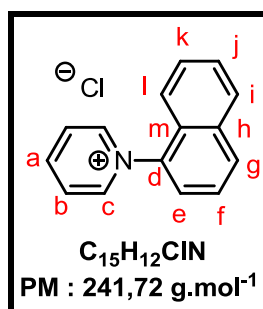
ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3471$ ($\nu_{\text{N-H}}$), 3118 ($\nu_{\text{C-H}}$ (pyr+)), 2923 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1661 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1499 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1487 ($\nu_{\text{C=C}}$), 764 ($\gamma_{\text{C-H}}$), 673 ($\gamma_{\text{C-H}}$) cm^{-1}

CLHP : (100 % MeOH) $R_t = 4.73$ min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 199 ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}^+$, 100 %), 200 ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}^{2+}$, 14 %)

Analyse élémentaire calculée pour $[\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$: C (53.24 %), H (5.58 %), N (10.35 %) ; trouvée C (53.42 %), H (5.24 %), N (10.49 %)

❖ **1-(naphthalen-1-yl)pyridin-1-ium chloride (3u) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.6 mmol (85.9 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 20 min.

Purification : méthode 1

Rendement isolé : 70 %

CAS number : 147308-75-6

Aspect : solide rouge vineux très visqueux (hygroscopique)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.27 (d, 2H, $J_{c-b} = 7.4$ Hz, **c**), 8.96 (t, 1H, $J_{a-b} = 7.4$ Hz, **a**), 8.43 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 7.4$ Hz, **b**), 8.33 (d, 1H, $J_{l-k} = 8.3$ Hz, **l**), 8.19 (d, 1H, $J_{i-j} = 7.0$ Hz, **i**), 7.96 (d, 1H, $J_{g-f} = 7.3$ Hz, **g**), 7.81 (t, 1H, $J_{f-e} = J_{f-g} = 7.3$ Hz, **f**), 7.73 (massif, 2H, **j** et **k**), 7.39 (d, 1H, $J_{e-f} = 7.3$ Hz, **e**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 147.9 (**a**), 147.1 (**c**), 139.5 (**d**), 134.8 (**m**), 132.5 (**l**), 129.6 (**j**), 129.1 (**i**), 128.9 (**b**), 128.2 (**k**), 127.5 (**h**), 125.6 (**f**), 124.7 (**g**), 120.5 (**e**)

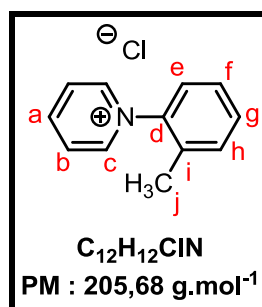
ATR-FTIR (neat) : ν = 3364 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3034 (ν_{C-H}), 1509 (ν_{C=C}), 1469 (ν_{C=C}), 774 (γ_{C-H}), 684 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.04 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 206 (C₁₅H₁₂N⁺, 100 %), 207 (C₁₅H₁₃N²⁺, 15 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₅H₁₂ClN.H₂O] : C (69.36 %), H (5.43 %), N (5.39 %); trouvée C (69.49 %), H (5.38 %), N (5.41 %)

❖ 1-(*o*-tolyl)pyridin-1-ium chloride (3v) :



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.4 mmol (42.8 mg), **θ** = 130° C et **t** = 15 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 94 %

CAS number : 17434-89-8

Aspect : poudre marron

Point de fusion : 79-81°C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.13 (dd, 2H, $J_{c-b} = 6.7$ Hz, $J_{c-a} = 1.3$ Hz, **c**), 8.86 (tt, 1H, $J_{a-b} = 6.7$ Hz, $J_{a-c} = 1.3$ Hz, **a**), 8.34 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 6.7$ Hz, **b**), 7.68-7.53 (massif, 4H, **e, f, g** et **h**), 2.21 (s, 3H, **j**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 148.5 (**a**), 147.4 (**c**), 143.9 (**d**), 134.0 (**i**), 133.4 (**g**), 133.0 (**f**), 129.8 (**b**), 129.2 (**h**), 127.0 (**e**), 17.2 (**j**)

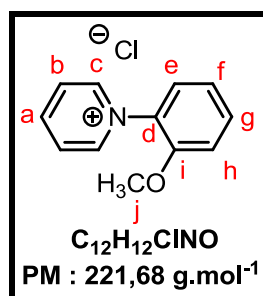
ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3365$ (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3118 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 2923 (ν_{C-H}), 1487 ($\nu_{C=C}$), 1469 ($\nu_{C=C}$), 1385 (δ_{CH_3}), 767 (γ_{C-H}), 717 (γ_{C-H}), 685 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 3.87 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 170 (C₁₂H₁₂N⁺, 100 %), 171 (C₁₂H₁₃N²⁺, 13 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₁₂ClN.7/4H₂O] : C (60.76 %), H (6.59 %), N (5.90 %) ; trouvée C (60.93 %), H (6.28 %), N (5.99 %)

❖ **1-(2-methoxyphenyl)pyridin-1-ium chloride (3w) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.4 mmol (49.3 mg), **θ** = 130 °C et **t** = 30 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 80 %

CAS number : 17434-94-5

Aspect : poudre beige

Point de fusion : 131-133 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 9.24 (dd, 2H, $J_{c-b} = 6.5$ Hz, $J_{c-a} = 1.2$ Hz, **c**), 8.81 (tt, 1H, $J_{a-b} = 6.5$ Hz, $J_{a-c} = 1.2$ Hz, **a**), 8.32 (t, 2H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 6.5$ Hz, **b**), 7.77 (d, 1H, $J_{h-g} = 7.9$ Hz, **h**), 7.72 (t, 1H, $J_{g-h} = J_{g-f} = 7.9$ Hz, **g**), 7.46 (d, 1H, $J_{e-f} = 7.9$ Hz, **e**), 7.28 (t, 1H, $J_{f-e} = J_{f-g} = 7.9$ Hz, **f**), 3.86 (s, 3H, **j**)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 151.8 (**i**), 147.1 (**a**), 146.7 (**c**), 133.0 (**g**), 131.2 (**d**), 127.9 (**b**), 126.9 (**h**), 121.2 (**f**), 113.4 (**e**), 56.6 (**j**)

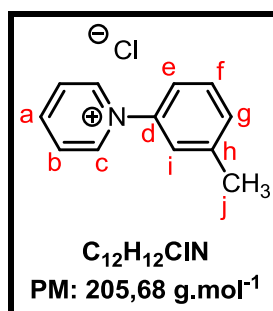
ATR-FTIR (neat) : ν = 3440 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3380 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3031 (ν_{C-H}), 2841 (ν_{C-O}), 1606 (ν_{C=C}), 1440 (ν_{C=C}), 1277 (ν_{C-O}), 1020 (ν_{C-O}), 763 (γ_{C-H}), 684 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.05 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 186 (C₁₂H₁₂NO⁺, 100 %), 187 (C₁₂H₁₃NO²⁺, 17 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₁₂ClNO.4/3H₂O] : C (58.66 %), H (6.02 %), N (5.70 %) ; trouvée C (58.82 %), H (5.66 %), N (5.86 %)

❖ **1-(*m*-tolyl)pyridin-1-ium chloride (3x) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : **n** = 0.24 mmol (25.7 mg), **θ** = 130 °C et **t** = 20 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 95 %

CAS number : 17434-90-1

Aspect : solide marron très visqueux (hygroscopique)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.28 (d, 2H, J_{c-b} = 6.9 Hz, **c**), 8.82 (t, 1H, J_{a-b} = 6.9 Hz, **a**), 8.33 (t, 2H, J_{b-a} = J_{b-c} = 6.9 Hz, **b**), 7.73 (s, 1H, **i**), 7.68-7.58 (massif, 3H, **e**, **f** et **g**), 2.54 (s, 3H, **j**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 147.9 (**a**), 146.1 (**c**), 144.6 (**d**), 142.7 (**h**), 133.5 (**g**), 131.6 (**f**), 129.7 (**b**), 126.1 (**i**), 122.7 (**e**), 21.5 (**j**)

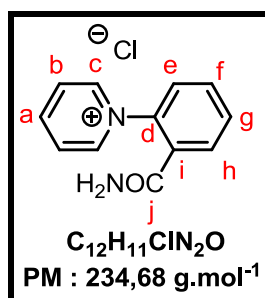
ATR-FTIR (neat) : ν = 3409 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3360 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 3032 (ν_{C-H}), 1492 (ν_{C=C}), 1382 (δ_{CH₃}), 808 (γ_{C-H}), 774 (γ_{C-H}), 717 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 4.23 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 170 (C₁₂H₁₂N⁺, 100 %), 171 (C₁₂H₁₃N²⁺, 12 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₁₂ClN.5/2H₂O] : C (57.49 %), H (6.83 %), N (5.59 %) ; trouvée C (57.85 %), H (6.47 %), N (5.65 %)

❖ **1-(2-carbamoylphenyl)pyridin-1-ium chloride (3y) :**



Préparation : Préparé selon procédure générale **P-4** avec : l'eau comme solvant, **n** = 2.4 mmol 326.4 mg), **θ** = 150 °C et **t** = 50 min.

Purification : méthode 2

Rendement isolé : 45 %

Aspect : poudre beige

Point de fusion : 205-207 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 9.11 (dd, 2H, J_{c-b} = 6.8 Hz, J_{c-a} = 1.3 Hz, **c**), 8.79 (tt, 1H, J_{a-b} = 6.8 Hz, J_{a-c} = 1.3 Hz, **a**), 8.238 (t, 2H, J_{b-a} = J_{b-c} = 6.8 Hz, **b**), 8.01 (m, 1H, **g**), 7.85 (massif, 2H, **e** et **f**), 7.79 (m, 1H, **h**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 169.3 (**j**), 148.5 (**a**), 147.5 (**c**), 142.6 (**d**), 133.9 (**e**), 133.3 (**f**), 132.2 (**i**), 130.9 (**g**), 128.9 (**b**), 128.6 (**h**)

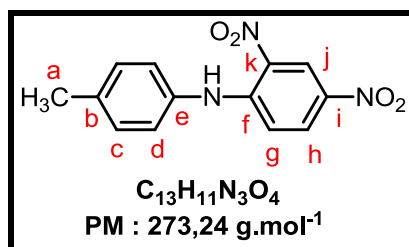
ATR-FTIR (neat) : ν = 3360 (ν_{N-H}), 3074 (ν_{C-H} (pyr⁺)), 1718 (ν_{C=O}), 1670 (ν_{C=O}), 1473 (ν_{C=C}), 1390 (ν_{C=C}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.02 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 198 (C₁₂H₁₁N₂O⁺, 100 %), 199 (C₁₂H₁₂N₂O²⁺, 13 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₁₁ClN₂O.4/3H₂O] : C (55.71 %), H (5.32 %), N (10.83 %) ; trouvée C (55.46 %), H (5.20 %), N (10.97 %)

❖ 2,4-dinitro-*N*-(*p*-tolyl)aniline (5a) :



Préparation : Dans un schlenk, sont introduits 522 mg (2 mmol) de 3-(2,4-dinitrophenoxy)pyridine et 4 équivalents (4 mmol, 428 mg) de 3-hydroxypyridine dans 20 mL d'EtOH. Le mélange est laissé sous agitation et chauffé à 85 °C pendant 10 jours. Après évaporation du solvant et lavages successifs au diéthyl éther, le produit est récupéré sous forme d'une poudre rouge (Tf = 131-133 °C) par filtration sur fritté (205 mg, 82 %).

Rendement isolé : 82 %

CAS number : 1033-01-8

Aspect: poudre rouge

Point de fusion : 131-133 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 10.13 (s, 1H, NH), 8.90 (d, 1H, $J_{j-h} = 2.8$ Hz, j), 8.21 (dd, 1H, $J_{h-g} = 8.5$ Hz, $J_{h-j} = 2.8$ Hz, h), 7.33 (d, 1H, $J_{d-c} = 8.3$ Hz, d), 7.27 (d, 1H, $J_{c-d} = 8.3$ Hz, c), 7.04 (d, 1H, $J_{g-h} = 8.5$ Hz, g), 2.36 (s, 3H, a)

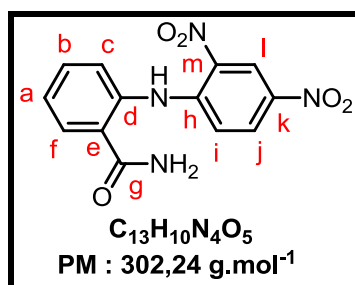
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 147.1 (f), 136.6 (k), 136.1 (i), 135.0 (e), 130.9 (b), 130.3 (d), 129.8 (h), 125.9 (c), 123.5 (j), 116.8 (g), 20.6 (a)

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 24.79 min

ATR-FTIR(neat) : ν = 3311 (ν_{N-H}), 3108 (ν_{C-H}), 1597 (ν_{C=C}), 1580 (ν_{C=C}), 1517 (ν_{C=C}), 1422 (ν_{NO₂}), 1378 (ν_{NO₂}), 1333 (ν_{CH₃}), 1219 (ν_{C-N}), 1019 (γ_{C-H}), 985 (γ_{C-H}), 773 (γ_{N-H}), 691 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 180 (28 %), 181 (14 %), 182 (17 %), 210 (15 %), 256 (12 %), 273 (100 %), 274 (15 %)

❖ 2-((2,4-dinitrophenyl)amino)benzamide (5y) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-4** avec : l'EtOH comme solvant, **n** = 4, **T** = 150°C et **t** = 30 min

Purification : recristallisation dans le MeOH

Rendement isolé : 47 %

CAS number: 500696-79-7

Aspect : poudre jaune

Point de fusion : > 250 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 11.69 (s, 1H, **NH**), 8.91 (d, 1H, $J_{l,j} = 2.3$ Hz, **l**), 8.29 (t, 2H, $J_{j-i} = 8.4$ Hz, $J_{j-f} = 2.3$ Hz, **j**), 8.22 (s, 1H, **NH₂**), 7.77 (d, 1H, $J_{f-a} = 7.4$ Hz, **f**), 7.62 (s, 1H, **NH₂**), 7.62-7.53 (massif, 3H, **b**, **i** et **c**), 7.32 (t, 1H, $J_{a-f} = J_{a-b} = 7.4$ Hz, **a**)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 169.5 (**g**), 144.6 (**m**), 137.3 (**d**), 137.2 (**e**), 133.1 (**h**), 131.6 (**i**), 129.8 (**j**), 129.3 (**f**), 127.1 (**k**), 125.0 (**a**), 123.5 (**l**), 122.6 (**b**), 117.6 (**c**)

ATR-FTIR (neat) : ν = 3459 (ν_{N-H}), 3427 (ν_{N-H}), 3117 (ν_{C-H}), 1674 (ν_{C=O}), 1653 (ν_{C=O}), 1613 (ν_{N-H}), 1503 (ν_{-NO₂}), 1450 (ν_{-NO₂}), 1388 (ν_{-NO₂}), 875 (γ_{C-H}), 773 (γ_{C-H}) cm⁻¹

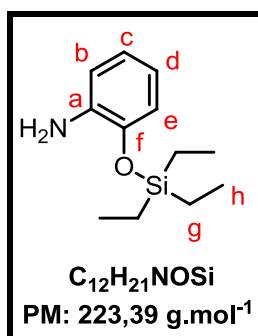
CLHP : (90 % MeOH / 10 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 2.41 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI) : 182 (7 %), 301 (100 %), 302 (11 %)

HRMS : *m/z* calculée pour C₁₃H₁₁N₄O₅ [M+H]⁺ : 303.072396 ; trouvée : 303.072805 ; ΔHRMS = 1.4 ppm

m/z calculée pour C₁₃H₁₀N₄NaO₅ [M+Na]⁺ : 325.054340 ; trouvée : 325.054879 ; ΔHRMS = 1.7 ppm

❖ 2-((triethylsilyl)oxy)aniline (6) :



Préparation : Dans un ballon, sont introduits 0.8 g (7.33 mmol) de 2-aminophenol, 1.1 équivalents (8.06 mmol, 1.22 g) de chlorure de triéthylsilane et 1.5 équivalents (11 mmol, 0.75 g) d'imidazole dans 30 mL de dichlorométhane distillé. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Après évaporation du solvant, les impuretés sont éliminées par distillation au four à boule et le produit est récupéré sous forme d'une huile marron (1.257 g, 77 %).

Purification : distillation au four à boule

Rendement isolé : 77 %

CAS number : 210642-61-8

Aspect: huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 6.74 (td, 1H, $J_{e-d} = J_{e-c} = 7.8$ Hz, $J_{e-b} = 1.6$ Hz, e), 6.71 (massif, 2H, c et d), 6.60 (td, 1H, $J_{b-c} = J_{b-d} = 7.8$ Hz, $J_{b-e} = 1.6$ Hz, b), 0.99 (t, 9H, $J_{h-g} = 7.8$ Hz, h), 0.77 (q, 6H, $J_{g-h} = 7.8$ Hz, g)

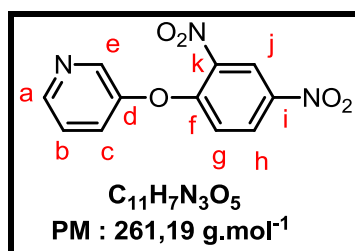
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 143.2 (a), 138.2 (f), 122.0 (e), 118.6 (b), 118.4 (c), 115.8 (d), 6.9 (h), 5.4 (g)

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 14.00 min.

ATR-FTIR(neat) : ν = 3376 (ν_{N-H}), 3303 (ν_{N-H}), 3032 (ν_{C-H}), 2876 (ν_{C-H}), 1612 (δ_{N-H}), 1504 (ν_{C=C}), 1457 (δ_{CH2}), 1332 (δ_{CH3}), 1274 (ν_{Si-O-Et}), 1222 (ν_{Si-O-Et}), 917 (γ_{C-H}), 815 (γ_{N-H}), 724 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 136 (16 %), 164 (42 %), 165 (12 %), 166 (4 %), 193 (3 %), 194 (100 %), 195 (17 %), 223 (55 %), 224 (40 %)

❖ 3-(2,4-dinitrophenoxy)pyridine (7) :



Préparation : Dans un schlenk, sont introduits 3.85 g (19.1 mmol) de 1-chloro-2,4-dinitrobenzene et 1.81g (19.1 mmol) de 3-hydroxypyridine dans 50 mL d'acétone. Ensuite, 0.5 équivalent de carbonate de césium (9.5 mmol, 3.1 g) sont ajoutés au mélange réactionnel. Le mélange est laissé sous agitation et chauffé à 85 °C pendant deux jours. Après évaporation du solvant et lavages successifs au diéthyl éther, le produit est récupéré sous forme d'une poudre marron (Tf = 132-134 °C) par filtration sur fritté (5 g, 100 %).

Rendement isolé : 100 %

CAS number : 40604-27-1

Aspect: poudre marron

Point de fusion : 132-134 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 8.93 (d, 1H, $J_{e-c} = 4.7$ Hz, e), 8.61 (d, 1H, $J_{j-h} = 5.1$ Hz, j), 8.58 (dd, 1H, $J_{a-b} = 6.9$ Hz, $J_{a-c} = 2.1$ Hz, a), 8.47 (dd, 1H, $J_{h-g} = 8.7$ Hz, $J_{h-j} = 5.1$ Hz, h), 7.78 (ddd, 1H, $J_{c-b} = 8.2$ Hz, $J_{c-e} = 4.7$ Hz, $J_{c-a} = 2.1$ Hz, c), 7.58 (dd, 1H, $J_{b-c} = 8.2$ Hz, $J_{b-a} = 6.9$ Hz, b), 7.29 (d, 1H, $J_{g-h} = 8.7$ Hz, g)

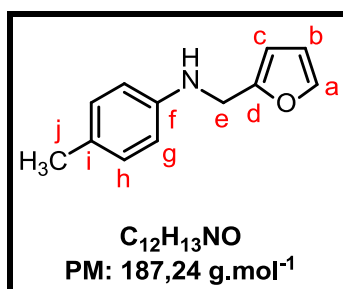
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 154.1 (f), 150.9 (i), 147.0 (a), 142.0 (k), 141.7 (j), 139.6 (d), 129.8 (h), 127.8 (c), 125.4 (b), 122.0 (e), 120.0 (g)

ATR-FTIR (neat) : ν = 3109 (ν_{C-H}), 1605 (ν_{C=C}), 1518 (ν_{C=C}), 1341 (ν_{NO₂}), 1318 (ν_{NO₂}), 1137 (ν_{C-O}), 1100 (ν_{C-O}), 912 (γ_{C-H}), 744 (γ_{C-H}), 702 (γ_{N-H}) cm⁻¹

CLHP : (50 % MeOH / 50 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 8.17 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 262 (C₁₁H₈N₃O₅⁺, 100 %), 263 (C₁₁H₉N₃O₅²⁺, 12 %)

❖ *N*-(furan-2-ylmethyl)-4-methylaniline (**8a**) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 2** avec : $n_1 = 20$, $n_2 = 40$, $V = 120$, $t_1 = 18$ h, $t_2 = 5$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP)

Rendement isolé : 58 %

CAS number : 3139-27-3

Aspect: huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.39 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.2$ Hz, **a**), 7.03 (d, 2H, $J_{h-g} = 8.3$ Hz, **h**), 6.63 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.3$ Hz, **g**), 6.34 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.2$ Hz, **b**), 6.24 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.2$ Hz, **c**), 4.31 (s, 2H, **e**), 2.27 (s, 3H, **j**)

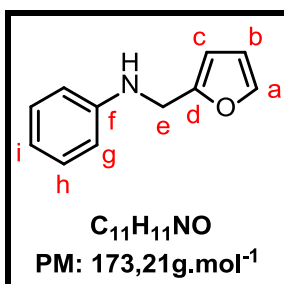
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 153.0 (**d**), 145.4 (**f**), 141.9 (**a**), 129.8 (**h**), 127.3 (**i**), 113.4 (**g**), 110.3 (**b**), 106.9 (**c**), 41.8 (**e**), 20.5 (**j**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 14.06$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3402$ (ν_{N-H}), 3115 (ν_{C-H}), 1672 (ν_{N-H}), 1518 ($\nu_{C=C}$), 1482 ($\nu_{C=C}$), 1458 (δ_{CH_2}), 1346 (δ_{CH_3}), 806 (γ_{C-H}), 734 (γ_{N-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : 53 (15 %), 81 (23 %), 91 (8 %), 142 (4 %), 143 (5 %), 144 (8 %), 186 (100 %), 187 (63 %), 188 (10 %)

❖ *N*-(furan-2-ylmethyl) aniline (**8b**) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 1** avec : **n₁** = 32, **n₂** = 64, **V** = 30, **t** = 18 h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt, 8/2)

Rendement isolé : 92 %

CAS number: 4439-56-9

Aspect : huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.38 (dd, 1H, $J_{a-b} = 2.1$ Hz, $J_{a-c} = 1.3$ Hz, **a**), 7.22-7.18 (t, 2H, $J_{h-i} = J_{h-g} = 8.3$ Hz, **h**), 6.77-6.75 (t, 1H, $J_{i-h} = 8.3$ Hz, **i**), 6.70-6.68 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.3$ Hz, **g**), 6.33 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.1$ Hz, **b**), 6.24 (dd, 1H, $J_{c-b} = 2.1$ Hz, $J_{c-a} = 1.3$ Hz, **c**), 4.33 (s, 2H, **e**)

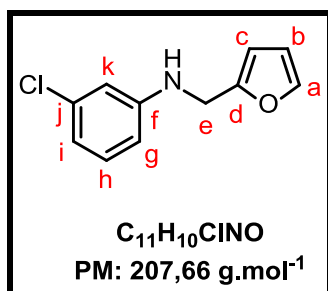
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 152.8 (**d**), 147.6 (**f**), 141.9(**a**), 129.3 (**h**), 118.1 (**i**), 113.2 (**g**), 110.4 (**b**), 107.0 (**c**), 41.5 (**e**)

CPG : (Appareil A, méthode 1) **Rt** = 10.70 min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3407$ (ν_{N-H}), 3052 (ν_{C-H}), 1601 (δ_{N-H}), 1503 ($\nu_{C=C}$), 1460 ($\nu_{C=C}$), 1433 (δ_{CH_2}), 743(γ_{C-H}), 690 (γ_{N-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : 53 (21 %), 77 (10 %), 81 (42 %), 144 (14 %), 145 (12 %), 172 (100 %), 173 (78 %), 174 (8 %)

❖ **3-Chloro-N-(furan-2-ylmethyl)aniline (8c) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1, méthode 1** avec : **n₁ = 8, n₂ = 16, V = 10, t = 24 h**

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt, 9/1 → 8/2)

Rendement isolé : 80 %

CAS number : 51597-76-3

Aspect : huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.36 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.2$ Hz, **a**), 7.08-7.04 (t, 1H, $J_{h-g} = J_{h-i} = 8.2$ Hz, **h**), 6.68 (dd, 1H, $J_{i-h} = 8.2$ Hz, $J_{i-k} = 2.2$ Hz, **i**), 6.63 (t, 1H, $J_{k-i} = J_{k-g} = 2.2$ Hz, **k**), 6.51 (dd, 1H, $J_{g-h} = 8.2$ Hz, $J_{g-k} = 2$ Hz, **g**), 6.31 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.2$ Hz, **b**), 6.23 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.2$ Hz, **c**), 4.27 (s, 2H, **e**)

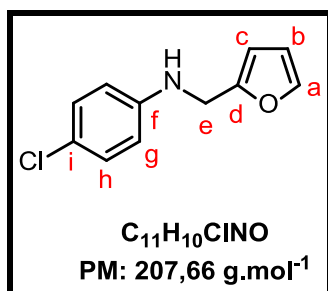
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 151.0 (**d**), 147.7 (**f**), 141.1 (**a**), 133.9 (**j**), 129.1 (**i**), 116.8 (**h**), 111.7 (**k**), 110.4 (**g**), 109.4 (**b**), 106.2 (**c**), 40.1 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 15.62 min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3372$ (ν_{N-H}), 3115 (ν_{C-H}), 1598 (δ_{N-H}), 1501 ($\nu_{C=C}$), 1442 (δ_{CH_2}), 826 (γ_{C-H}), 735 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (24 %), 81 (53 %), 83 (15 %), 179 (12 %), 206 (97 %), 207 (100 %), 208 (51 %), 209 (32 %)

❖ **4-Chloro-N-(furan-2-ylmethyl)aniline (8d) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1, méthode 1** avec : **n₁ = 8, n₂ = 16, V = 10, t = 48 h**

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt, 9/1 → 8/2)

Rendement isolé : 84 %

CAS number : 33829-87-7

Aspect : huile marron, **Rendement :** 84 %

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.37 (dd, 1H, $J_{a-b} = 2.3$ Hz, $J_{a-c} = 1.0$ Hz, **a**), 7.14-7.12 (d, 2H, $J_{h-g} = 9.1$ Hz, **h**), 6.62-6.60 (d, 2H, $J_{g-h} = 9.1$ Hz, **g**), 6.32 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.3$ Hz, **b**), 6.24 (dd, 1H, $J_{c-b} = 2.3$ Hz, $J_{c-a} = 1.0$ Hz, **c**), 4.29 (s, 2H, **e**)

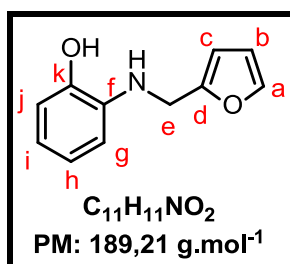
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 152.3 (**d**), 146.1 (**f**), 142.1 (**a**), 129.1 (**h**), 122.6 (**i**), 114.3 (**g**), 110.4 (**b**), 107.2 (**c**), 41.5 (**e**)

CPG : (Appareil A, méthode 1) $R_t = 14.50$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3412$ (ν_{N-H}), 3118 (ν_{C-H}), 1674 (δ_{N-H}), 1600 ($\nu_{C=C}$), 1495 ($\nu_{C=C}$), 1460 (δ_{CH_2}), 813 (γ_{C-H}), 733 (γ_{N-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : 53 (24 %), 81 (57 %), 82 (3 %), 179 (8 %), 206(100 %), 207 (68 %), 208 (39 %), 209 (23 %)

❖ 2-((Furan-2-ylmethyl)amino)phenol (**8e**) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 3** avec : $n_1 = 20$, $n_2 = 24$, $V = 80$, $t_1 = 4$ j, $t_2 = 2$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 5/5 → 0/1)

Rendement isolé : 42 %

CAS number : 86818-41-9

Aspect : huile marron verdâtre

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.38 (dd, 1H, $J_{a-b} = 1.8$ Hz, $J_{a-c} = 0.8$ Hz, **a**), 6.88 (t, 1H, $J_{i-j} = J_{i-h} = 7.8$ Hz, **i**), 6.76 (d, 1H, $J_{g-h} = 8.0$ Hz, **g**), 6.72-6.67 (massif, 2H, **j** et **h**), 6.32 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.8$ Hz, **b**), 6.24 (dd, 1H, $J_{c-b} = 2.8$ Hz, $J_{c-a} = 0.8$ Hz, **c**), 4.32 (s, 2H, **e**)

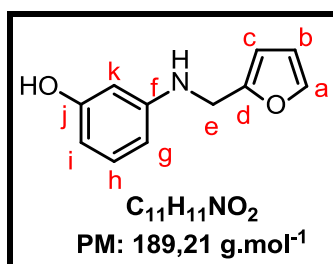
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 152.7 (**d**), 144.3 (**f**), 142.0 (**a**), 136.2 (**k**), 121.5 (**h**), 118.9 (**i**), 114.6 (**j**), 113.4 (**g**), 110.4 (**b**), 107.2 (**c**), 42.0 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 15.11$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3119$ (ν_{O-H}), 1606 (δ_{N-H}), 1509 ($\nu_{C=C}$), 1489 ($\nu_{C=C}$), 1448 (δ_{CH_2}), 1367 (δ_{O-H}), 817 (γ_{C-H}), 732 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 52 (3 %), 53 (37 %), 80 (23 %), 81 (100 %), 82 (7 %), 108 (12 %), 109 (4 %), 187 (2 %), 188 (11 %), 189 (37 %)

❖ 3-((Furan-2-ylmethyl)amino)phenol (8f) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 3** avec : $n_1 = 40$, $n_2 = 48$, $V = 80$, $t_1 = 5$ h, $t_2 = 2$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 8/2 → 2/8)

Rendement isolé : 12 % (produit se dégrade sur gel de silice)

CAS number : 1042597-30-7

Aspect: huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.35 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.6$ Hz, **a**), 7.01 (t, 1H, $J_{h-g} = J_{h-i} = 8.0$ Hz, **h**), 6.31 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 1.6$ Hz, **b**), 6.25-6.22 (massif, 3H, **g**, **i** et **k**), 6.17 (d, 1H, $J_{c-b} = 1.6$ Hz, **c**), 4.25 (s, 2H, **e**)

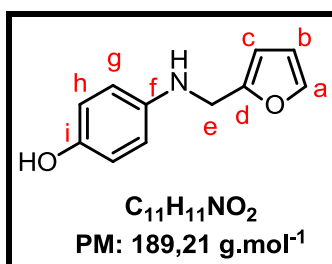
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 157.2 (**j**), 152.7 (**d**), 149.3 (**f**), 142.1 (**a**), 130.3 (**h**), 110.5 (**b**), 107.2 (**i**), 106.1 (**g**), 105.4 (**k**), 100.4 (**c**), 41.5 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 16.37$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3118$ (ν_{O-H}), 1696 (δ_{N-H}), 1594 (δ_{N-H}), 1498 ($\nu_{C=C}$), 1444 (δ_{CH_2}), 1333 (δ_{O-H}), 823 (γ_{C-H}), 736 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (22 %), 81 (32 %), 160 (10 %), 188 (100 %), 189 (88 %), 190 (11%)

❖ 4-((Furan-2-ylmethyl)amino)phenol (8g) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 3** avec : $n_1 = 20$, $n_2 = 20$, $V = 80$, $t_1 = 18$ h, $t_2 = 2$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 5/5 → 0/1)

Rendement isolé : 45 %

CAS number : 123558-04-3

Aspect: poudre marron clair

Point de fusion : 110-112°C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 7.39 (dd, 1H, $J_{a-b} = 2.2$ Hz, $J_{a-c} = 1.1$ Hz, **a**), 6.64 (s, 4H, **g** et **h**), 6.31 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.2$ Hz, **b**), 6.21 (dd, 1H, $J_{c-b} = 2.2$ Hz, $J_{c-a} = 1.1$ Hz, **c**), 4.19 (s, 2H, **e**)

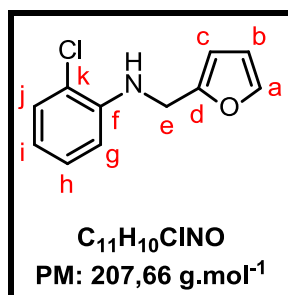
RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 154.8 (**i**), 151.1 (**d**), 142.9 (**a**), 142.5 (**f**), 117.0 (**h**), 116.8 (**g**), 111.2 (**b**), 107.9 (**c**), 43.8 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 16.19$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3338$ (ν_{N-H}), 3115 (ν_{O-H}), 2790 (ν_{O-H}), 1601 (δ_{N-H}), 1514 ($\nu_{C=C}$), 1489 ($\nu_{C=C}$), 1459 (δ_{CH_2}), 1307 (δ_{O-H}), 818 (γ_{C-H}), 732 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 51 (5 %), 53 (19 %), 81 (29 %), 160 (6 %), 161 (8 %), 187 (3 %), 188 (100 %), 189 (73 %), 190 (8 %)

❖ **2-Chloro-N-(furan-2-ylmethyl)aniline (8h) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1, méthode 2** avec : **n₁ = 20, n₂ = 24, V = 120, t₁ = 5 h, t₂ = 18 h**

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt, 9/1 → 8/2)

Rendement isolé : 50 %

CAS number : 849032-51-5

Aspect: huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.38 (d, 1H, *J*_{a-b} = 2.1 Hz, **a**), 7.28-7.25 (d, 1H, *J*_{j-i} = 8.4 Hz, **j**), 7.16-7.12 (t, 1H, *J*_{h-g} = *J*_{h-i} = 8.4 Hz, **h**), 6.74 (d, 1H, *J*_{g-h} = 8.4 Hz, **g**), 6.69-6.65 (t, 1H, *J*_{i-j} = *J*_{i-h} = 8.4 Hz, **i**), 6.33 (t, 1H, *J*_{b-a} = *J*_{b-c} = 2.1 Hz, **b**), 6.25 (d, 1H, *J*_{c-b} = 2.1 Hz, **c**), 4.39 (s, 2H, **e**)

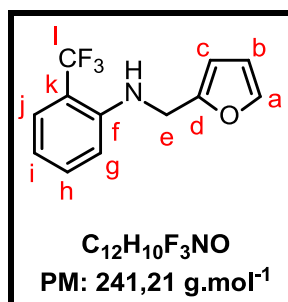
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 152.1 (**d**), 143.4 (**f**), 142.1 (**a**), 129.2 (**j**), 127.8 (**h**), 119.5 (**k**), 117.9 (**i**), 111.6 (**g**), 110.4 (**b**), 107.2 (**c**), 41.1 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 14.40 min

ATR-FTIR (neat) : ν = 3417 (ν_{N-H}), 3069 (ν_{CH}), 1597 (δ_{N-H}), 1503 (ν_{C=C}), 1460 (δ_{CH₂}), 809 (γ_{C-H}), 735 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (38 %), 81 (53 %), 115 (9 %), 144 (13 %), 206 (100 %), 207 (82 %), 208 (50 %), 209 (30 %)

❖ ***N*-(furan-2-ylmethyl)-2-(trifluoromethyl)aniline (8i) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1, méthode 2** avec : **n₁ = 20, n₂ = 40, V = 80, t₁ = 42 h, t₂ = 24 h**

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt, 1/0 → 9/1)

Rendement isolé : 73 %

CAS number : 625092-04-8

Aspect : huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.44 (d, 1H, $J_{j-i} = 8.3$ Hz, **j**), 7.38 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.3$ Hz, **a**), 7.35 (t, 1H, $J_{h-g} = J_{h-i} = 8.3$ Hz, **h**), 6.70 (d, 1H, $J_{g-h} = 8.3$ Hz, **g**), 6.75 (t, 1H, $J_{i-h} = J_{i-j} = 8.3$ Hz, **i**), 6.33 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.3$ Hz, **b**), 6.24 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.3$ Hz, **c**), 4.74 (se, 1H, **NH**), 4.40 (s, 2H, **e**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 151.9 (**d**), 145.1 (**f**), 142.2 (**a**), 133.2 (**h**), 129.0-121.2 (q, $J_{l-F} = 270.1$ Hz, **l**), 126.7 (q, $J_{j-F} = 5.5$ Hz, **j**), 116.6 (**i**), 114.2-113.3 (q, $J_{k-F} = 50.2$ Hz, **k**), 112.2 (**g**), 110.5 (**b**), 107.2 (**c**), 41.0 (**e**)

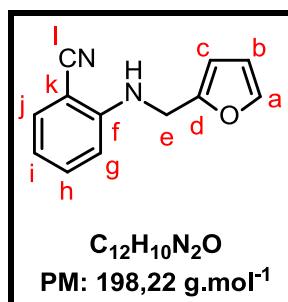
RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -62.17

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 12.65 min

ATR-FTIR (neat): ν = 3372 (ν_{N-H}), 3149 (ν_{CH}), 1606 (δ_{N-H}), 1524 (ν_{C=C}), 1475 (δ_{CH2}), 1324 (ν_{CF3}), 1099 (ν_{CF3}), 824 (γ_{C-H}), 745 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (27 %), 81 (63 %), 145 (6 %), 172 (10%), 213 (12 %), 240 (97 %), 241 (100 %), 242 (19 %)

❖ 2-((Furan-2-ylmethyl)amino)benzonitrile (8j) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1, méthode 2** avec : $n_1 = 10$, $n_2 = 20$, $V = 75$, $t_1 = 48$ h, $t_2 = 18$ h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt, 1/0 → 7/3)

Rendement isolé : 26 %

CAS number : 204078-98-8

Aspect: solide amorphe marron

Point de fusion : 53-56 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.42 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.1$ Hz, **a**), 7.41-7.37 (massif, 2H, **h** et **j**), 6.75 (d, 1H, $J_{g-h} = 8.2$ Hz, **g**), 6.71 (t, 1H, $J_{i-h} = J_{i-j} = 8.2$ Hz, **i**), 6.34 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.1$ Hz, **b**), 6.26 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.1$ Hz, **c**), 4.41 (s, 2H, **e**)

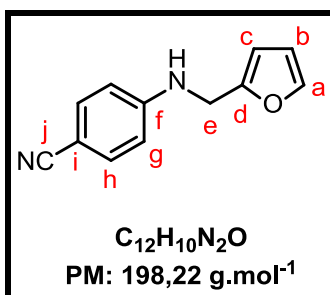
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 150.6 (**d**), 149.2 (**f**), 141.9 (**a**), 135.4 (**h**), 132.2 (**j**), 117.3(**l**), 116.7 (**i**), 110.4 (**g**), 110.0 (**b**), 107.1 (**c**), 95.8 (**k**), 40.1 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 15.22$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3388$ (ν_{N-H}), 3148 (ν_{C-H}), 1605 (δ_{N-H}), 1518 ($\nu_{C=C}$), 1460 (δ_{CH_2}), 1322 (ν_{C-N}), 1300 (ν_{C-N}), 1203 (ν_{C-N}), 862 (γ_{C-H}), 739 (γ_{N-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : 53 (52 %), 81 (100 %), 82 (7 %), 169 (19 %), 170 (18%), 197 (62 %), 198 (91 %), 199 (15 %)

❖ 4-((Furan-2-ylmethyl)amino)benzonitrile (8k) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 1** avec : $n_1 = 10$, $n_2 = 80$, $V = 20$ et 7 éq.de $NaBH_3CN$, $t = 12$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP/ CH_2Cl_2 , 7/3 → 5/5)

Rendement isolé : 51 %

CAS number : 59193-84-9

Aspect: solide marron

Point de fusion : 75-78 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.42 (d, 2H, $J_{h-g} = 8.1$ Hz, **h**), 7.37 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.0$ Hz, **a**), 6.63 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.1$ Hz, **g**), 6.33 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.0$ Hz, **b**), 6.24 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.0$ Hz, **c**), 4.35 (s, 2H, **e**)

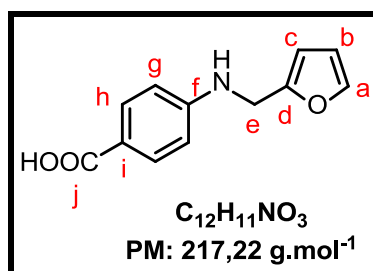
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 151.2 (**d**), 150.7 (**f**), 142.4 (**a**), 133.7 (**h**), 120.3 (**j**), 112.6 (**g**), 110.5 (**b**), 107.6 (**c**), 99.4 (**i**), 40.5 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 18.07$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3371$ (ν_{N-H}), 3148 (ν_{CH}), 1603 (δ_{N-H}), 1526 ($\nu_{C=C}$), 1441 (δ_{CH_2}), 1323 (ν_{C-N}), 1285 (ν_{C-N}), 1193 (ν_{C-N}), 825 (γ_{C-H}), 746 (γ_{N-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : 51 (10 %), 53 (42 %), 81 (100 %), 82 (6 %), 197 (25 %), 198 (53 %), 199 (7 %)

❖ 4-((furan-2-ylmethyl)amino)benzoic acid (8m) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 3** avec : $n_1 = 20$, $n_2 = 28$, $V = 120$, $t_1 = 3$ j, $t_2 = 3$ j. Lors de l'extraction, la phase aqueuse recueillie est acidifiée par ajout de HCl (3 N) afin de protonner la fonction acide (pH = 2), puis lavée au dichlorométhane.

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 54 %

CAS number : 518335-87-0

Aspect: poudre marron

Point de fusion : 170-172 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 7.78 (d, 2H, $J_{h-g} = 8.9$ Hz, **h**), 7.41 (dd, 1H, $J_{a-b} = 1.9$ Hz, $J_{a-c} = 0.8$ Hz, **a**), 6.65 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.9$ Hz, **g**), 6.33 (dd, 1H, $J_{b-c} = 2.6$ Hz, $J_{b-a} = 1.9$ Hz, **b**), 6.24 (dd, 1H, $J_{c-b} = 2.6$ Hz, $J_{c-a} = 0.8$ Hz, **c**), 4.34 (s, 2H, **e**)

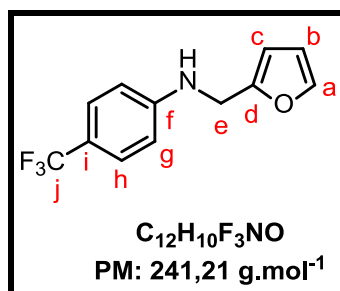
RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 170.8 (**j**), 154.2 (**d**), 154.2 (**f**), 143.2 (**a**), 132.8 (**h**), 119.0 (**i**), 112.6 (**g**), 111.4 (**b**), 108.1 (**c**), 41.1 (**e**)

CPG : (Appareil C, méthode 4) $R_t = 12.62$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3442$ (ν_{N-H}), 2908 (ν_{O-H}), 2550 (ν_{O-H}), 1661 ($\nu_{C=O}$), 1595 (ν_{C-C}), 1450 (ν_{O-H}), 1412 (δ_{CH_2}), 1315 (ν_{C-O}), 1175 (ν_{C-O}), 935 (γ_{O-H}), 836 (γ_{C-H}), 769 (γ_{N-H}), 733 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (46 %), 81 (100 %), 82 (5 %), 189 (14 %), 216 (90 %), 217 (79 %), 218 (12 %)

❖ *N*-(furan-2-ylmethyl)-4-(trifluoromethyl)aniline (**8n**) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, méthode **1** avec : $n_1 = 2$, $n_2 = 16$, $V = 15$, $t = 48$ h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt, 10/0 → 9/1)

Rendement isolé : 43 %

CAS number : 473929-78-1

Aspect : gomme marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.44 (d, 2H, $J_{h-g} = 8.4$ Hz, **h**), 7.40 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.1$ Hz, **a**), 6.73-6.71 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.4$ Hz, **g**), 6.35 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.1$ Hz, **b**), 6.28 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.1$ Hz, **c**), 4.38 (s, 2H, **e**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 151.8 (**d**), 150.1 (**f**), 142.2 (**a**), 129.0-119.9 (q, $J_{j-F} = 258.8$ Hz, **j**), 126.6 (**h**), 119.9-118.9 (q, $J_{i-F} = 40$ Hz, **i**), 112.2 (**g**), 110.5 (**b**), 107.4 (**c**), 40.8 (**e**)

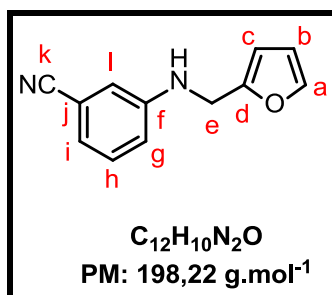
RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -60.81

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 13.68 min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3369$ (ν_{N-H}), 3133 (ν_{C-H}), 1673 (δ_{N-H}), 1610 ($\nu_{C=C}$), 1476 (δ_{CH_2}), 1318 (ν_{CF_3}), 1104 (ν_{CF_3}), 826 (γ_{C-H}), 735 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (39 %), 81 (100 %), 145 (16 %), 172 (11%), 213 (16 %), 240 (57 %), 241 (86 %), 242 (11 %)

❖ **3-Chloro-N-(furan-2-ylmethyl)aniline (8o):**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 2** avec : $n_1 = 40$, $n_2 = 48$, $V = 120$, $t_1 = 66$ h, $t_2 = 24$ h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 56 %

CAS number : 1019520-15-0

Aspect : huile rouge bordeaux

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.35 (dd, 1H, $J_{a-b} = 1.9$ Hz, $J_{a-c} = 0.7$ Hz, **a**), 7.20 (td, 1H, $J_{h-g} = J_{h-i} = 7.5$ Hz, $J_{h-l} = 1.4$ Hz, **h**), 6.96 (d, 1H, $J_{i-h} = 7.5$ Hz, **i**), 6.82 (massif, 2H, **l** et **g**), 6.31 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.2$ Hz, $J_{b-a} = 1.9$ Hz, **b**), 6.23 (dd, 1H, $J_{c-b} = 3.2$ Hz, $J_{c-a} = 0.7$ Hz, **c**), 4.29 (s, 2H, **e**)

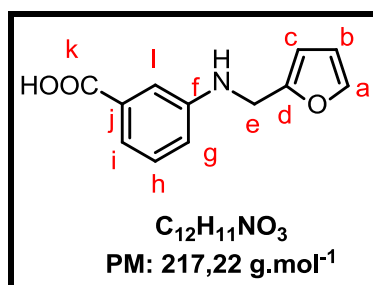
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 151.6 (**d**), 147.9 (**f**), 142.4 (**a**), 130.0 (**h**), 121.4 (**i**), 119.6 (**k**), 117.7 (**g**), 115.4 (**l**), 113.0 (**j**), 110.6 (**b**), 107.6 (**c**), 41.0 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 17.08$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3405$ (ν_{N-H}), 3119 (ν_{CH}), 2227 ($\nu_{C\equiv N}$), 1601 ($\nu_{C=C}$), 1582 ($\nu_{C=C}$), 1506 ($\nu_{C=C}$), 1446 (δ_{CH_2}), 1331 (ν_{C-N}), 1303 (ν_{C-N}), 858 (γ_{N-H}), 810 (γ_{N-H}), 778 (γ_{C-H}), 737 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 51 (10 %), 53 (54 %), 81 (100 %), 82 (6 %), 197 (18 %), 198 (35 %), 199 (5 %)

❖ 3-((furan-2-ylmethyl)amino)benzoic acid (8p) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 3** avec : $n_1 = 20$, $n_2 = 24$, $V = 120$, $t_1 = 24$ h, $t_2 = 3$ j. Lors de l'extraction, la phase aqueuse recueillie est acidifiée par ajout de HCl (3 N) afin de protonner la fonction acide (pH = 2), puis lavée au dichlorométhane.

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 64 %

CAS number : 1152586-02-1

Aspect: solide marron

Point de fusion : 153-155 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 7.40 (dd, 1H, $J_{a-b} = 1.8$ Hz, $J_{a-c} = 0.9$ Hz, **a**), 7.33 (t, 1H, $J_{l-i} = J_{l-g} = 1.1$ Hz, **l**), 7.29 (dt, 1H, $J_{i-h} = 7.9$ Hz, $J_{i-l} = J_{i-g} = 1.1$ Hz, **i**), 7.18 (t, 1H, $J_{h-i} = J_{h-g} = 7.9$ Hz, **h**), 6.88 (dt, 1H, $J_{g-h} = 7.9$ Hz, $J_{g-l} = J_{g-i} = 1.1$ Hz, **g**), 6.32 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.4$ Hz, $J_{b-a} = 2.0$ Hz, **b**), 6.24 (dd, 1H, $J_{c-b} = 3.4$ Hz, $J_{c-a} = 0.9$ Hz, **c**), 4.31 (s, 2H, **e**)

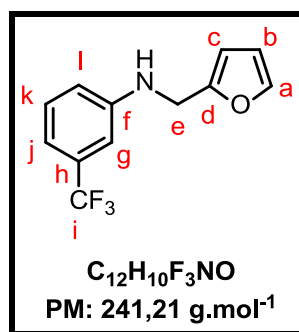
RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 170.8 (**k**), 154.6 (**d**), 150.0 (**f**), 143.1 (**a**), 132.6 (**j**), 130.1 (**h**), 119.6 (**i**), 118.6 (**g**), 114.9 (**l**), 111.4 (**b**), 108.0 (**c**), 41.8 (**e**)

CPG : (Appareil C, méthode 4) $R_t = 13.30$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 2917$ (ν_{O-H}), 1688 ($\nu_{C=O}$), 1604 ($\nu_{C=O}$), 1587 ($\nu_{C=C}$), 1446 (ν_{O-H}), 1384 (ν_{O-H}), 1223 (ν_{C-O}), 919 (γ_{O-H}), 806 (γ_{C-H}), 752 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (47 %), 81 (97 %), 96 (12 %), 115 (12 %), 170 (16 %), 171 (13 %), 189 (9 %), 198 (32 %), 199 (10 %), 216 (100 %), 217 (54 %)

❖ ***N*-(furan-2-ylmethyl)-3-(trifluoromethyl)aniline (8r) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 2** avec : **n₁** = 40, **n₂** = 48, **V** = 120, **t₁** = 2 h, **t₂** = 18 h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP)

Rendement isolé : 45 %

CAS number : 625092-04-8

Aspect : huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.40 (dd, 1H, $J_{a-b} = 1.8$ Hz, $J_{a-c} = 0.8$ Hz, **a**), 7.28 (t, 1H, $J_{k-j} = J_{k-l} = 7.9$ Hz, **k**), 6.99 (d, 1H, $J_{j-k} = 7.9$ Hz, **j**), 6.89 (s, 1H, **g**), 6.81 (d, 1H, $J_{l-k} = 7.9$ Hz, **l**), 6.35 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.2$ Hz, $J_{b-a} = 1.8$ Hz, **b**), 6.26 (dd, 1H, $J_{c-b} = 3.2$ Hz, $J_{c-a} = 0.8$ Hz, **c**), 4.35 (s, 2H, **e**), 4.23 (se, 1H, **NH**)

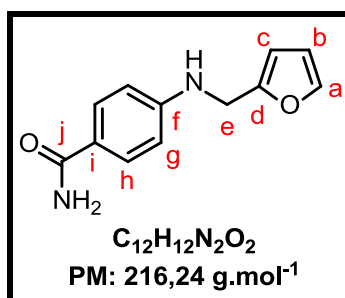
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 152.1 (**d**), 147.9 (**f**), 142.4 (**a**), 132.2-131.2 (q, $J_{h-F} = 31.7$ Hz, **h**), 129.8 (**k**), 128.6-120.4 (q, $J_{i-F} = 272.3$ Hz, **i**), 114.6 (q, $J_{j-F} = 4.0$ Hz, **j**), 110.6 (**b**), 109.5 (q, $J_{g-F} = 4.0$ Hz, **g**), 107,6 (**c**), 41.3 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) **Rt** = 13.03 min

ATR-FTIR (neat): $\nu = 3419$ (ν_{N-H}), 1596 (δ_{N-H}), 1515 ($\nu_{C=C}$), 1477 (δ_{CH_2}), 1332 (ν_{CF_3}), 1147 (ν_{CF_3}), 1116 (ν_{CF_3}), 1066 (ν_{CF_3}), 863 (γ_{C-H}), 738 (γ_{N-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : 51 (10 %), 53 (74 %), 81 (100 %), 82 (7 %), 145 (21%), 172 (13 %), 174 (8 %), 213 (19 %), 240 (61 %), 241 (84 %), 242 (12 %)

❖ 4-((Furan-2-ylmethyl)amino)benzamide (8s) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1, méthode 1** avec : $n_1 = 10$, $n_2 = 50$, $V = 30$, $t = 4$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$, 1/0 → 95/5)

Rendement isolé : 53 %

CAS number : 1019570-60-5

Aspect : solide amorphe marron

Point de fusion : 124-127 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 7.56 (d, 2H, $J_{h-g} = 10.1$ Hz, **h**), 7.31 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.0$ Hz, **a**), 6.57 (d, 2H, $J_{g-h} = 10.1$ Hz, **g**), 6.22 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.0$ Hz, **b**), 6.14 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.0$ Hz, **c**), 4.23 (d, 2H, **e**)

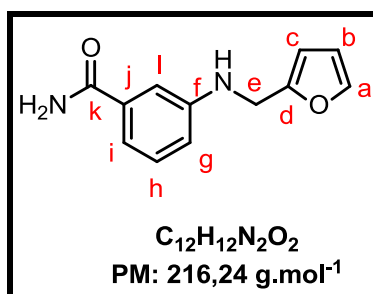
RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 172.8 (**j**), 154.2 (**d**), 153.2 (**f**), 143.1 (**a**), 130.4 (**h**), 121.9 (**i**), 112.7 (**g**), 111.3 (**b**), 107.9 (**c**), 41.1 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 21.37$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3378$ (ν_{N-H}), 3400 (ν_{H-N-H}), 3332 (ν_{H-N-H}), 3184 ($\nu_{=CH}$), 1652 ($\nu_{C=O}$), 1598 (δ_{N-H}), 1531 ($\nu_{C=C}$), 1487 (δ_{CH_2}), 1146 (ν_{C-O}), 830 (γ_{C-H}), 742 (γ_{N-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative): 51 (6 %), 53 (28 %), 81 (51 %), 82 (3 %), 188 (11 %), 215 (100 %), 216 (75 %), 217 (9 %)

❖ 3-((Furan-2-ylmethyl)amino)benzamide (8t) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 2** avec : $n_1 = 40$, $n_2 = 48$, $V = 120$, $t_1 = 1$ h, $t_2 = 18$ h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 5/5 → 0/1)

Rendement isolé : 55 %

CAS number : 500864-87-9

Aspect : huile marron clair

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.40 (dd, 1H, $J_{a-b} = 1.8$ Hz, $J_{a-c} = 0.7$ Hz, **a**), 7.17(massif, 2H, **h** et **l**), 7.10 (dt, 1H, $J_{i-h} = 7.9$ Hz, $J_{i-g} = J_{i-l} = 1.3$ Hz, **i**), 6.84 (ddd, 1H, $J_{g-h} = 7.9$ Hz, $J_{g-l} = 2.4$ Hz, $J_{g-i} = 1.3$ Hz, **g**), 6.31 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.3$ Hz, $J_{b-a} = 1.8$ Hz, **b**), 6.24 (dd, 1H, $J_{c-b} = 3.3$ Hz, $J_{c-a} = 0.7$ Hz, **c**), 4.321 (s, 2H, **e**)

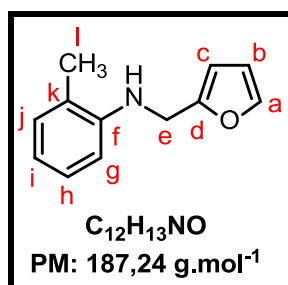
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 173.4 (**k**), 154.6 (**d**), 150.1 (**f**), 143.1 (**a**), 135.8 (**j**), 130.2 (**h**), 117.7 (**g**), 117.3 (**i**), 113.1 (**l**), 111.4 (**b**), 108,0 (**c**), 41.8 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 20.40 min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3407$ (ν_{N-H}), 3192 (ν_{H-N-H}), 3121 (ν_{H-N-H}), 1756 ($\nu_{C=O}$), 1622 (δ_{N-H}), 1599 (δ_{N-H}), 1507 ($\nu_{C=C}$), 1443 (δ_{CH_2}), 1146 (ν_{C-O}), 828 (γ_{C-H}), 743 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 170 (5 %), 171 (4 %), 173 (9 %), 189 (15 %), 198 (9 %), 199 (7 %), 215 (100 %), 216 (70 %), 217 (9 %)

❖ *N*-(furan-2-ylmethyl)-2-methylaniline (**8v**) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 2** avec : **n₁** = 40, **n₂** = 48, **V** = 120, LiAlH₄ utilisé à la place de NaBH₄, **t₁** = 18 h, **t₂** = 24 h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP)

Rendement isolé : 93 %

CAS number : 53656-10-3

Aspect : huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.53 (dd, 1H, *J*_{a-b} = 1.7 Hz, *J*_{a-c} = 0.6 Hz, **a**), 7.30 (t, 1H, *J*_{h-g} = *J*_{h-i} = 7.5 Hz, **h**), 7.24 (d, 1H, *J*_{j-i} = 7.5 Hz, **j**), 6.86 (q, 2H, *J*_{i-j} = *J*_{i-h} = *J*_{g-h} = 7.5 Hz, **g** et **i**), 6.48 (dd, 1H, *J*_{b-c} = 3.2 Hz, *J*_{b-a} = 1.7 Hz, **b**), 6.39 (dd, 1H, *J*_{c-b} = 3.2 Hz, *J*_{c-a} = 0.6 Hz, **c**), 4.50 (s, 2H, **e**), 4.02 (se, 1H, **NH**), 2.30 (s, 3H, **l**)

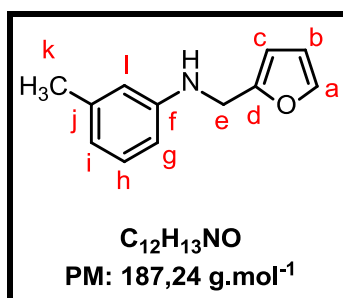
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 152.9 (**d**), 145.7 (**f**), 142.0 (**a**), 130.2 (**j**), 127.2 (**h**), 122.4 (**k**), 117.7 (**i**), 110.4 (**b**), 110.2 (**g**), 107.1 (**c**), 41.5 (**e**), 17.5 (**l**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) : **Rt** = 13.78 min

ATR-FTIR (neat) : **v** = 3430 (**v_{N-H}**), 3117 (**v_{=CH}**), 1671 (**v_{N-H}**), 1505 (**v_{C=C}**), 1476 (**v_{C=C}**), 1448 (**δ_{CH₂}**), 1348 (**δ_{CH₃}**), 806 (**γ_{C-H}**), 742 (**γ_{N-H}**) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 51 (5 %), 53 (16 %), 81 (29 %), 91 (7 %), 186 (100 %), 187 (64 %), 188 (8 %)

❖ *N*-(furan-2-ylmethyl)-3-methylaniline (**8x**) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 2** avec : **n**₁ = 40, **n**₂ = 48, **V** = 120, LiAlH₄ utilisé à la place de NaBH₄, **t**₁ = 72 h, **t**₂ = 24 h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP)

Rendement isolé : 74 %

CAS number : 105909-67-9

Aspect : huile orange

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.39 (dd, 1H, *J*_{a-b} = 1.8 Hz, *J*_{a-c} = 0.7 Hz, **a**), 7.10 (td, 1H, *J*_{h-g} = *J*_{h-i} = 7.2 Hz, *J*_{h-l} = 1.4 Hz, **h**), 6.52 (d, 1H, *J*_{g-h} = 7.2 Hz, **g**), 6.52 (massif, 2H, **i** et **l**), 6.34 (dd, 1H, *J*_{b-c} = 3.1 Hz, *J*_{b-a} = 1.8 Hz, **b**), 6.34 (dd, 1H, *J*_{c-b} = 3.1 Hz, *J*_{c-a} = 0.7 Hz, **c**), 4.33 (s, 2H, **e**), 2.30 (s, 3H, **k**)

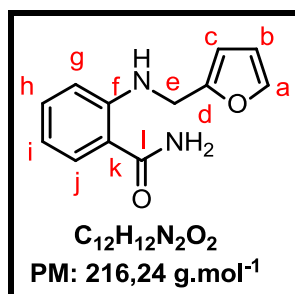
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 153.0 (**d**), 147.8 (**f**), 142.1 (**a**), 139.2 (**j**), 129.3 (**h**), 119.2 (**g**), 114.2 (**i**), 110.5 (**l**), 110.5 (**b**), 107.1 (**c**), 41.7 (**e**), 21.8 (**k**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) **Rt** = 13.99 min

ATR-FTIR (neat) : ν = 3407 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3116 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1682 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1505 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1490 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1446 (δ_{CH_2}), 1323 (δ_{CH_3}), 806 ($\gamma_{\text{C-H}}$), 734 ($\gamma_{\text{N-H}}$) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 51 (7 %), 53 (19%), 81 (36 %), 91 (11 %), 142 (6 %), 143 (8 %), 144 (13 %), 158 (14 %), 159 (6 %), 186 (100 %), 187 (68 %), 188 (8 %)

❖ 2-((Furan-2-ylmethyl)amino)benzamide (8y) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 2** avec : **n₁** = 40, **n₂** = 48, **V** = 120, **t₁** = 2 h, **t₂** = 18 h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 5/5)

Rendement isolé : 72 %

CAS number : 1511349-19-1

Aspect : poudre jaune clair

Point de fusion : 150-153 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.41 (d, 1H, *J*_{j-i} = 8.2 Hz, **j**), 7.36 (d, 1H, *J*_{a-b} = 2.1 Hz, **a**), 7.33 (t, 1H, *J*_{h-g} = *J*_{h-i} = 8.2 Hz, **h**), 6.80 (d, 1H, *J*_{g-h} = 8.2 Hz, **g**), 6.65 (t, 1H, *J*_{i-h} = *J*_{i-j} = 8.2 Hz, **i**), 6.32 (t, 1H, *J*_{b-a} = *J*_{b-c} = 2.1 Hz, **b**), 6.24 (d, 1H, *J*_{c-b} = 2.1 Hz, **c**), 4.41 (s, 2H, **e**)

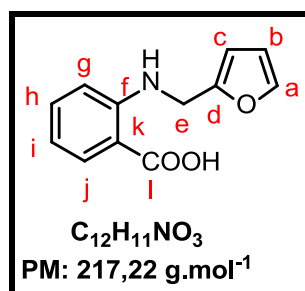
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 171.9 (**l**), 152.3 (**d**), 149.6 (**f**), 141.9 (**a**), 133.5 (**h**), 128.2 (**j**), 115.5 (**i**), 113.7 (**k**), 112.4 (**g**), 110.3 (**b**), 106.9 (**c**), 40.6 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) *Rt* = 18.92 min

ATR-FTIR (neat) : ν = 3441 (ν_{N-H}), 3378 (ν_{HN-H}), 3196 (ν_{HN-H}), 1731 (ν_{C=O}), 1616 (δ_{N-H}), 1511 (ν_{C=C}), 1438 (δ_{CH₂}), 1152 (ν_{C-O}), 844 (γ_{C-H}), 736 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 51 (7 %), 53 (17 %), 81 (17 %), 115 (15 %), 143 (21 %), 170 (100 %), 171 (69 %), 199 (26 %), 216 (75 %), 217 (12 %)

❖ 2-((furan-2-ylmethyl)amino)benzoic acid (**8z**) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 3** avec : $n_1 = 20$, $n_2 = 24$, $V = 120$, $t_1 = 3$ j, $t_2 = 2$ j. Lors de l'extraction, la phase aqueuse recueillie est acidifiée par ajout de HCl (3 N) afin de protonner la fonction acide (pH = 2), puis lavée au dichlorométhane.

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 32 %

CAS number : 501661-50-3

Aspect: poudre blanchâtre

Point de fusion : 217-219 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 8.00 (dd, 1H, $J_{j-i} = 8.1$ Hz, $J_{j-h} = 1.6$ Hz, **j**), 7.42 (td, 1H, $J_{h-i} = J_{h-g} = 8.1$ Hz, $J_{h-j} = 1.6$ Hz, **h**), 7.38 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.5$ Hz, **a**), 6.83 (d, 1H, $J_{g-h} = 8.1$ Hz, **g**), 6.71 (t, 1H, $J_{i-j} = J_{i-h} = 8.1$ Hz, **i**), 6.33 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.1$ Hz, $J_{b-a} = 1.5$ Hz, **b**), 6.25 (d, 1H, $J_{c-b} = 3.1$ Hz, **c**), 4.47 (s, 2H, **e**)

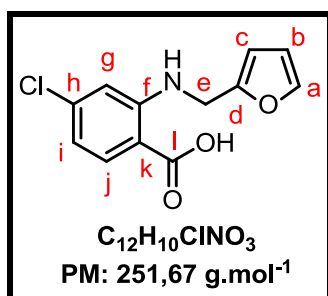
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 173.4 (**l**), 151.8 (**d**), 150.6 (**f**), 142.4 (**a**), 135.8 (**h**), 132.8 (**j**), 116.5 (**i**), 112.6 (**g**), 110.6 (**c**), 110.2 (**k**), 107.6 (**b**), 41.0 (**e**)

CPG : (Appareil C, méthode 4) $R_t = 9.79$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3388$ (ν_{N-H}), 2912 (ν_{O-H}), 1663 ($\nu_{C=O}$), 1574 ($\nu_{C=C}$), 1461 (ν_{O-H}), 1439 (δ_{CH_2}), 1409 (ν_{O-H}), 1322 (ν_{C-O}), 1247 (ν_{C-O}), 936 (γ_{O-H}), 836 (γ_{C-H}), 728 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 51 (10 %), 53 (34 %), 81 (60 %), 96 (28 %), 115 (14 %), 143 (22 %), 144 (7 %), 170 (19 %), 171 (26 %), 172 (9 %), 188 (7 %), 189 (16 %), 198 (13 %), 199 (30 %), 200 (9 %), 216 (23 %), 217 (100 %), 218 (14 %)

❖ **4-Chloro-2-((furan-2-ylmethyl)amino)benzoic acid (8aa) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 3** avec : $n_1 = 10$, $n_2 = 30$, $V = 120$, $t_1 = 6$ j, $t_2 = 3$ j. Lors de l'extraction, la phase aqueuse recueillie est acidifiée par ajout de HCl (3 N) afin de protonner la fonction acide (pH = 2), puis lavée au dichlorométhane.

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 81 %

CAS number : 74793-12-7

Aspect : solide amorphe marron

Point de fusion : 157-160 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.88 (d, 1H, $J_{j-i} = 8.2$ Hz, **j**), 7.37 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.1$ Hz, **a**), 6.75 (d, 1H, $J_{g-i} = 3.0$ Hz, **g**), 6.60 (dd, 1H, $J_{i-j} = 8.2$ Hz, $J_{i-g} = 3.0$ Hz, **i**), 6.33 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.1$ Hz, **b**), 6.24 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.1$ Hz, **c**), 4.40 (s, 2H, **e**)

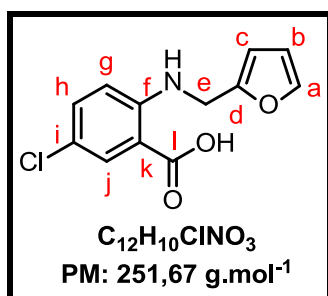
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 171.6 (**l**), 150.8 (**d**), 150.2 (**f**), 141.3 (**a**), 141.0 (**h**), 132.9 (**j**), 114.9 (**i**), 110.3 (**g**), 109.4 (**b**), 106.7 (**k**), 106.3 (**c**), 39.2 (**e**)

CPG : (Appareil A, méthode 3) $R_t = 13.70$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3388$ (ν_{N-H}), 3150 (ν_{C-H}), 2912 (ν_{O-H}), 2947 (ν_{O-H}), 1661 ($\nu_{C=O}$), 1574 (δ_{N-H}), 1514 ($\nu_{C=C}$), 1461 ($\nu_{C=C}$), 1439 (δ_{CH_2}), 955 (γ_{O-H}), 800 (γ_{C-H}), 727 (γ_{N-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : 53 (26 %), 81 (50 %), 96 (26 %), 143 (30 %), 170 (22 %), 171 (26 %), 189 (18 %), 199 (31 %), 216 (21 %), 217 (100 %)

❖ **5-chloro-2-((furan-2-ylmethyl)amino)benzoic acid (8ab) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 3** avec : **n₁ = 10**, **n₂ = 30**, **V = 120**, **t₁ = 4 j**, **t₂ = 2 j**. Lors de l'extraction, la phase aqueuse recueillie est acidifiée par ajout de HCl (3 N) afin de protonner la fonction acide (pH = 2), puis lavée au dichlorométhane.

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 78 %

CAS number : 275945-38-4

Aspect : solide marron clair

Point de fusion : 154-157 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.95 (d, 1H, *J*_{j-h} = 3.1 Hz, **j**), 7.38 (d, 1H, *J*_{a-b} = 1.7 Hz, **a**), 7.35 (dd, 1H, *J*_{h-g} = 8.2 Hz, *J*_{h-j} = 3.1 Hz, **h**), 6.83 (d, 1H, *J*_{g-h} = 8.2 Hz, **g**), 6.33 (dd, 1H, *J*_{b-c} = 3.1 Hz, *J*_{b-a} = 1.7 Hz, **b**), 6.25 (d, 1H, *J*_{c-b} = 3.1 Hz, **c**), 4.46 (s, 2H, **e**)

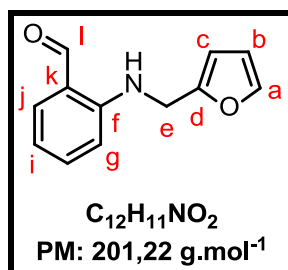
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 171.2 (**l**), 151.2 (**d**), 149.5 (**f**), 142.3 (**a**), 135.5 (**h**), 131.7 (**j**), 123.8 (**i**), 113.1 (**g**), 110.4 (**b**), 108.5 (**k**), 107.4 (**c**), 40.6 (**e**)

CPG : (Appareil A, méthode 1) *R*_t = 20.9 min

ATR-FTIR (neat) : ν = 3391 (ν_{N-H}), 2876 (ν_{O-H}), 2722 (ν_{O-H}), 1667 (ν_{C=O}), 1567 (δ_{N-H}), 1505 (ν_{C=C}), 1437 (δ_{CH2}), 951 (γ_{O-H}), 801 (γ_{C-H}), 726 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (39 %), 81 (100 %), 96 (22 %), 205 (17 %), 223 (21 %), 233 (28 %), 250 (28 %), 251 (87 %), 252 (22 %), 253 (29 %)

❖ 2-((Furan-2-ylmethyl)amino)benzaldehyde (10) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-1**, **méthode 2** avec : $n_1 = 20$, $n_2 = 40$, $V = 80$, $t_1 = 48$ h, $t_2 = 18$ h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : sous-produit présent en traces

Aspect: gomme marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 9.84 (s, 1H, **l**), 7.50 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.2$ Hz, **a**), 7.40-7.37 (massif, 2H, **h** et **j**), 6.77 (d, 1H, $J_{g-h} = 8.3$ Hz, **g**), 6.74 (t, 1H, $J_{i-h} = J_{i-j} = 8.3$ Hz, **i**), 6.32 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.2$ Hz, **b**), 6.24 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.2$ Hz, **c**), 4.45 (s, 2H, **e**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 193.1 (**l**), 150.7 (**d**), 149.2 (**f**), 141.1 (**a**), 135.6 (**h**), 134.8 (**j**), 117.8 (**k**), 114.5 (**i**), 110.0 (**g**), 109.3 (**b**), 106.1 (**c**), 38.9 (**e**)

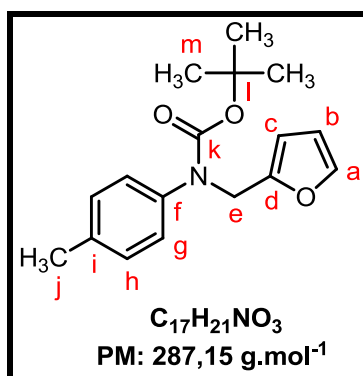
CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 15.52$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3388$ (ν_{N-H}), 3118 (ν_{CH}), 2836 (ν_{H-CO}), 2746 (ν_{H-CO}), 1607 (δ_{N-H}), 1516 ($\nu_{C=C}$), 1460 (δ_{CH_2}), 1321 ($\nu_{HC=O}$), 1271 ($\nu_{HC=O}$), 1241 ($\nu_{HC=O}$), 868 (γ_{C-H}), 742 (γ_{N-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (29 %), 77 (14 %), 81 (37 %), 92 (13 %), 120 (65 %), 144 (12 %), 145 (9 %), 170 (16 %), 172,3 (70 %), 173 (30 %), 184 (15 %), 201 (100 %), 202 (15 %)

HRMS : m/z calculée pour $C_{12}H_{12}NO_2$ $[M+H]^+$: 202.086255 ; trouvée : 202.086044 ; Δ HRMS = 1.0 ppm

❖ **Tert-butyl (furan-2-ylmethyl)(*p*-tolyl)carbamate (12a) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : $n_1 = 19.8$, $n_2 = 19.8$,
 $V = 70$, $t = 3$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP)

Rendement isolé : 58 %

Aspect : huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.34 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.9$ Hz, **a**), 7.11-7.05 (massif, 4H, **g** et **h**), 6.30 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 1.9$ Hz, **b**), 6.16 (d, 1H, $J_{c-b} = 1.9$ Hz, **c**), 4.73 (s, 2H, **e**), 2.32 (s, 3H, **j**), 1.44 (s, 9H, **m**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 154.7 (**k**), 152.0 (**d**), 141.8 (**a**), 139.9 (**i**), 135.8 (**f**), 129.3 (**g**), 126.6 (**h**), 110.3 (**b**), 107.8 (**c**), 80.5 (**l**), 47.1 (**e**), 28.3 (**m**), 21.0 (**j**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 16.63$ min

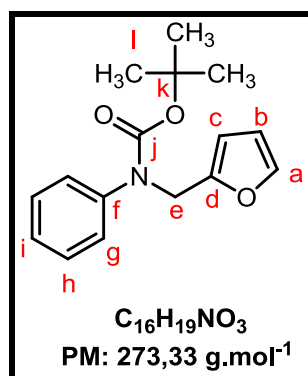
ATR-FTIR (neat) : $\nu = 2976$ (ν_{C-H}), 1695 ($\nu_{C=O}$), 1612 ($\nu_{C=C}$), 1513 ($\nu_{C=C}$), 1452 (δ_{CH_2}), 1149 (ν_{C-O}), 861 (γ_{C-H}), 733 (γ_{C-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : 53 (19 %), 81 (80 %), 82 (6 %), 91 (8 %), 186 (100 %), 187 (39 %), 230 (15 %), 231 (75 %), 232 (13 %)

HRMS : m/z calculée pour C₁₇H₂₂NO₃ [M+H]⁺ : 288.159420; trouvée : 288.159162 ;
 Δ HRMS= 0.9 ppm

m/z calculée pour C₁₇H₂₁NNaO₃ [M+Na]⁺ : 310.141364 ; trouvée : 310.141199 ;
 Δ HRMS= 0.5 ppm

❖ **Tert-butyl (furan-2-yméthyl) (phenyl) carbamate (12b) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : $n_1 = 19$, $n_2 = 21$, $V = 70$, $t = 2 j$

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 9/1)

Rendement isolé : 87 %

Aspect : huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.33 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.1$ Hz, **a**), 7.28-7.26 (d, 2H, $J_{h-g} = 8.2$ Hz, **h**), 7.13-7.11 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.2$ Hz, **g**), 6.30 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.1$ Hz, **b**), 6.24 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.1$ Hz, **c**), 4.73 (s, 2H, **e**), 1.44 (s, 9H, **l**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 154.3 (**j**), 150.9 (**d**), 141.9 (**a**), 128.7 (**f**), 126.8 (**i**), 126.2 (**h**), 128.1 (**g**), 110.3 (**b**), 107.9 (**c**), 80.4 (**k**), 47.1 (**e**), 28.3 (**l**)

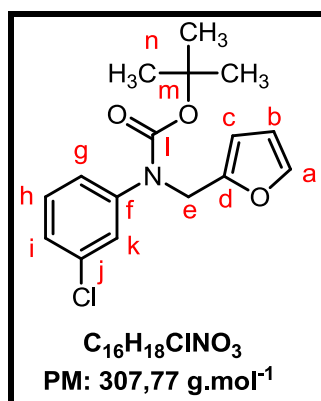
CPG : (Appareil A, méthode 1) $R_t = 14.50$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3412$ (ν_{N-H}), 3118 (ν_{C-H}), 1653 ($\nu_{C=O}$), 1600 ($\nu_{C=C}$), 1495 ($\nu_{C=C}$), 1460 (δ_{CH_2}), 813 (γ_{C-H}), 733 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (23 %), 81 (100 %), 144 (11 %), 145 (10 %), 172 (88 %), 173 (32 %), 216 (12 %), 217 (75 %), 218 (10 %)

HRMS : m/z calculée pour $C_{16}H_{19}NNaO_3$ $[M+Na]^+$: 296.125714 ; trouvée 296.126035 ; $\Delta HRMS = 1.1$ ppm

❖ **Tert-butyl (3-chlorophenyl) (furan-2-ylmethyl) carbamate (12c) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : **n₁ = 20, n₂ = 34, V = 90, t = 6 j**

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP)

Rendement isolé : 51 %

Aspect : huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.35 (d, 1H, *J*_{a-b} = 2.1 Hz, **a**), 7.25-7.21 (massif, 2H, **h** et **k**), 7.17 (d, 1H, *J*_{i-h} = 8.4Hz, **i**), 7.09 (d, 1H, *J*_{g-h} = 8.4 Hz, **g**), 6.30 (t, 1H, *J*_{b-a} = *J*_{b-c} = 2.1 Hz, **b**), 6.18 (d, 1H, *J*_{c-b} = 2.1 Hz, **c**), 4.74 (s, 2H, **e**), 1,44 (s, 9H, **n**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 154.1 (**l**), 151.4 (**d**), 143.6 (**f**), 142.0 (**a**), 134.0 (**j**), 129.5 (**k**), 127.0 (**h**), 126.2 (**i**), 124.8 (**g**), 110.4 (**b**), 108.1 (**c**), 81.2 (**m**), 46.9 (**e**), 28.2 (**n**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 17.26 min

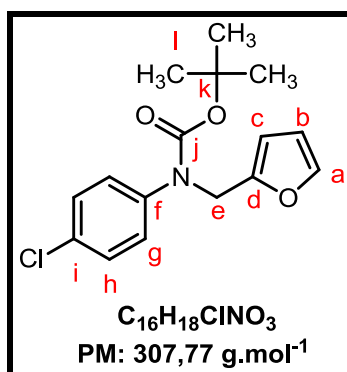
ATR-FTIR (neat) : ν = 2977 (ν_{CH}), 1700 (ν_{C=O}), 1592 (ν_{C=C}), 1503 (ν_{C=C}), 1433 (δ_{CH₂}), 1301 (ν_{C-O}), 1148 (ν_{C-O}), 813 (γ_{C-H}), 734 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (21 %), 81 (100 %), 82 (6 %), 207 (40 %), 208 (21 %), 209 (15 %), 210 (6 %), 252 (47 %), 253 (10 %), 254 (14 %)

HRMS : *m/z* calculée pour C₁₆H₁₉ClNO₃ [M+H]⁺ : 308.104798 ; trouvée 308.104674 ; ΔHRMS = 0.4 ppm

m/z calculée pour C₁₆H₁₈ClNaO₃ [M+Na]⁺ : 330.086742 ; trouvée : 330.086612 ; ΔHRMS = 0.4 ppm

❖ **Tert-butyl (4-chlorophenyl)(furan-2-ylmethyl)carbamate (12d) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2**, **méthode 1** avec : $n_1 = 7$, $n_2 = 8.4$, $V = 20$, $t = 2 j$

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 9/1)

Rendement isolé : 93 %

Aspect : huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.33 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.0\text{Hz}$, **a**), 7.28-7.26 (d, 2H, $J_{h-g} = 8.3\text{ Hz}$, **h**), 7.13-7.11 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.3\text{ Hz}$, **g**), 6.30 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.0\text{ Hz}$, **b**), 6.24 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.0\text{ Hz}$, **c**), 4.73 (s, 2H, **e**), 1.44 (s, 9H, **l**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 154.3 (**j**), 151.4(**d**), 142.0(**a**), 141.0 (**f**), 131.6 (**i**), 128.8 (**h**), 128.1 (**g**), 110.3 (**b**), 108.1 (**c**), 81.0 (**k**), 46.9 (**e**), 28.3 (**l**)

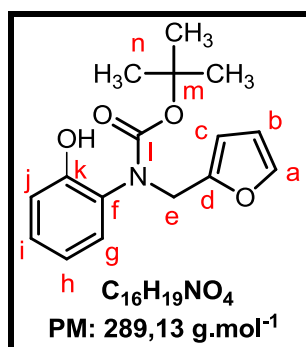
CPG : (Appareil A, méthode 1) $R_t = 17.76\text{min}$

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3412$ (ν_{N-H}), 3118 (ν_{C-H}), 1748 ($\nu_{C=O}$), 1600 ($\nu_{C=C}$), 1495 ($\nu_{C=C}$), 1460 (δ_{CH_2}), 813 (γ_{C-H}), 733 (γ_{C-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : 53 (19 %), 81 (100 %), 206 (53 %), 207 (24 %), 208 (19 %), 209 (8 %), 251 (40 %), 252 (7 %), 253 (13 %)

HRMS : m/z calculée pour $C_{16}H_{19}ClNO_3$ $[M+H]^+$: 308.104798 ; trouvée 308.104628 ; $\Delta\text{HRMS} = 0.6\text{ ppm}$

❖ **Tert-butyl (furan-2-ylmethyl)(2-hydroxyphenyl)carbamate(12e) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : $n_1 = 5.5$, $n_2 = 11$, $V = 30$, $t = 4$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 8/2 → 2/8)

Rendement isolé : 64 %

Aspect: huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.34 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.9$ Hz, **a**), 7.11-7.08 (massif, 2H, **g** et **i**), 6.79 (dd, 1H, $J_{j-i} = 8.5$ Hz, $J_{j-h} = 1.4$ Hz, **j**), 6.73 (td, 1H, $J_{h-i} = J_{h-g} = 8.9$ Hz, $J_{h-j} = 1.4$ Hz, **h**), 6.32 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 1.9$ Hz, **b**), 6.22 (d, 1H, $J_{c-b} = 1.9$ Hz, **c**), 4.35 (s, 2H, **e**), 1.55 (s, 9H, **l**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 152.6 (**l**), 151.7 (**k**), 142.1 (**a**), 139.5 (**d**), 138.5 (**f**), 126.7 (**i**), 121.9 (**g**), 117.4 (**h**), 112.3 (**j**), 110.5 (**b**), 107.2 (**c**), 83.8 (**m**), 41.1 (**e**), 27.8 (**n**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 17.73$ - 19.54 min (pic élargi)

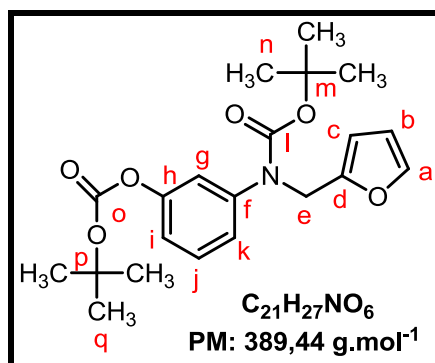
ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3429$ (ν_{O-H}), 2979 (ν_{C-H}), 1756 ($\nu_{C=O}$), 1698 ($\nu_{C=O}$), 1611 ($\nu_{C=C}$), 1512 ($\nu_{C=C}$), 1453 (δ_{CH_2}), 1369 (δ_{O-H}), 1326 (δ_{O-H}), 1140 (ν_{C-O}), 861 (γ_{C-H}), 737 (γ_{C-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : 53 (25 %), 80 (9 %), 81 (100 %), 108 (9 %), 109 (2 %), 188 (10 %), 189 (60 %), 190 (8 %), 289 (9 %), 290 (2 %)

HRMS : m/z calculée pour C₁₆H₂₀NO₄ [M+H]⁺ : 290.138685 ; trouvée : 290.138608 ; Δ HRMS = 0.3 ppm

m/z calculée pour C₁₆H₁₉NNaO₄ [M+Na]⁺ : 312.120629 ; trouvée : 312.120683 ; Δ HRMS = 0.2 ppm

❖ **Tert-butyl (3-((tert-butoxycarbonyl)oxy)phenyl)(furan-2-ylmethyl)carbamate (12f) :**



Préparation : le *N*-aryl, *N*-furanylméthylamine est préparé selon la procédure générale **P-1**, **méthode 3** avec : **n**₁ = 40, **n**₂ = 48, **V** = 80, **t**₁ = 5 h, **t**₂ = 2 j

Puis, le *N*-aryl, *N*-furanylméthylamine se dégradant au cours de la purification, le brut réactionnel est engagé tel quel dans l'étape de protection selon la procédure générale **P-2**, **méthode 1** avec : **n**₂ = 90, **V** = 150, **t** = 8 j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 9/1)

Rendement isolé : 22 % (sur 2 étapes)

Aspect: solide jaune, **Point de fusion :** 66-68 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.31 (dd, 1H, *J*_{a-b} = 1.9 Hz, *J*_{a-c} = 0.7 Hz, **a**), 7.22 (t, 1H, *J*_{j-k} = *J*_{j-i} = 8.3 Hz, **j**), 6.99 (massif, 2H, **g** et **k**), 6.96 (ddd, 1H, *J*_{i-j} = 8.3 Hz, *J*_{i-k} = 2.3 Hz, *J*_{i-g} = 1.1 Hz, **i**), 6.25 (dd, 1H, *J*_{b-c} = 3.2 Hz, *J*_{b-a} = 1.9 Hz, **b**), 6.15 (dd, 1H, *J*_{c-b} = 3.2 Hz, *J*_{c-a} = 0.7 Hz, **c**), 4.71 (s, 2H, **e**), 1.51 (s, 9H, **q**), 1.39 (s, 9H, **n**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 154.3 (**l**), 151.7 (**o** et **d**), 151.1 (**h**), 143.6 (**f**), 142.0 (**a**), 129.2 (**j**), 123.8 (**k**), 119.8 (**g**), 118.9 (**i**), 110.5 (**b**), 108.1 (**c**), 83.7 (**p**), 81.1 (**m**), 47.1 (**e**), 28.4 (**n**), 27.8 (**q**)

CLHP (90 % MeOH, 10 % H₂O) : **R_t** = 3.34 min

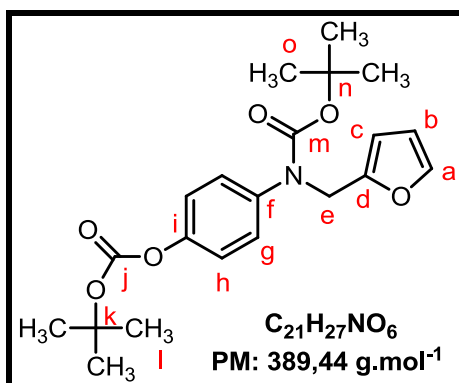
ATR-FTIR (neat) : ν = 2979 (ν_{CH}), 1757 (ν_{C=O}), 1701 (ν_{C=O}), 1605 (ν_{C=C}), 1489 (ν_{C=C}), 1453 (δ_{CH₂}), 1246 (ν_{C-O}), 1141 (ν_{C-O}), 856 (γ_{C-H}), 743 (γ_{C-H}) cm⁻¹

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 166 (8 %), 230 (17 %), 310 (89 %), 311 (13 %), 366 (87 %), 367 (15 %), 390 (C₂₁H₂₈NO₆⁺, 22 %), 435 (C₂₁H₂₇NNaO₆⁺, 100 %), 436 (C₂₁H₂₈NNa₂O₆³⁺, 22 %)

HRMS : *m/z* calculée pour C₂₁H₂₈NO₆ [M+H]⁺ : 390.191114 ; trouvée : 390.190968 ; ΔHRMS = 0.4 ppm

m/z calculée pour C₂₁H₂₇NNaO₆ [M+Na]⁺ : 412.173058 ; trouvée : 412.172832 ; ΔHRMS = 0.5 ppm

❖ **Tert-butyl (4-((tert-butoxycarbonyl)oxy)phenyl)(furan-2-ylmethyl)carbamate (12g) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : **n₁ = 6.6, n₂ = 13.2, V = 30, t = 7 j**

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 9/1)

Rendement isolé : 60 %

Aspect : poudre blanche

Point de fusion : 92-94 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.36 (d, 1H, *J_{a-b}* = 2.3 Hz, **a**), 7.15-7.08 (massif, 4H, **g** et **h**), 6.27 (t, 1H, *J_{b-a}* = *J_{b-c}* = 2.3 Hz, **b**), 6.15 (d, 1H, *J_{c-b}* = 2.3 Hz, **c**), 4.71 (s, 2H, **e**), 1.53 (s, 9H, **l**), 1.41 (s, 9H, **o**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 154.6 (**m**), 151.9 (**j**), 151.8 (**d**), 149.1 (**i**), 142.0 (**a**), 140.1 (**f**), 127.9 (**g**), 121.5 (**h**), 110.5 (**b**), 108.1 (**c**), 83.8 (**k**), 81.0 (**n**), 47.2 (**e**), 28.4 (**o**), 27.9 (**l**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) *Rt* = 17.00-22.30 min (pic élargi)

ATR-FTIR (neat) : *v* = 2978 (*v*_{CH}), 1762 (*v*_{C=O}), 1692 (*v*_{C=O}), 1599 (*v*_{C=C}), 1510 (*v*_{C=C}), 1460 (*δ*_{CH₂}), 1139 (*v*_{C-O}), 860 (*γ*_{C-H}), 744 (*γ*_{C-H}) cm⁻¹

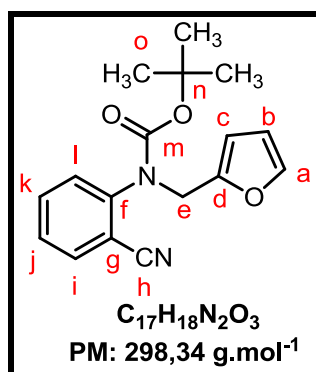
GC-MS (intensité relative) : 63 (10 %), 65 (13 %), 92 (18 %), 93 (11 %), 94 (6 %), 120 (6 %), 121 (56 %), 122 (5 %), 187 (100 %), 188 (12 %), 202 (42 %), 203 (7 %)

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 166 (14 %), 278 (13 %), 310 (32 %), 334 (11 %), 366 (100 %), 367 (18 %), 390 (C₂₁H₂₈NO₆⁺, 19 %), 412 (C₂₁H₂₇NNaO₆⁺, 14 %), 435 (C₂₁H₂₇NNa₂O₆²⁺, 78 %), 436 (C₂₁H₂₈NNa₂O₆³⁺, 22 %)

HRMS : *m/z* calculée pour C₂₁H₂₈NO₆ [M+H]⁺ : 390.191114 ; trouvée : 390.191134 ; ΔHRMS = 0.1 ppm

m/z calculée pour C₂₁H₃₁N₂O₆ [M+NH₄]⁺ : 407.217663 ; trouvée : 407.217516 ; ΔHRMS = 0.4 ppm

❖ **Tert-butyl (2-cyanophenyl)(furan-2-ylmethyl)carbamate (12j) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2**, **méthode 1** avec : $n_1 = 2$, $n_2 = 5$, $V = 30$, $t = 5$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 9/1)

Rendement isolé : 54 %

Aspect : huile visqueuse jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.63 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.0$ Hz, **a**), 7.54 (d, 1H, $J_{l-k} = 8.4$ Hz, **l**), 7.35-7.31 (massif, 2H, **i** et **k**), 6.28 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.0$ Hz, **b**), 6.19 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.0$ Hz, **c**), 4.80 (se, 2H, **e**), 1.39 (s, 9H, **o**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 153.3 (**m**), 150.3 (**d**), 144.5 (**f**), 142.3 (**k**), 133.4 (**a**), 133.1 (**l**), 128.8 (**i**), 127.4 (**j**), 116.6 (**h**), 113.4 (**g**), 110.4 (**b**), 109.1 (**c**), 81.8 (**n**), 46.0 (**e**), 28.1 (**o**)

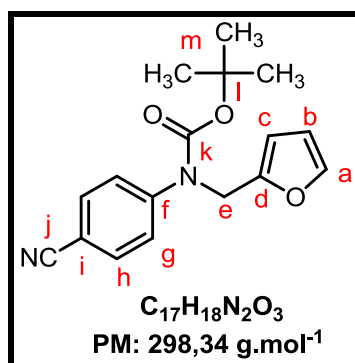
CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 17.98$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3389$ (ν_{CH}), 2256 ($\nu_{C\equiv N}$), 1669 ($\nu_{C=O}$), 1575 ($\nu_{C=C}$), 1491 ($\nu_{C=C}$), 1453 (δ_{CH_2}), 1368 (ν_{C-N}), 1299 (ν_{C-N}), 1278 (ν_{C-N}), 1150 (ν_{C-O}), 885 (γ_{C-H}), 761 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (27 %), 81 (89 %), 82 (6 %), 169 (47 %), 170 (14 %), 197 (43 %), 198 (68 %), 199 (9 %), 213 (100 %), 214 (14 %), 241 (5 %), 242 (69 %), 243 (11 %)

HRMS : m/z calculée pour $C_{17}H_{18}N_2NaO_3$ $[M+Na]^+$: 321.120963 ; trouvée : 321.120682 ; $\Delta HRMS = 0.9$ ppm

❖ **Tert-butyl (2-cyanophenyl)(furan-2-ylmethyl)carbamate (12k) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : $n_1 = 2$, $n_2 = 5$, $V = 20$, $t = 3$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 9/1)

Rendement isolé : 69 %

Aspect : solide ocre

Point de fusion : 83-86 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.59 (d, 2H, $J_{h-g} = 8.3$ Hz, **h**), 7.40 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.3$ Hz, **g**), 7.35 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.9$ Hz, **a**), 6.31 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 1.9$ Hz, **b**), 6.20 (d, 1H, $J_{c-b} = 1.9$ Hz, **c**), 4.79 (d, 2H, **e**), 1.45 (s, 9H, **m**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 153.6 (**k**), 151.0 (**d**), 146.7 (**f**), 142.1 (**a**), 132.6 (**h**), 126.3 (**g**), 118.7 (**j**), 110.5 (**b**), 108.8 (**i**), 108.3 (**c**), 81.9 (**l**), 46.6 (**e**), 28.2 (**m**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 19.09$ min

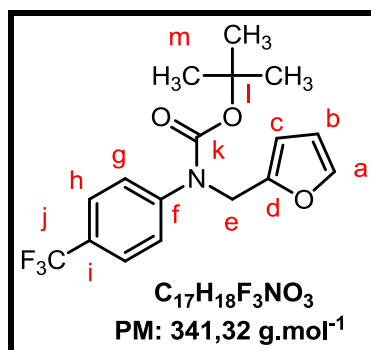
ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3103$ (ν_{CH}), 2243 ($\nu_{C\equiv N}$), 1658 ($\nu_{C=O}$), 1602 ($\nu_{C=C}$), 1503 ($\nu_{C=C}$), 1454 (δ_{CH_2}), 1362 ($\nu_{C\equiv N}$), 1294 (ν_{C-N}), 1282 (ν_{C-N}), 1151 (ν_{C-O}), 850 (γ_{C-H}), 726 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (20 %), 81 (100 %), 82 (6 %), 197 (15 %), 198 (13 %), 199 (2,98 %), 241 (5 %), 242 (39 %), 243 (9 %)

HRMS : m/z calculée pour $C_{17}H_{19}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 299.139019 ; trouvée : 299.138783 ; Δ HRMS = 0.8 ppm

m/z calculée pour $C_{17}H_{18}N_2NaO_3$ $[M+H]^+$: 321.120963 ; trouvée : 321.120835 ; Δ HRMS = 0.4 ppm

❖ **Tert-butyl (furan-2-ylmethyl)(4-(trifluoromethyl)phenyl)carbamate**
(12n) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : **n₁ = 15.3, n₂ = 38.2,**
V = 70, t = 8 j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP)

Rendement isolé : 46 %

Aspect : huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.56 (d, 2H, *J*_{g-h} = 8.5 Hz, **g**), 7.35 (massif, 3H, **a** et **h**), 6.31 (dd, 1H, *J*_{b-c} = 3.2 Hz, *J*_{b-a} = 1.9 Hz, **b**), 6.19 (dd, 1H, *J*_{c-b} = 3.2 Hz, *J*_{c-a} = 0.7 Hz, **c**), 4.78 (s, 2H, **e**), 1.45 (s, 9H, **m**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 154.2 (**k**), 151.5 (**d**), 145.9 (**f**), 142.2 (**a**), 128.4-127.4 (q, *J*_{i-F} = 32.2 Hz, **i**), 126.8-126.4 (q, *J*_{h-F} = 14.7 Hz, **h**), 125.9 (**g**), 122.9-107.5 (q, *J*_{j-F} = 485.0 Hz, **j**), 110.6 (**b**), 108.3 (**c**), 81.6 (**l**), 47.0 (**e**), 28.4 (**m**)

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -62.35

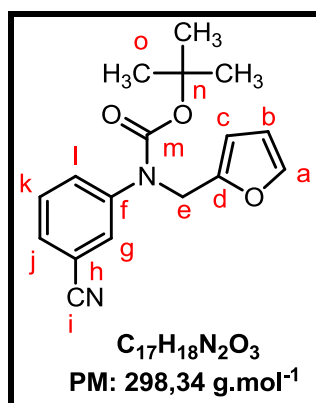
CPG : (Appareil B, méthode 2) *Rt* = 15.29 min

ATR-FTIR (neat) : ν = 2980 (ν_{CH}), 1703 (ν_{C=O}), 1615 (ν_{C=C}), 1521 (ν_{C=C}), 1369 (δ_{CH₂}), 1323 (ν_{C-O}), 1154 (ν_{C-O}), 1115 (ν_{C-O}), 1068 (ν_{CF₃}), 1015 (ν_{CF₃}), 844 (γ_{C-H}), 734 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (29 %), 81 (100 %), 82 (7 %), 240 (16 %), 241 (10 %), 266 (3 %), 284 (5 %), 285 (46 %), 286 (8 %)

HRMS : *m/z* calculée pour C₁₇H₁₈F₃NNaO₃ [M+Na]⁺ : 364.113099 ; trouvée : 364.112884 ;
ΔHRMS = 0.6 ppm

❖ **Tert-butyl (3-cyanophenyl)(furan-2-ylmethyl)carbamate (12o) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : $n_1 = 21$, $n_2 = 42$, $V = 80$, $t = 5$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 77 %

Aspect : huile orange

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.53 (s, 1H, **g**), 7.47-7.36 (massif, 3H, **j**, **k** et **l**), 7.33 (s, 1H, **a**), 6.28 (d, 1H, $J_{b-c} = 3.1$ Hz, **b**), 6.17 (d, 1H, $J_{c-b} = 3.1$ Hz, **c**), 4.74 (s, 2H, **e**), 1.43 (s, 9H, **o**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 153.9 (**m**), 151.0 (**d**), 143.4 (**f**), 142.2 (**a**), 131.2 (**j**), 130.1 (**l**), 129.7 (**k**), 129.5 (**g**), 118.4 (**i**), 112.7 (**h**), 110.5 (**b**), 108.4 (**c**), 81.7 (**n**), 46.7 (**e**), 28.2 (**o**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 18.52$ min

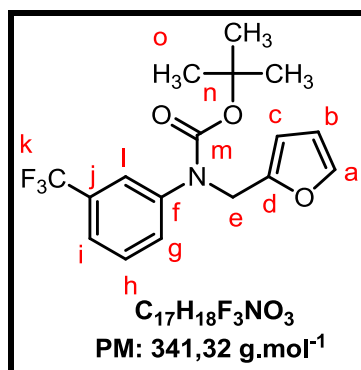
ATR-FTIR (neat) : $\nu = 2978$ (ν_{CH}), 2231 ($\nu_{C\equiv N}$), 1700 ($\nu_{C=O}$), 1581 ($\nu_{C=C}$), 1504 ($\nu_{C=C}$), 1484 ($\nu_{C=C}$), 1435 (δ_{CH_2}), 1367 (ν_{C-N}), 1302 (ν_{C-N}), 1272 (ν_{C-N}), 1157 (ν_{C-O}), 1148 (ν_{C-O}), 872 (γ_{C-H}), 768 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (28 %), 81 (100 %), 82 (6 %), 197 (11 %), 198 (7 %), 241 (5 %), 242 (31 %), 199 (9 %), 243 (5 %)

HRMS : m/z calculée pour $C_{17}H_{19}N_2O_3$ $[M+H]^+$: 299.139019 ; trouvée : 299.139224 ; $\Delta HRMS = 0.7$ ppm

m/z calculée pour $C_{17}H_{18}N_2NaO_3$ $[M+H]^+$: 321.120963 ; trouvée : 321.121122 ; $\Delta HRMS = 0.4$ ppm

❖ **Tert-butyl (furan-2-ylmethyl)(3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamate (12r) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : $n_1 = 13.1$, $n_2 = 28.8$,
 $V = 70$, $t = 7$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP)

Rendement isolé : 38 %

Aspect : huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.49 (s, 1H, **l**), 7.41 (massif, 3H, **g**, **h** et **i**), 7.35 (dd, 1H, $J_{a-b} = 1.5$ Hz, $J_{a-c} = 0.6$ Hz, **a**), 6.30 (dd, 1H, $J_{b-c} = 2.9$ Hz, $J_{b-a} = 1.5$ Hz, **b**), 6.19 (dd, 1H, $J_{c-b} = 2.9$ Hz, $J_{c-a} = 0.6$ Hz, **c**), 4.78 (s, 2H, **e**), 1.45 (s, 9H, **o**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 154.2 (**m**), 151.4 (**d**), 143.2 (**f**), 142.3 (**a**), 131.7-130.8 (q, $J_{j-F} = 32.5$ Hz, **j**), 130.0 (**g**), 129.3 (**h**), 128.1-119.9 (q, $J_{k-F} = 272.4$ Hz, **k**), 124.6 (**l**), 122.9 (q, $J_{i-F} = 3.7$ Hz, **i**), 110.6 (**b**), 108.4 (**c**), 81.5 (**n**), 47.0 (**e**), 28.4 (**o**)

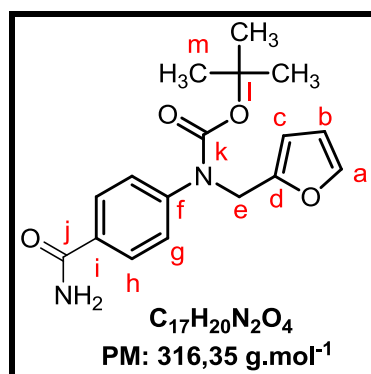
RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -60.69

CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 14.87$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 2979$ (ν_{C-H}), 1702 ($\nu_{C=O}$), 1595 ($\nu_{C=C}$), 1495 ($\nu_{C=C}$), 1453 (δ_{CH_2}), 1151 (ν_{C-O}), 1124 (ν_{C-O}), 1095 (ν_{C-O}), 1071 (ν_{CF_3}), 1043 (ν_{CF_3}), 1029 (ν_{CF_3}), 800 (γ_{C-H}), 737 (γ_{C-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : 81 (100 %), 82 (6 %), 172 (9 %), 240 (20 %), 241 (15 %), 284 (4 %), 285 (41 %), 286 (8 %)

❖ **Tert-butyl (4-carbamoylphenyl)(furan-2-ylmethyl)carbamate (12s) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : $n_1 = 20$, $n_2 = 40$, $V = 80$, $t = 6$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 7/3)

Rendement isolé : 34 %

Aspect : solide amorphe crème

Point de fusion : 138-141 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.75 (d, 2H, $J_{h-g} = 7.8$ Hz, **h**), 7.34 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.8$ Hz, **a**), 7.31 (d, 2H, $J_{g-h} = 7.8$ Hz, **g**), 6.30 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 1.8$ Hz, **b**), 6.18 (d, 1H, $J_{c-b} = 1.8$ Hz, **c**), 4.79 (s, 2H, **e**), 1.45 (s, 9H, **m**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 168.8 (**j**), 154.0 (**k**), 151.4 (**d**), 146.0 (**f**), 142.0 (**g**), 130.4 (**i**), 127.9 (**h**), 126.2 (**a**), 110.4 (**b**), 108.1 (**c**), 81.4 (**l**), 46.8 (**e**), 28.2 (**m**)

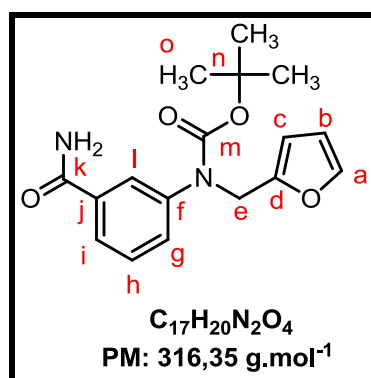
CPG : (Appareil A, méthode 1) $R_t = 25.75$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3407$ (ν_{CH}), 3358 (ν_{HN-H}), 3312 (ν_{HN-H}), 3219 (ν_{CH}), 1697 ($\nu_{C=O}$), 1513 ($\nu_{C=C}$), 1456 (δ_{CH_2}), 1153 (ν_{C-O}), 854 (γ_{C-H}), 749 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (21 %), 81 (83 %), 82 (5 %), 118 (10 %), 135 (18 %), 215 (53 %), 216 (39 %), 260 (100 %), 261 (14 %)

HRMS : m/z calculée pour $C_{17}H_{21}N_2O_4$ $[M+H]^+$: 317.149584 ; trouvée : 317.149526 ; $\Delta HRMS = 0.2$ ppm

❖ **Tert-butyl (3-carbamoylphenyl)(furan-2-ylmethyl)carbamate (12t) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2**, **méthode 1** avec : $n_1 = 11$, $n_2 = 22$, $V = 70$, $t = 6$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 35 %

Aspect: huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.36 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.8$ Hz, **a**), 7.23 (t, 1H, $J_{h-g} = J_{h-i} = 7.8$ Hz, **h**), 7.14 (t, 1H, $J_{l-i} = J_{l-g} = 2.2$ Hz, **l**), 7.03 (dd, 1H, $J_{i-h} = 7.8$ Hz, $J_{i-l} = 2.2$ Hz, **i**), 6.82 (dd, 1H, $J_{g-h} = 7.8$ Hz, $J_{g-l} = 2.2$ Hz, **g**), 6.31 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.3$ Hz, $J_{b-a} = 1.8$ Hz, **b**), 6.24 (d, 1H, $J_{c-b} = 3.3$ Hz, **c**), 4.35 (s, 2H, **e**), 1.53 (s, 9H, **o**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 165.6 (**k**), 152.1 (**m**), 149.8 (**d**), 148.3 (**f**), 142.3 (**a**), 134.6 (**j**), 129.7 (**h**), 117.4 (**g**), 116.1 (**i**), 112.4 (**l**), 110.6 (**b**), 107.6 (**c**), 82.9 (**n**), 51.1 (**e**), 28.2 (**o**)

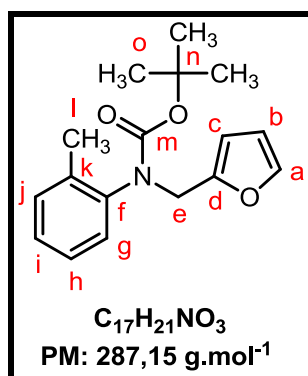
CPG : (Appareil B, méthode 2) $R_t = 20.50$ min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3294$ ($\nu_{\text{HN-H}}$), 2920 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1751 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1606 ($\delta_{\text{HN-H}}$), 1482 (δ_{CH_2}), 1253 ($\nu_{\text{C-O}}$), 1141 ($\nu_{\text{C-O}}$), 856 ($\gamma_{\text{C-H}}$), 739 ($\gamma_{\text{C-H}}$) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 51 (15 %), 53 (67 %), 81 (100 %), 82 (9 %), 115 (13 %), 188 (11 %), 198 (18 %), 215 (79 %), 216 (55 %), 217 (10 %), 242 (13 %), 243 (20 %)

HRMS : m/z calculée pour $C_{17}H_{21}N_2O_4$ $[M+H]^+$: 317.149584 ; trouvée : 317.150079 ; $\Delta\text{HRMS} = 1.6$ ppm

m/z calculée pour $C_{17}H_{20}N_2NaO_4$ $[M+Na]^+$: 339.131528 ; trouvée : 339.132031 ; $\Delta\text{HRMS} = 1.5$ ppm

❖ Tert-butyl (furan-2-ylmethyl)(*o*-tolyl)carbamate (12v) :

Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : $n_1 = 22$, $n_2 = 31$, $V = 80$, $t = 4$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP)

Rendement isolé : 93 %

Le produit est obtenu sous la forme de deux rotamères **A** et **B** dont les proportions respectives sont 67 % et 33 % (déterminées à l'aide de l'intégration des protons **e** par RMN ¹H).

Aspect : huile orange

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.32 (se, 1H, **a**, **A** et **B**), 7.21-7.05 (massif, 4H, **g**, **h**, **i** et **j**, **A**), 6.90 (massif, 4H, **g**, **h**, **i** et **j**, **B**), 6.28 (se, 1H, **b**, **B**), 6.25 (se, 1H, **b**, **A**), 6.11 (se, 1H, **c**, **A** et **B**), 4.78 (d, 1H, $J_{e_1-e_2} = 15.2$ Hz, **e**₁, **A**), 4.77 (d, 1H, $J_{e_1-e_2} = 15.1$ Hz, **e**₁, **B**), 4.60 (d, 1H, $J_{e_2-e_1} = 15.2$ Hz, **e**₂, **A**), 4.52 (d, 1H, $J_{e_2-e_1} = 15.2$ Hz, **e**₂, **B**), 2.09 (s, 3H, **l**, **B**), 2.04 (s, 3H, **l**, **A**), 1.54 (s, 9H, **o**, **B**), 1.54 (s, 9H, **o**, **A**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 154.8 (**k**, **A**), 154.1 (**k**, **B**), 151.9 (**d**, **B**), 151.4 (**d**, **A**), 142.0 (**a**, **A**), 141.9 (**a**, **B**), 141.0 (**f**, **B**), 140.6 (**f**, **A**), 136.6 (**k**, **B**), 136.3 (**k**, **A**), 130.9 (**j**, **B**), 130.4 (**j**, **A**), 128.3 (**i**, **B**), 128.1 (**i**, **A**), 127.5 (**h**, **B**), 127.3 (**h**, **A**), 126.8 (**g**, **B**), 126.4 (**g**, **A**), 110.4 (**b**, **A** et **B**), 108.7 (**c**, **A**), 108.2 (**c**, **B**), 80.6 (**n**, **B**), 80.0 (**n**, **A**), 47.1 (**e**, **B**), 45.8 (**e**, **A**), 28.5 (**o**, **B**), 28.3 (**o**, **A**), 17.5 (**l**, **B**), 17.3 (**l**, **A**)

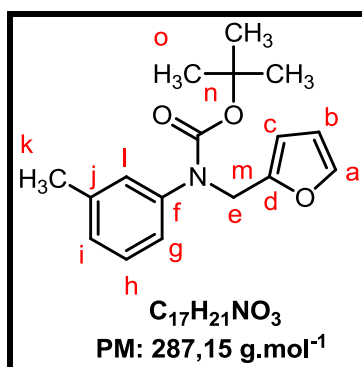
CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 15.82 min

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 2978$ (ν_{C-H}), 1686 ($\nu_{C=O}$), 1600 ($\nu_{C=C}$), 1492 ($\nu_{C=C}$), 1454 (δ_{CH_2}), 1143 (ν_{C-O}), 860 (γ_{C-H}), 742 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (31 %), 81 (100 %), 82 (6 %), 91 (6 %), 186 (39 %), 187 (19 %), 230 (21 %), 231 (49 %), 232 (7 %)

HRMS : m/z calculée pour C₁₇H₂₂NO₃ [M+H]⁺ : 288.159420 ; trouvée : 288.159522 ; Δ HRMS = 0.4 ppm

m/z calculée pour C₁₇H₂₁NNaO₃ [M+Na]⁺ : 310.141364 ; trouvée : 310.141320 ; Δ HRMS = 0.1 ppm

❖ **Tert-butyl (furan-2-ylmethyl)(*m*-tolyl)carbamate (12x) :**

Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : **n₁ = 25.5, n₂ = 51, V = 80, t = 3 j**

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP)

Rendement isolé : 74 %

Aspect: huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.35 (s, 1H, **a**), 7.18 (t, 1H, $J_{h-l} = J_{h-g} = 7.7$ Hz, **h**), 7.00 (massif, 3H, **g, i et l**), 6.30 (d, 1H, $J_{b-c} = 2.3$ Hz, **b**), 6.18 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.3$ Hz, **c**), 4.74 (s, 2H, **e**), 2.32 (s, 3H, **k**), 1.45 (s, 9H, **o**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 154.8 (**m**), 152.2 (**d**), 142.6 (**f**), 141.9 (**a**), 138.6 (**j**), 128.6 (**h**), 127.5 (**g**), 127.1 (**i**), 123.9 (**l**), 110.4 (**b**), 107.9 (**c**), 80.7 (**n**), 47.3 (**e**), 28.5 (**o**), 21.5 (**k**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 16.24 min

ATR-FTIR (neat) : ν = 2977 (ν_{CH}), 1756 (ν_{C=O}), 1607 (ν_{C=C}), 1491 (ν_{C=C}), 1453 (δ_{CH₂}), 1366 (δ_{CH₃}), 1161 (ν_{C-O}), 1148 (ν_{C-O}), 859 (γ_{C-H}), 701 (γ_{C-H}) cm⁻¹

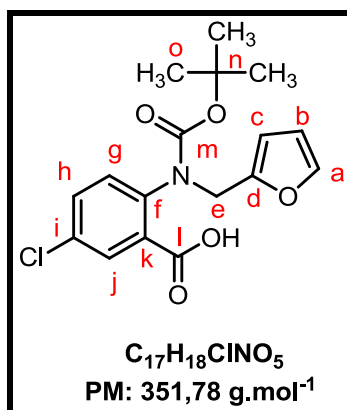
GC-MS (intensité relative) : 53 (35 %), 81 (100 %), 82 (6 %), 91 (10 %), 186 (73 %), 187 (33 %), 230 (14 %), 231 (61 %), 232 (8 %)

HRMS : *m/z* calculée pour C₁₇H₂₂NO₃ [M+H]⁺ : 288.159420 ; trouvée : 288.159905 ; ΔHRMS = 1.7 ppm

m/z calculée pour C₁₇H₂₅N₂O₃ [M+NH₄]⁺ : 305.185969 ; trouvée : 305.186474 ; ΔHRMS = 1.7 ppm

m/z calculée pour C₁₇H₂₁NNaO₃ [M+Na]⁺ : 310.141364 ; trouvée : 310.141886 ; ΔHRMS = 1.7 ppm

❖ **2-((Tert-butoxycarbonyl)(furan-2-ylmethyl)amino)-5-chlorobenzoic acid (12ab) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : $n_1 = 5.4$, $n_2 = 8.1$, $V = 10$, $t = 4$ j

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 7/3)

Rendement isolé : 55 %

Aspect: huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.82 (d, 1H, $J_{j-h} = 2.6$ Hz, **j**), d, 7.34 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.7$ Hz, **a**), 7.26 (dd, 1H, $J_{h-g} = 8.7$ Hz, $J_{h-j} = 2.6$ Hz, **h**), 6.69 (d, 1H, $J_{g-h} = 8.7$ Hz, **g**), 6.32 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.1$ Hz, $J_{b-a} = 1.7$ Hz, **b**), 6.23 (d, 1H, $J_{c-b} = 3.1$ Hz, **c**), 4.39 (s, 2H, **e**), 1.58 (s, 9H, **o**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 166.0 (**l**), 150.9 (**m**), 148.0 (**d**), 141.0 (**a**), 140.9 (**f**), 132.8 (**h**), 130.0 (**j**), 118.6 (**i**), 112.1 (**k**), 111.8 (**g**), 109.3 (**b**), 106.0 (**c**), 80.4 (**n**), 39.4 (**e**), 27.1 (**o**)

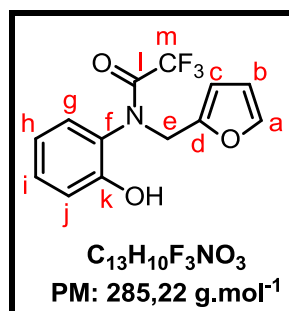
CPG : (Appareil A, méthode 1) $R_t = 21.35$ min

GC-MS (intensité relative) : 81 (100 %), 96 (28 %), 166 (16 %), 177 (16 %), 204 (12 %), 205 (27 %), 206 (18 %), 223 (22 %), 232 (17 %), 233 (37 %), 234 (27 %), 235 (17 %), 250 (69 %), 251 (98 %), 252 (34 %), 253 (33 %), 307 (54 %), 308 (11 %), 309 (20 %)

HRMS : m/z calculée pour C₁₂H₁₁ClNO₃ [M+H]⁺ : 252.042197 ; trouvée : 252.042396 ; Δ HRMS = 0.8 ppm

m/z calculée pour C₁₆H₁₉ClNO₃ [M+H]⁺ : 308.104798 ; trouvée : 308.104849 ; Δ HRMS = 0.2 ppm

❖ **2,2,2-trifluoro-N-(furan-2-ylmethyl)-N-(2-hydroxyphenyl)acetamide (13e) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 2** avec : **n** = 16.8, 3 équivalents de triéthylamine et d'anhydride trifluoroacétique, **V** = 50, **t** = 16 h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 72 %

Aspect : huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.33 (s, 1H, **a**), 7.24 (m, 1H, **i**), 6.93 (d, 1H, $J_{j-i} = 8.3$ Hz, **j**), 6.84 (massif, 2H, **h** et **g**), 6.26 (d, 1H, $J_{b-c} = 1.8$ Hz, **b**), 6.17 (d, 1H, $J_{c-b} = 1.8$ Hz, **c**), 5.83 (se, 1H, **OH**), 5.12 (d, 1H, $J_{e-e'} = 15.0$ Hz, **e**), 4.59 (d, 1H, $J_{e'-e} = 15.0$ Hz, **e'**)^a

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 158.8-157.7 (q, $J_{l-F} = 36.0$ Hz, **l**), 152.6 (**k**), 148.5 (**d**), 143.1 (**a**), 131.3 (**i**), 130.4 (**h**), 125.2 (**f**), 120.7 (**g**), 120.6-111.8 (q, $J_{m-F} = 288.3$ Hz, **m**), 110.9 (**b**), 110.7 (**c**), 46.7 (**e**)

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -69.16

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 14.86 min

ATR-FTIR (neat) : ν = 3339 (ν_{O-H}), 1672 (ν_{C=O}), 1600 (ν_{C=C}), 1588 (ν_{C=C}), 1512 (ν_{C=C}), 1459 (δ_{CH₂}), 1353 (ν_{CF₃}), 1296 (ν_{CF₃}), 1147 (ν_{C-O}), 1076 (ν_{CF₃}), 741 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 51 (10 %), 52 (3 %), 53 (52 %), 81 (100 %), 82 (6 %), 258 (13 %), 286 (2 %)

HRMS : *m/z* calculée pour C₁₃H₁₁F₃NO₃ [M+H]⁺ : 286.068554 ; trouvée : 286.068786 ; ΔHRMS = 0.8 ppm

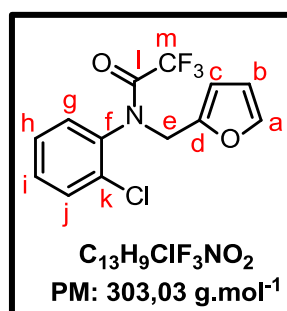
m/z calculée pour C₁₃H₁₀F₃NNaO₃ [M+Na]⁺ : 308.050499 ; trouvée : 308.050836 ;

ΔHRMS = 1.1 ppm

a : Les protons **e** et **e'** sont diastéréotopes du fait de la présence d'un *pseudo* axe d'asymétrie. En effet, la libre rotation autour de la liaison entre le carbone sp² **f** et l'azote est fortement gênée mais non impossible, c'est la raison pour laquelle nous parlons de *pseudo* axe d'asymétrie. Cette caractéristique est rencontrée chez tous les *N*-aryl, *N*-furanylméthylamines *ortho*-substituées et dont la fonction amine est protégée par le groupement COCF₃.

❖ ***N*-(2-chlorophenyl)-2,2,2-trifluoro-*N*-(furan-2-ylmethyl)acetamide**

(13h) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : **n = 5.9, V = 20, t = 16 h**

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP)

Rendement isolé : 92 %

Aspect: huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.49 (dd, 1H, $J_{j-i} = 7.8$ Hz, $J_{j-h} = 1.5$ Hz, **j**) 7.33 (td, 1H, $J_{h-i} = J_{h-g} = 7.6$ Hz, $J_{h-j} = 1.5$ Hz, **h**), 7.32 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.9$ Hz, **a**), 7.21 (td, 1H, $J_{i-j} = J_{i-h} = 7.6$ Hz, $J_{i-g} = 1.4$ Hz, **h**), 6.95 (dd, 1H, $J_{g-h} = 7.6$ Hz, $J_{g-i} = 1.4$ Hz, **g**) 6.26 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.2$ Hz, $J_{b-a} = 1.9$ Hz, **b**), 6.18 (d, 1H, $J_{c-b} = 3.2$ Hz, **c**), 5.50 (d, 1H, $J_{e-e'} = 15.1$ Hz, **e**), 4.29 (d, 1H, $J_{e'-e} = 15.1$ Hz, **e'**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 157.1-156.4 (q, $J_{l-F} = 32.2$ Hz, **l**), 148.2 (**d**), 143.1 (**a**), 135.6 (**f**), 133.5 (**k**), 131.5 (**g**), 130.9 (**h**), 130.4 (**j**), 127.5 (**i**), 120.5-111.9 (q, $J_{m-F} = 291.1$ Hz, **m**), 110.9 (**c**), 110.8 (**b**), 45.9 (**e**)

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -69.10

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 14.06 min

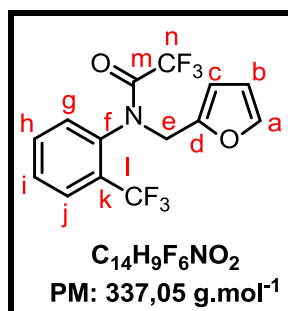
ATR-FTIR (neat) : 1700 ($\nu_{C=O}$), 1588 ($\nu_{C=C}$), 1482 ($\nu_{C=C}$), 1441 (δ_{CH_2}), 1354 (ν_{CF_3}), 1304 (ν_{CF_3}), 1202 (ν_{C-O}), 1149 (ν_{C-O}), 1096 (ν_{CF_3}), 1079 (ν_{CF_3}), 818 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 81 (100 %), 82 (7 %), 268 (13 %), 303 (16 %), 304 (2 %), 305 (6 %)

HRMS : m/z calculée pour C₁₃H₁₀ClF₃NO₂ [M+H]⁺ : 304.034667 ; trouvée : 304.034355 ; ΔHRMS = 1.0 ppm

m/z calculée pour C₁₃H₉ClF₃NNaO₂ [M+Na]⁺ : 326.016612 ; trouvée : 326.016605 ; ΔHRMS = 0.0 ppm

❖ **2,2,2-trifluoro-N-(furan-2-ylmethyl)-N-(2-(trifluoromethyl)phenyl)acetamide (13i) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 1** avec : **n = 19.9, V = 40, t = 16 h**

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluant : EP)

Rendement isolé : 51 %

Aspect : huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.77 (dd, 1H, $J_{j-i} = 7.7$ Hz, $J_{j-h} = 1.7$ Hz, **j**) 7.56-7.47 (massif, 2H, **h** et **i**), 7.35 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.8$ Hz, **a**), 6.95 (d, 1H, $J_{g-h} = 7.5$ Hz, **g**), 6.29 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.2$ Hz, $J_{b-a} = 1.8$ Hz, **b**), 6.23 (d, 1H, $J_{c-b} = 3.2$ Hz, **c**), 5.63 (d, 1H, $J_{e-e'} = 15.2$ Hz, **e**), 4.16 (d, 1H, $J_{e'-e} = 15.2$ Hz, **e'**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 157.6-156.4 (q, $J_{m-F} = 37.2$ Hz, **m**), 148.3 (**d**), 143.1 (**a**), 136.0 (**f**), 132.9 (**i**), 131.9 (**g**), 130.1 (**h**), 128.9-127.8 (q, $J_{k-F} = 37.8$ Hz, **k**), 127.8 (q, $J_{j-F} = 5.0$ Hz, **j**), 127.4-119.3 (q, $J_{l-F} = 270.4$ Hz, **l**), 120.5-119.9 (q, $J_{n-F} = 281.1$ Hz, **n**), 111.2 (**c**), 110.9 (**b**), 47.6 (**e**)

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -60.52 (**l**), -68.15 (**n**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 12.25 min

ATR-FTIR (neat) : 1703 ($\nu_{C=O}$), 1587 ($\nu_{C=C}$), 1499 ($\nu_{C=C}$), 1457 (δ_{CH_2}), 1314 (ν_{CF_3}), 1203 (ν_{C-O}), 1166 (ν_{C-O}), 1148 (ν_{C-O}), 1112 (ν_{CF_3}), 1077 (ν_{CF_3}), 820 (γ_{C-H}) cm⁻¹

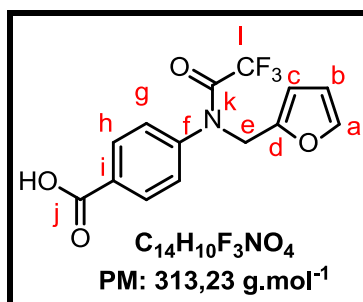
GC-MS (intensité relative) : 81 (100 %), 82 (7 %), 145 (13 %), 337 (19 %), 338 (2 %)

HRMS : m/z calculée pour C₁₄H₁₀F₆NO₂ [M+H]⁺ : 338.061024 ; trouvée : 338.060824 ; ΔHRMS = 0.6 ppm

m/z calculée pour C₁₄H₁₃F₆N₂O₂ [M+NH₄]⁺ : 355.087573 ; trouvée : 355.088075 ; ΔHRMS = 14 ppm

m/z calculée pour C₁₄H₉F₆NNaO₂ [M+Na]⁺ : 360.042969 ; trouvée : 360.042890 ; ΔHRMS = 0.2 ppm

❖ 4-(2,2,2-trifluoro-N-(furan-2-ylmethyl)acetamido)benzoic acid (13m) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 2** avec : **n** = 9.8, **V** = 50, **t** = 24 h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 72 %

Aspect: solide jaune

Point de fusion : 129-131 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 10.12 (se, 1H, **OH**), 8.12 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.5$ Hz, **g**), 7.37 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.9$ Hz, **a**), 7.20 (d, 1H, $J_{h-g} = 8.5$ Hz, **h**), 6.30 (dd, 1H, $J_{b-c} = 2.9$ Hz, $J_{b-a} = 1.9$ Hz, **b**), 6.22 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.9$ Hz, **c**), 4.93 (s, 2H, **e**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 171.2 (**j**), 157.2-156.1 (q, $J_{k-F} = 36.2$ Hz, **k**), 148.1 (**d**), 143.5 (**f**), 143.3 (**a**), 131.5 (**g**), 130.2 (**i**), 128.9 (**h**), 120.7-112.1 (q, $J_{l-F} = 288.0$ Hz, **l**), 111.0 (**c**), 110.9 (**b**), 47.8 (**e**)

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -67.20

CPG : (Appareil C, méthode 4) Rt = 10.56 min

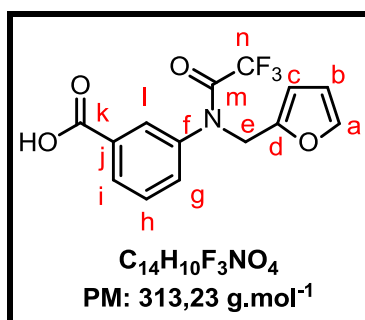
ATR-FTIR (neat) : 2960 (ν_{O-H}), 1683 ($\nu_{C=O}$), 1606 ($\nu_{C=O}$), 1507 ($\nu_{C=C}$), 1429 (δ_{CH_2}), 1316 (ν_{CF_3}), 1287 (ν_{CF_3}), 1200 (ν_{C-O}), 1103 (ν_{CF_3}), 1078 (ν_{CF_3}), 948 (γ_{C-H}), 747 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (30 %), 54 (2 %), 81 (100 %), 82 (6 %), 312 (10 %), 313 (2 %)

HRMS : m/z calculée pour $C_{14}H_{11}F_3NO_4$ [M+H]⁺ : 314.063469 ; trouvée : 314.063811 ; Δ HRMS = 1.1 ppm

m/z calculée pour $C_{14}H_{10}F_3NNaO_4$ [M+Na]⁺ : 336.045413 ; trouvée : 336.045693 ; Δ HRMS = 0.8 ppm

❖ 3-(2,2,2-trifluoro-N-(furan-2-ylmethyl)acetamido)benzoic acid (13p) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 2** avec : **n** = 13.3, **V** = 60, **t** = 24 h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 62 %

Aspect: huile verdâtre

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 8.06 (d, 1H, $J_{i-h} = 8.2$ Hz, **i**), 7.78 (s, 1H, **l**), 7.44 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.1$ Hz, **a**), 7.41 (t, 1H, $J_{h-i} = J_{h-g} = 8.2$ Hz, **h**), 7.21 (d, 1H, $J_{g-h} = 8.2$ Hz, **g**), 6.24 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.2$ Hz, $J_{b-a} = 1.1$ Hz, **b**), 6.17 (d, 1H, $J_{c-b} = 3.2$ Hz, **c**), 4.88 (s, 2H, **e**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 165.0 (**k**), 157.2-156.1 (q, $J_{m-F} = 36.1$ Hz, **m**), 149.2 (**d**), 143.7 (**a**), 143.1 (**h**), 138.8 (**f**), 133.3 (**g**), 131.4 (**j**), 130.6 (**i**), 128.8 (**l**), 120.6-112.1 (q, $J_{n-F} = 288.5$ Hz, **n**), 110.8 (**c**), 110.7 (**b**), 47.7 (**e**)

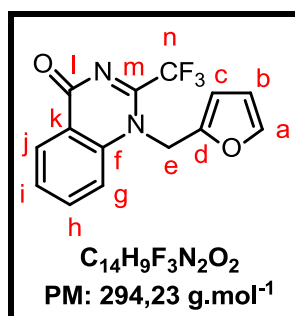
RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -67.15

CPG : (Appareil C, méthode 4) Rt = 8.94 min

ATR-FTIR (neat) : 3339 (ν_{O-H}), 1672 ($\nu_{C=O}$), 1588 ($\nu_{C=C}$), 1488 ($\nu_{C=C}$), 1446 (δ_{CH_2}), 1269 (ν_{CF_3}), 1201 (ν_{C-O}), 1149 (ν_{C-O}), 1107 (ν_{CF_3}), 1079 (ν_{CF_3}), 917 (γ_{C-H}), 754 (γ_{C-H}) cm⁻¹

GC-MS (intensité relative) : 53 (15 %), 81 (42 %), 82 (2 %), 312 (100 %), 313 (15 %)

❖ 2-(2,2,2-trifluoro-*N*-(furan-2-ylmethyl)acetamido)benzamide (13y) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 2** avec : **n** = 28.8, **V** = 50, **t** = 16 h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 45 %

Aspect: huile verdâtre

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 8.35 (se, 2H, **NH₂**), 7.73 (dd, 1H, $J_{j-i} = 7.6$ Hz, $J_{j-h} = 1.7$ Hz, **j**), 7.60 (td, 1H, $J_{h-i} = J_{h-g} = 7.6$ Hz, $J_{h-j} = 1.7$ Hz, **h**), 7.53 (t, 1H, $J_{i-h} = J_{i-j} = 7.6$ Hz, $J_{j-h} = 1.4$ Hz, **i**), 7.32 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.8$ Hz, **a**), 7.08 (d, 1H, $J_{g-h} = 7.6$ Hz, **g**), 6.26 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.2$ Hz, $J_{b-a} = 1.8$ Hz, **b**), 6.21 (d, 1H, $J_{c-b} = 3.2$ Hz, **c**), 5.34 (d, 1H, $J_{e-e'} = 15.1$ Hz, **e**), 4.59 (d, 1H, $J_{e'-e} = 15.1$ Hz, **e'**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 173.4 (**l**), 157.2-156.1 (q, $J_{m-F} = 36.7$ Hz, **m**), 147.3 (**d**), 143.5 (**a**), 140.4 (**f**), 133.9 (**h**), 133.8 (**j**), 131.0 (**g**), 130.3 (**i**), 121.1-112.5 (q, $J_{n-F} = 289.5$ Hz, **n**), 115.2 (**k**), 111.6 (**b**), 110.9 (**c**), 47.2 (**e**)

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -68.98

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 15.25 min

ATR-FTIR (neat) : ν = 3124 ($\nu_{C=C}$), 1700 ($\nu_{C=O}$), 1597 ($\nu_{C=C}$), 1491 ($\nu_{C=C}$), 1454 (δ_{CH_2}), 1340 (ν_{CF_3}), 1108 (ν_{CF_3}), 1076 (ν_{CF_3}), 821 (γ_{C-H}) cm⁻¹

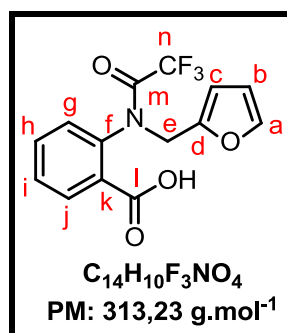
GC-MS (intensité relative) : 53 (49 %), 81 (100 %), 82 (7 %), 197 (8 %), 265 (39 %), 266 (6 %), 294 (29 %), 295 (5 %)

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 295 (88 %), 296 (13 %), 317 (C₁₄H₉F₃N₂NaO₂⁺, 86 %), 318 (13 %), 349 (C₁₄H₉F₃N₂NaO₂⁺.MeOH, 100 %), 350 (C₁₄H₁₀F₃N₂NaO₂²⁺.MeOH, 14 %)

HRMS : *m/z* calculée pour C₁₄H₁₀F₃N₂O₂ [M+H]⁺: 295.068889; trouvée : 295.068820 ; ΔHRMS = 0.2 ppm

m/z calculée pour C₁₄H₉F₃N₂NaO₂ [M+Na]⁺ : 312.095438; trouvée : 312.095549 ; ΔHRMS = 0.3 ppm

❖ 2-(2,2,2-trifluoro-*N*-(furan-2-ylmethyl)acetamido)benzoic acid (**13z**) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 2** avec : **n** = 6.3, **V** = 40, **t** = 24 h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 44 %

Aspect: huile orange

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 10.09 (se, 1H, **OH**), 8.17 (dd, 1H, $J_{j-i} = 7.4$ Hz, $J_{j-h} = 1.5$ Hz, **j**), 7.52 (massif, 2H, **i** et **h**), 7.32 (d, 1H, $J_{a-b} = 0.9$ Hz, **a**), 7.02 (d, 1H, $J_{g-h} = 8.4$ Hz, **g**), 6.25 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.0$ Hz, $J_{b-a} = 0.9$ Hz, **b**), 6.17 (d, 1H, $J_{c-b} = 3.0$ Hz, **c**), 5.42 (d, 1H, $J_{e-e'} = 15.2$ Hz, **e**), 4.41 (d, 1H, $J_{e'-e} = 15.2$ Hz, **e'**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 169.9 (**l**), 157.2-156.1 (q, $J_{m-F} = 36.0$ Hz, **m**), 148.5 (**d**), 143.0 (**a**), 138.8 (**f**), 134.0 (**i**), 132.7 (**j**), 131.6 (**g**), 129.9 (**h**), 127.9 (**k**), 120.7-112.1 (q, $J_{n-F} = 288.6$ Hz, **n**), 111.1 (**c**), 110.8 (**b**), 47.6 (**e**)

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -68.35

CPG : (Appareil C, méthode 4) Rt = 9.72 min

ATR-FTIR (neat) : ν = 3422 (ν_{O-H}), 1659 (ν_{C=O}), 1597 (ν_{C=C}), 1479 (ν_{C=C}), 1461 (δ_{CH₂}), 1288 (ν_{CF₃}), 1176 (ν_{C-O}), 1126 (ν_{C-O}), 1071 (ν_{CF₃}), 1013 (ν_{CF₃}), 930 (γ_{C-H}), 773 (γ_{C-H}) cm⁻¹

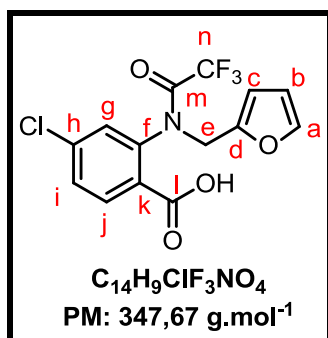
GC-MS (intensité relative) : 51 (9 %), 53 (47 %), 81 (100 %), 115 (9 %), 189 (12 %), 216 (80 %), 217 (53 %), 218 (9 %), 250 (M-[COOH+CF₃], 34 %), 251 (9 %), 252 (7 %)

HRMS : *m/z* calculée pour C₁₄H₁₁F₃NO₄ [M+H]⁺ : 314.063469 ; trouvée : 314.063754 ; ΔHRMS = 0.9 ppm

m/z calculée pour C₁₄H₁₄F₃N₂O₄ [M+NH₄]⁺ : 331.090018 ; trouvée : 331.090159 ; ΔHRMS = 0.4 ppm

m/z calculée pour C₁₄H₁₀F₃NNaO₄ [M+Na]⁺ : 336.045413 ; trouvée : 336.045657 ; ΔHRMS = 0.7 ppm

❖ **4-chloro-2-(2,2,2-trifluoro-*N*-(furan-2-ylmethyl)acetamido)benzoic acid (13aa) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 2** avec : **n** = 5.2, **V** = 40, **t** = 24 h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 48 %

Aspect : poudre marron orangé, **Point de fusion :** 119-121 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 10.59 (se, 1H, **OH**), 8.09 (d, 1H, $J_{j-i} = 8.4$ Hz, **j**), 7.47 (dd, 1H, $J_{i-j} = 8.4$ Hz, $J_{i-g} = 2.1$ Hz, **i**), 7.31 (d, 1H, $J_{a-b} = 1.3$ Hz, **a**), 7.03 (d, 1H, $J_{g-i} = 2.1$ Hz, **g**), 6.25 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.2$ Hz, $J_{b-a} = 1.3$ Hz, **b**), 6.20 (d, 1H, $J_{c-b} = 3.2$ Hz, **c**), 5.36 (d, 1H, $J_{e-e'} = 15.2$ Hz, **e**), 4.41 (d, 1H, $J_{e'-e} = 15.2$ Hz, **e'**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 168.1 (**l**), 156.8-155.7 (q, $J_{m-F} = 36.3$ Hz, **m**), 148.0 (**d**), 143.2 (**a**), 139.9 (**f**), 139.8 (**h**), 133.6 (**j**), 131.8 (**g**), 130.1 (**i**), 126.3 (**k**), 120.6-112.2 (q, $J_{n-F} = 288.4$ Hz, **n**), 111.3 (**c**), 110.8 (**b**), 47.5 (**e**)

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -68.46

CPG : (Appareil C, méthode 4) Rt = 14.86 min

ATR-FTIR (neat) : ν = 2873 (ν_{O-H}), 1684 (ν_{C=O}), 1591 (ν_{C=C}), 1431 (ν_{O-H}), 1348 (ν_{CF₃}), 1299 (ν_{CF₃}), 1261 (ν_{C-O}), 1088 (ν_{CF₃}), 1074 (ν_{CF₃}), 855 (γ_{C-H}), 758 (γ_{C-H}), 741 (γ_{C-H}) cm⁻¹

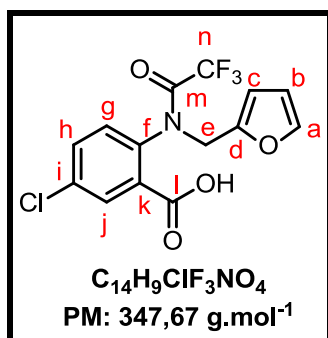
GC-MS (intensité relative) : 53 (14 %), 81 (31 %), 204 (14 %), 205 (3 %), 206 (4 %), 232 (100 %), 233 (16 %), 234 (30 %), 250 (12 %), 251 (3 %), 252 (3 %), 346 (72 %), 347 (10 %), 348 (25 %), 349 (5 %)

HRMS : m/z calculée pour C₁₄H₁₀ClF₃NO₄ [M+H]⁺ : 348.024497 ; trouvée : 348.024123 ; ΔHRMS = 1.1 ppm

m/z calculée pour C₁₄H₁₃ClF₃N₂O₄ [M+NH₄]⁺ : 365.051046 ; trouvée : 365.051039 ; ΔHRMS = 0.0 ppm

m/z calculée pour C₁₄H₉ClF₃NNaO₄ [M+Na]⁺ : 370.006441 ; trouvée : 370.006648 ; ΔHRMS = 0.6 ppm

❖ **5-chloro-2-(2,2,2-trifluoro-*N*-(furan-2-ylmethyl)acetamido)benzoic acid (13ab) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-2, méthode 2** avec : **n** = 6.8, **V** = 40, **t** = 24 h

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 68 %

Aspect: poudre marron clair, **Point de fusion :** 123-125 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 8.12 (d, 1H, $J_{g-h} = 8.5$ Hz, **g**), 7.51 (dd, 1H, $J_{h-g} = 8.5$ Hz, $J_{h-j} = 1.5$ Hz, **h**), 7.35 (d, 1H, $J_{a-b} = 2.3$ Hz, **a**), 7.05 (d, 1H, $J_{j-h} = 1.5$ Hz, **j**), 6.29 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 2.3$ Hz, **b**), 6.22 (d, 1H, $J_{c-b} = 2.3$ Hz, **c**), 5.37 (d, 1H, $J_{e-e'} = 15.2$ Hz, **e**), 4.42 (d, 1H, $J_{e'-e} = 15.2$ Hz, **e'**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 168.8 (**l**), 156.8-155.9 (q, $J_{m-F} = 36.4$ Hz, **m**), 148.0 (**d**), 143.3 (**a**), 140.2 (**f**), 140.1 (**k**), 133.7 (**g**), 132.0 (**j**), 130.3 (**h**), 126.1 (**i**), 121.4-113.3 (q, $J_{m-F} = 289.8$ Hz, **n**), 111.4 (**c**), 110.9 (**b**), 47.6 (**e**)

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = -68.39

CPG : (Appareil C, méthode 4) Rt = 11.06 min

ATR-FTIR (neat) : ν = 2874 (ν_{O-H}), 1684 (ν_{C=O}), 1591 (ν_{C=C}), 1489 (ν_{C=C}), 1431 (ν_{O-H}), 1348 (ν_{CF₃}), 1299 (ν_{CF₃}), 1260 (ν_{C-O}), 1150 (ν_{C-O}), 1088 (ν_{CF₃}), 1074 (ν_{CF₃}), 817 (γ_{C-H}) cm⁻¹

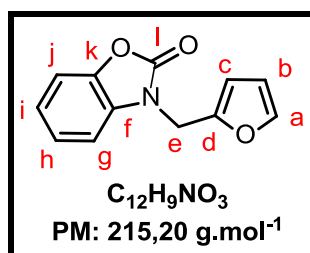
GC-MS (intensité relative) : 53 (12 %), 81 (21 %), 204 (14 %), 205 (3 %), 206 (4 %), 232 (100 %), 233 (12 %), 234 (29 %), 235 (4 %), 250 (20 %), 251 (4 %), 252 (7 %), 346 (70 %), 347 (15 %), 348 (27 %), 349 (5 %)

HRMS : m/z calculée pour C₁₄H₁₀ClF₃NO₄ [M+H]⁺ : 348.024497 ; trouvée : 348.024721 ; ΔHRMS = 0.6 ppm

m/z calculée pour C₁₄H₁₃ClF₃N₂O₄ [M+NH₄]⁺ : 365.051046 ; trouvée : 365.051328 ; ΔHRMS = 0.8 ppm

m/z calculée pour C₁₄H₉ClF₃NNaO₄ [M+Na]⁺ : 370.006441 ; trouvée : 370.006681 ; ΔHRMS = 0.7 ppm

❖ 3-(furan-2-ylmethyl)benzo[d]oxazol-2(3H)-one(14) :



Préparation : Dans un ballon placé à 0 °C sont introduits 6.6 mmol de 2-((Furan-2-ylmethyl)amino)phenol dans 50 mL de dichlorométhane distillé et 13.2 mmol de chloroformate trichlorométhyle (TCF) ajoutées goutte à goutte. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante. Après une nuit, de l'eau est ajoutée au mélange réactionnel afin d'éliminer l'excès de TCF, puis extrait deux fois avec du dichlorométhane. La phase organique est ensuite lavée successivement avec de l'eau, une solution de NaHCO₃ saturée et une solution de NaCl saturée puis séchée par Na₂SO₄ avant d'être filtrée sur fritté. Enfin, le dichlorométhane est évaporé et le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice.

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 7/3)

Rendement isolé : 69 %

Aspect: solide marron clair

Point de fusion : 68-70 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.37 (dd, 1H, $J_{a-c} = 1.8$ Hz, $J_{a-b} = 1.2$ Hz, **a**), 7.20-7.06 (massif, 4H, **g, h, i** et **j**), 6.41 (dd, 1H, $J_{b-c} = 3.3$ Hz, $J_{b-a} = 1.2$ Hz, **b**), 6.34 (dd, 1H, $J_{c-b} = 3.3$ Hz, $J_{c-a} = 1.8$ Hz **c**), 4.98 (s, 2H, **e**)

RMN ¹³C (100 MHz CDCl₃) : δ (ppm) = 154.5 (**l**), 148.2 (**d**), 143.2 (**a**), 142.7 (**f**), 130.8 (**k**), 124.1 (**h**), 122.9 (**i**), 110.9 (**c**), 110.2 (**g**), 109.7 (**b**), 109.2 (**j**), 39.1 (**e**)

CPG : (Appareil B, méthode 2) Rt = 16.32 min

ATR-FTIR (neat) : ν = 1753 (ν_{C=O}), 1483 (ν_{C=C}), 1433 (δ_{CH₂}), 1279 (ν_{C-O}), 1148 (ν_{C-O}), 748 (γ_{C-H}), 734 (γ_{C-H}), 687 (γ_{C-H}) cm⁻¹

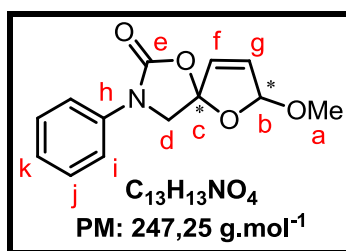
GC-MS (intensité relative) : 51 (16 %), 53 (53 %), 81 (100 %), 82 (7 %), 215 (26 %), 216 (4 %)

HRMS : m/z calculée pour C₁₂H₁₀NO₃ [M+H]⁺ : 216.065520 ; trouvée : 216.065719 ; ΔHRMS = 0.9 ppm

m/z calculée pour C₁₂H₉NNaO₃ [M+Na]⁺ : 238.047464 ; trouvée : 238.047687 ;

ΔHRMS = 0.9 ppm

❖ 7-methoxy-3-phenyl-1,6-dioxo-3-azaspiro[4.4]non-8-en-2-one(16b) :



Préparation : Dans une cuve électrochimique, sont introduits 2.79 mmol de *tert*-butyl (furan-2-ylméthyl) (phenyl) carbamate, 1,3 équivalents de NH_4Br et 75 mg de NEt_4BF_4 dans 25 mL de méthanol. La solution est soumise à une intensité de 20 mA pendant 18 h 41 min soit à une charge électrique $Q = I \times t = 1345.2$ C. La disparition du produit de départ ainsi que la formation des diacétals sont suivies par CPG et GC-MS. A l'issue de la réaction, le méthanol est évaporé puis le NH_4Br est éliminé par lavage à l'acétate d'éthyle et filtration sur fritté. Enfin, l'acétate d'éthyle est évaporé. Le brut réactionnel (2.14 mmol, 664 mg) est engagé dans une seconde étape par dilution dans 50 mL de dichlorométhane distillé et placé à -78 °C. Ensuite, le BF_3OEt (2.14 mmol, 304 mg) est ajouté au mélange réactionnel. Après 1 h, le mélange réactionnel est versé dans un erlenmeyer contenant 15 mL d'une solution de $NaHCO_3$ saturée, puis la phase organique est récupérée et séchée par Na_2SO_4 avant d'être filtrée sur fritté. Après évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice.

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 58 %

Le produit est obtenu sous la forme de deux diastéréoisomères **A** et **B** dont les proportions respectives sont 60 % et 40 % (déterminées à l'aide de l'intégration des protons **a** et **b** par RMN 1H).

Aspect: huile marron

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.52 (d, 2H, $J_{i-j} = 7.4$ Hz, **i**, **A** et **B**), 7.38 (t, 2H, $J_{j-i} = J_{j-k} = 7.4$ Hz, **j**, **A** et **B**), 7.14 (t, 1H, $J_{k-j} = 7.4$ Hz, **k**, **A** et **B**), 6.26 (d, 1H, $J_{g-f} = 8.2$ Hz, **g**, **B**), 6.25 (d, 1H, $J_{g-f} = 8.2$ Hz, **g**, **A**), 6.16 (d, 1H, $J_{f-g} = 8.2$ Hz, **f**, **A**), 6.15 (d, 1H, $J_{f-g} = 8.2$ Hz, **f**, **B**), 5.94 (s, 1H, **b**, **B**), 5.83 (s, 1H, **b**, **A**), 4.19 (d, 1H, $J_{d-d'} = 10.3$ Hz, **d**, **B**), 4.15 (d, 1H, $J_{d-d'} = 10.3$ Hz, **d**, **A**), 4.11 (d, 1H, $J_{d'-d} = 10.3$ Hz, **d'**, **B**), 4.03 (d, 1H, $J_{d'-d} = 10.3$ Hz, **d'**, **A**), 3.46 (s, 3H, **a**, **B**), 3.42 (s, 3H, **a**, **A**)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 151.9 (**e**, **A**), 151.8 (**e**, **B**), 136.7 (**h**, **A**), 136.6 (**h**, **B**), 133.2 (**g**, **B**), 132.6 (**g**, **A**), 129.6 (**f**, **A**), 129.4 (**f**, **B**), 128.1 (**j**, **A** et **B**), 123.2 (**k**, **A** et

B), 117.3 (i, A), 117.2 (i, B), 108.9 (c, B), 108.4 (b, B), 107.7 (c, A), 107.1 (b, A), 54.5 (a, B), 53.7 (d, B), 53.1 (d, A), 53.0 (a, A)

CPG : (Appareil A, méthode 1) Rt = 20.77 min (B) et 21.27 min (A)

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 1750$ ($\nu_{C=O}$), 1599 ($\nu_{C=C}$), 1503 ($\nu_{C=C}$), 1470 (δ_{CH_2}), 1376 (δ_{CH_3}), 1198 (ν_{C-O}), 1182 (ν_{C-O}), 1156 (ν_{C-O}), 810 (γ_{C-H}), 751 (γ_{C-H}) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : **A** : 77 (19 %), 79 (9 %), 83 (10 %), 101 (42 %), 104 (12 %), 106 (100 %), 107 (9 %), 111 (15 %), 115 (17 %), 129 (31 %), 130 (18 %), 144 (15 %), 172 (20 %), 230 (8 %), 247 (43 %) ; **B** : 77 (36 %), 79 (26 %), 83 (15 %), 101 (57 %), 104 (18 %), 106 (100 %), 107 (15 %), 111 (31 %), 115 (22 %), 129 (38 %), 130 (23 %), 144 (15 %), 172 (22 %), 230 (15 %), 247 (35 %)

HRMS : m/z calculée pour $C_{13}H_{14}NO_4$ $[M+H]^+$: 248.091734 ; trouvée : 248.091886 ; $\Delta HRMS = 0.6$ ppm

m/z calculée pour $C_{13}H_{13}NNaO_4$ $[M+Na]^+$: 270.073679 ; trouvée : 270.073790 ;

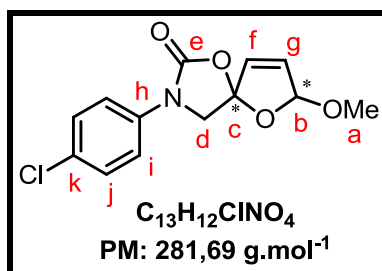
$\Delta HRMS = 0.4$ ppm

m/z calculée pour $C_{13}H_{17}N_2O_4$ $[M+NH_4]^+$: 265.118283 ; trouvée : 265.118344 ;

$\Delta HRMS = 0.2$ ppm

Analyse élémentaire calculée pour $[C_{13}H_{13}NO_4 \cdot 1/3H_2O]$: C (61.65 %), H (5.44 %), N (5.53 %) ; trouvée C (61.56 %), H (5.30 %), N (5.40 %)

❖ **7-methoxy-3-(4-chlorophenyl-1,6-dioxa-3-azaspiro[4.4]non-8-en-2-one (16d) :**



Préparation : Dans une cuve électrochimique, sont introduits 2.84 mmol de *tert*-butyl (4-chlorophenyl) (furan-2-ylmethyl)carbamate, 1,3 équivalents de NH₄Br et 75 mg de NEt₄BF₄ dans 25 mL de méthanol. La solution est soumise à une intensité de 20 mA pendant 19 h 20 min soit à une charge électrique $Q = I \times t = 1392$ C. La disparition du produit de départ ainsi que la formation des diacétals sont suivies par CPG et GC-MS. A l'issue de la réaction, le méthanol est évaporé puis le NH₄Br est éliminé par lavage à l'acétate d'éthyle et filtration sur fritté. Enfin, l'acétate d'éthyle est évaporé. Le brut réactionnel est engagé dans une seconde étape par dilution dans 50 mL de dichlorométhane distillé et placé à -78 °C. Ensuite, le BF₃OEt (2.84 mmol, 403 mg) est ajouté au mélange réactionnel. Après 1 h, le mélange réactionnel est versé dans un erlenmeyer contenant 15 mL d'une solution de NaHCO₃ saturée, puis la phase organique est récupérée et séchée par Na₂SO₄ avant d'être filtrée sur fritté. Après évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice.

Purification : chromatographie éclair sur gel de silice (éluants : EP/AcOEt, 1/0 → 8/2)

Rendement isolé : 62 %

Le produit est obtenu sous la forme de deux diastéréoisomères **A** et **B** dont les proportions respectives sont 78 % et 22 % (déterminées à l'aide de l'intégration des protons **a** et **b** par RMN ¹H).

Aspect : huile marron

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7.44 (d, 2H, $J_{i-j} = 9.0$ Hz, **i**, **A** et **B**), 7.29 (d, 2H, $J_{j-i} = 9.0$ Hz, **j**, **A** et **B**), 6.26 (d, 1H, $J_{g-f} = 5.7$ Hz, **g**, **A** et **B**), 6.18 (d, 1H, $J_{f-g} = 5.7$ Hz, **f**, **A**), 6.14 (d, 1H, $J_{f-g} = 5.7$ Hz, **f**, **B**), 5.94 (s, 1H, **b**, **B**), 5.83 (s, 1H, **b**, **A**), 4.17 (d, 1H, $J_{d-d'} = 10.2$ Hz, **d**, **B**), 4.15 (d, 1H, $J_{d-d'} = 10.2$ Hz, **d**, **A**), 4.08 (d, 1H, $J_{d'-d} = 10.2$ Hz, **d'**, **B**), 4.01 (d, 1H, $J_{d'-d} = 10.2$ Hz, **d'**, **A**), 3.46 (s, 3H, **a**, **B**), 3.43 (s, 3H, **a**, **A**)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 151.6 (**e**, **A** et **B**), 135.3 (**h**, **A** et **B**), 133.5 (**g**, **B**), 132.9 (**g**, **A**), 129.5 (**f**, **A**), 129.3 (**f**, **B**), 128.5 (**k**, **A** et **B**), 128.1 (**j**, **A** et **B**), 118.5 (**i**, **A**), 118.4

(i, B), 108.9 (c, B), 108.6 (b, B), 107.6 (c, A), 107.1 (b, A), 54.9 (a, B), 53.7 (d, B), 53.2 (a, A), 53.0 (d, A)

CPG : (Appareil A, méthode 1) Rt = 23.63 min (B) et 24.04 min (A)

ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3095$ (ν_{CH}), 2918 (ν_{CH}), 1747 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1634 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1601 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1497 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1473 (δ_{CH_2}), 1374 (δ_{CH_3}), 1093 ($\nu_{\text{C-O}}$), 961 ($\gamma_{\text{C-H}}$), 867 ($\gamma_{\text{C-H}}$), 777 ($\gamma_{\text{C-H}}$) cm^{-1}

GC-MS (intensité relative) : **A** : 83 (16 %), 98 (100 %), 111 (33 %), 138 (42 %), 140 (20 %), 142 (10 %), 143 (24 %), 178 (68 %), 179 (10 %), 180 (24 %), 205 (21 %), 206 (62 %), 207 (16 %), 208 (18 %), 237 (18 %), 250 (32 %) ; **B** : 83 (20 %), 98 (100 %), 111 (41 %), 138 (35 %), 140 (18 %), 142 (10 %), 143 (18 %), 178 (66 %), 179 (17 %), 180 (22 %), 205 (22 %), 206 (46 %), 207 (14 %), 208 (16 %), 237 (17 %), 250 (20 %)

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 206 (100 %), 208 (35 %), 238 (98 %), 240 (23 %), 250 (43 %, [M-OCH₃]⁺)

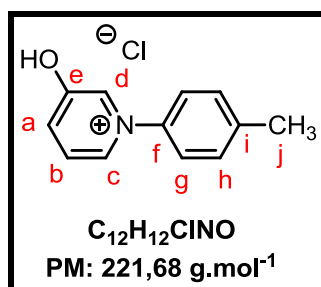
HRMS : m/z calculée pour C₁₂H₉ClNO₃ [M-OCH₃]⁺ : 250.026547 ; trouvée : 250.026704 ; $\Delta\text{HRMS} = 0.6$ ppm

m/z calculée pour C₁₃H₁₃ClNO₄ [M+H]⁺ : 282.052762 ; trouvée : 282.052841 ; $\Delta\text{HRMS} = 0.3$ ppm

m/z calculée pour C₁₃H₁₂ClNaO₄ [M+Na]⁺ : 304.034706 ; trouvée : 304.034629 ; $\Delta\text{HRMS} = 0.3$ ppm

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₃H₁₂ClNO₄.1/3H₂O] : C (54.27 %), H (4.44 %), N (4.87 %) ; trouvée C (54.67 %), H (4.44 %), N (4.75 %)

❖ **3-hydroxy-1-(*p*-tolyl) pyridin-1-ium chloride (17a) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-3, étape 1** avec : **n** = 3.48 mmol (1 g), **I** = 10 mA, **t** = 23 h 30 min soit **Q** = 844 C ; **étape 2** avec **V** = 50 mL

Purification : chromatographie éclair sur phase inverse (C₁₈), éluant mélange H₂O/MeOH 95/5, le sel de pyridinium est élué au volume mort.

Rendement isolé : 36 %

CAS number : 22219-10-9

Aspect: poudre beige

Point de fusion : 150-152 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 8.64 (massif, 2H, **c** et **d**), 8.10 (dt, 1H, $J_{a-b} = 8.6$ Hz, $J_{a-c} = J_{a-d} = 2.2$ Hz, **a**), 8.04 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 8.6$ Hz, **b**), 7.65 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.3$ Hz, **g**), 7.53 (d, 2H, $J_{h-g} = 8.3$ Hz, **h**), 2.50 (s, 3H, **j**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 159.4 (**e**), 143.8 (**i**), 142.4 (**f**), 137.0 (**c**), 134.2 (**d**), 133.5 (**a**), 132.2 (**h**), 130.0 (**b**), 125.5 (**g**), 21.3 (**j**)

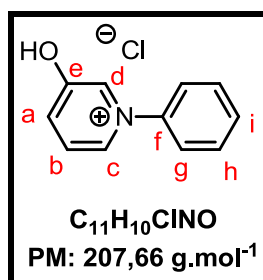
ATR-FTIR(neat) : ν = 3509 (ν_{O-H}), 3393 (ν_{O-H}), 3061 (ν_{C-H}), 3041 (ν_{C-H}), 1573 (ν_{C=C}), 1486 (ν_{C=C}), 1384 (δ_{CH₃}), 1369 (δ_{O-H}), 1321 (δ_{O-H}), 1253 (δ_{O-H}), 830 (γ_{C-H}), 813 (γ_{C-H}), 799 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (95 % MeOH / 10 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 2.07 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 186 (C₁₂H₁₂NO⁺, 100 %), 187 (C₁₂H₁₃NO²⁺, 16 %), 372 (C₂₄H₂₃N₂O₂⁺, 11 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₁₂ClNO.3/2H₂O] : C (57.95 %), H (6.08 %), N (5.63 %) ; trouvée C (57.79 %), H (5.84 %), N (5.25 %)

❖ **3-hydroxy-1-phenylpyridin-1-ium chloride (17b) :**



Préparation : Dans un ballon, sont dissous 3.46 mmol du mélange de diastéréoisomères 7-methoxy-3-phenyl-1,6-dioxa-3-azaspiro[4.4]non-8-en-2-one dans 20 mL de THF et 10 mL d'une solution aqueuse d'HCl (6 N). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 96 h. Après évaporation du mélange de solvants, la formation du produit est contrôlée par RMN ¹H.

Purification : Lesel de pyridinium est purifié par lavages successifs à l'acétate d'éthyle.

Rendement isolé : 13 %

CAS number : 15941-41-0

Aspect: poudre marron

Point de fusion : 209-211 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 8.82 (s, 1H, **d**), 8.78 (d, 1H, $J_{c-b} = 5.9$ Hz, **c**), 8.18 (dd, 1H, $J_{a-b} = 8.7$ Hz, **a**), 8.06 (dd, 1H, $J_{b-a} = 8.7$ Hz, $J_{b-c} = 5.9$ Hz, **b**), 7.85 (m, 2H, **g**), 7.73 (massif, 3H, **h** et **i**)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 157.1 (**e**), 142.9 (**f**), 135.7 (**c**), 133.1 (**i**), 132.2 (**a**), 131.2 (**d**), 130.1 (**h**), 128.5 (**b**), 124.5 (**g**)

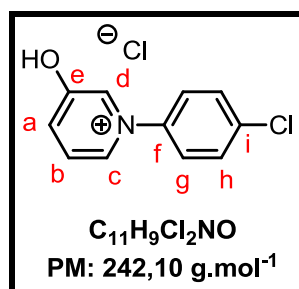
ATR-FTIR (neat) : ν = 3432 (ν_{O-H}), 3057 (ν_{C-H}), 2917 (ν_{C-H}), 1622 (ν_{C=C}), 1574 (ν_{C=C}), 1323 (δ_{O-H}), 1259 (δ_{O-H}), 841 (γ_{C-H}), 763 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (5 % MeOH / 95 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 2.63 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 172 (C₁₁H₁₀NO⁺, 100 %), 173 (C₁₁H₁₁NO²⁺, 14 %), 343 (C₂₂H₁₉N₂O₂⁺, 8 %), 343 (C₂₂H₂₀N₂O₂²⁺, 2 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₁₀ClNO.4/3H₂O] : C (57.03 %), H (5.51 %), N (6.05 %) ; trouvée C (57.39 %), H (5.43 %), N (6.11 %)

❖ **1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypyridin-1-ium chloride (17d) :**



Préparation : Dans un ballon, sont dissous 3.55 mmol du mélange de diastéréoisomères 7-methoxy-3-(4-chlorophenyl-1,6-dioxa-3-azaspiro[4.4]non-8-en-2-one dans 20 mL de THF et 10 mL d'une solution aqueuse d'HCl (6 N). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 96 h. Après évaporation du mélange de solvants, la formation du produit est contrôlée par RMN ¹H.

Purification : Le sel de pyridinium est purifié par lavages successifs à l'acétate d'éthyle.

Rendement isolé : 12 %

CAS number : 42335-69-3

Aspect: poudre marron

Point de fusion : 175-177 °C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 8.80 (s, 1H, **d**), 8.75 (d, 1H, $J_{c-b} = 7.8$ Hz, **c**), 8.17 (d, 1H, $J_{a-b} = 8.7$ Hz, **a**), 8.08 (dd, 1H, $J_{b-a} = 8.7$ Hz, $J_{b-c} = 7.8$ Hz, **b**), 7.88 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.9$ Hz, **g**), 7.82 (d, 2H, $J_{h-g} = 8.9$ Hz, **h**)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 157.1 (**e**), 141.5 (**f**), 135.9 (**i**), 137.8 (**c**), 133.2 (**a**), 132.4 (**d**), 130.0 (**h**), 128.5 (**b**), 126.6 (**g**)

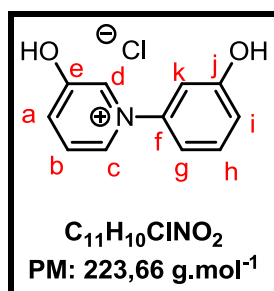
ATR-FTIR (neat) : ν = 3375 (ν_{O-H}), 3132 (ν_{C-H}), 3052 (ν_{C-H}), 1560 (ν_{C=C}), 1470 (ν_{C=C}), 1386 (δ_{O-H}), 1288 (δ_{O-H}), 1212 (ν_{C-O}), 894 (γ_{C-H}), 833 (γ_{C-H}), 796 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (50 % MeOH / 50 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 2.46 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 206 (C₁₁H₉ClNO⁺, 100 %), 207 (C₁₁H₁₀ClNO²⁺, 13 %), 208 (C₁₁H₁₁ClNO³⁺, 32 %), 228 (C₁₁H₉ClNNaO²⁺, 100 %), 260 (C₁₁H₉ClNNaO²⁺.MeOH, 14 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₉Cl₂NO.14/13H₂O] : C (50.52 %), H (4.30 %), N (5.36 %) ; trouvée C (50.18 %), H (4.08 %), N (5.82 %)

❖ **3-hydroxy-1-(3-hydroxyphenyl) pyridin-1-ium chloride (17f) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-3, étape 1** avec : **n** = 2.57mmol (1 g), **I** = 10 mA, **t** = 20 h 40 min soit **Q** = 744 C ; **étape 2** avec **V** = 60 mL

Purification : chromatographie éclair sur phase inverse (C₁₈), éluant mélange H₂O/MeOH 95/5, le sel de pyridinium est élué au volume mort.

Rendement isolé : 42 %

Aspect: poudre blanche

Point de fusion : 141-143 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 8.65 (massif, 2H, **c** et **d**), 8.12 (dd, 1H, $J_{a-b} = 8.8$ Hz, $J_{a-c} = 2.2$ Hz, **a**), 8.04 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 8.8$ Hz, **b**), 7.51 (t, 1H, $J_{h-g} = J_{h-i} = 8.2$ Hz, **h**), 7.19 (massif, 2H, **k** et **i**), 7.12 (dd, 1H, $J_{g-h} = 8.2$ Hz, $J_{g-i} = 2.3$ Hz, **g**),

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 160.7 (**j**), 159.3 (**e**), 145.7 (**f**), 137.1 (**c**), 134.2 (**d**), 133.7 (**a**), 132.7 (**h**), 130.0 (**b**), 119.7 (**g**), 115.9 (**k**), 112.4 (**i**)

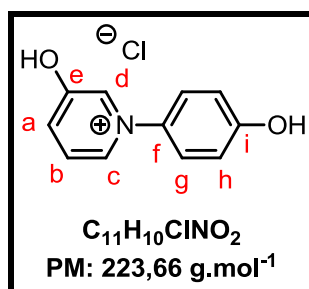
ATR-FTIR (neat) : ν = 3286 (ν_{O-H}), 3014 (ν_{C-H}), 1575 (ν_{C=C}), 1478 (ν_{C=C}), 1375 (δ_{O-H}), 1343 (δ_{O-H}), 1313 (δ_{O-H}), 1270 (δ_{O-H}), 844 (γ_{C-H}), 788 (γ_{C-H}), 679 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.20 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 188 (C₁₁H₁₀NO₂⁺, 100 %), 189 (C₁₁H₁₁NO₂²⁺, 13 %), 375 (C₂₂H₁₉N₂O₄⁺, 73 %), 376 (C₂₂H₂₀N₂O₄²⁺, 14 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₁₀ClNO₂.3/2H₂O] : C (52.70 %), H (5.23 %), N (5.59 %) ; trouvée C (52.72 %), H (4.95 %), N (5.48 %)

❖ **3-hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)pyridin-1-ium chloride (17g) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-3, étape 1** avec : **n** = 3.0 mmol (1.15 g), **I** = 10 mA, **t** = 40 h soit **Q** = 1440 C ; **étape 2** avec **V** = 40 mL

Purification : chromatographie éclair sur phase inverse (C₁₈), éluant mélange H₂O/MeOH 95/5, le sel de pyridinium est élué au volume mort.

Rendement isolé : 31 %

Aspect: poudre beige

Point de fusion : 250-252 °C (décomposition)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 8.59 (massif, 2H, **c** et **d**), 8.05 (dt, 1H, $J_{a-b} = 9.6$ Hz, $J_{a-c} = J_{a-d} = 1.6$ Hz, **a**), 7.99 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 9.6$ Hz, **b**), 7.59 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.0$ Hz, **g**), 7.04 (d, 2H, $J_{h-g} = 8.0$ Hz, **h**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 162.5 (**e**), 159.9 (**i**), 137.5 (**f**), 137.2 (**c**), 134.8 (**a**), 133.4 (**d**), 130.4 (**b**), 127.3 (**g**), 118.5 (**h**)

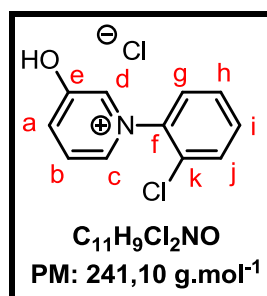
ATR-FTIR(neat) : ν = 3436 (ν_{O-H}), 3338 (ν_{O-H}), 3074 (ν_{C-H}), 3059 (ν_{C-H}), 1597(ν_{C=C}), 1579 (ν_{C=C}), 1489 (ν_{C=C}), 1319 (δ_{O-H}), 1291 (δ_{O-H}), 1263 (δ_{O-H}), 837 (γ_{C-H}), 812 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (95 % MeOH / 10 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 1.87 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 188 (C₁₁H₁₀NO₂⁺, 100 %), 189 (C₁₁H₁₁NO₂²⁺, 13 %), 375 (C₂₂H₁₉N₂O₄⁺, 5 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₁₀ClNO₂.5/4H₂O] : C (53.67 %), H (5.12 %), N (5.69 %) ; trouvée C (53.93 %), H (4.95 %), N (5.26 %)

❖ **1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypyridin-1-ium chloride (17h) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-3, étape 1** avec : **n** = 1.94 mmol (0.59 g), **I** = 10 mA, **t** = 15 h40 min soit **Q** = 564 C ; **étape 2** avec **V** = 40 mL

Purification : CPC

Rendement isolé : 11 %

Aspect: solide marron très visqueux (hygroscopique)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 8.63 (massif, 2H, **c** et **d**), 8.22 (d, 1H, $J_{a-b} = 7.4$ Hz, **a**), 8.13 (m, 1H, **b**), 7.82 (massif, 2H, **g** et **j**), 7.75 (t, 1H, $J_{i-h} = J_{i-j} = 7.5$ Hz, **i**), 7.68 (t, 1H, $J_{h-i} = J_{h-g} = 7.5$ Hz, **h**)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 159.4 (**e**), 141.6 (**f**), 138.9 (**c**), 135.9 (**d**), 135.0 (**a**), 134.5 (**i**), 132.4 (**j**), 130.4 (**h**), 130.2 (**b**), 129.9 (**k**), 129.0 (**g**)

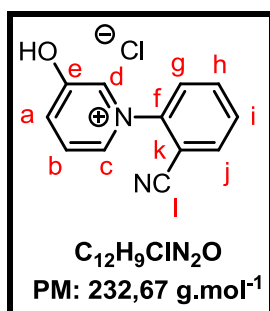
ATR-FTIR (neat) : $\nu = 3103$ (ν_{O-H}), 2595 (ν_{C-H}), 1573 ($\nu_{C=C}$), 1470 ($\nu_{C=C}$), 1443 (δ_{O-H}), 1325 (δ_{O-H}), 1254 (ν_{C-O}), 1228 (ν_{C-O}), 764 (γ_{C-H}), 681 (γ_{C-H}) cm^{-1}

CLHP : (50 % MeCN / 50 % H₂O acide formique 0.1 %) $R_t = 1.74$ min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 206 (C₁₁H₉CINO⁺, 100 %), 207 (C₁₁H₁₀CINO²⁺, 11 %), 208 (C₁₁H₁₁CINO³⁺, 35 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₉Cl₂NO.1/3H₂O] : C (53.25 %), H (3.93 %), N (5.65 %) ; trouvée C (53.67 %), H (4.49 %), N (5.76 %)

❖ **1-(2-cyanophenyl)-3-hydroxypyridin-1-ium chloride (17j) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-3, étape 1** avec : **n** = 1.02 mmol (0.30 g), **I** = 10 mA, **t** = 7 h soit **Q** = 252 C ; **étape 2** avec **V** = 20 mL

Purification : CPC

Rendement isolé : 32 %

Aspect: solide marron

Point de fusion : 129-131 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 8.84 (s, 1H, **d**), 8.78 (d, 1H, J_{c-b} = 5.9 Hz, **c**), 8.28 (d, 1H, J_{a-b} = 8.2 Hz, **a**), 8.19 (dd, 1H, J_{b-a} = 8.2 Hz, J_{b-c} = 5.9 Hz, **b**), 8.13 (dd, 1H, J_{j-i} = 7.6 Hz, J_{j-h} = 1.3 Hz, **j**), 8.04 (massif, 2H, **g** et **h**), 7.94 (td, 1H, J_{i-j} = J_{i-h} = 7.6 Hz, J_{i-g} = 1.3 Hz, **j**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 159.5 (**e**), 145.2 (**f**), 138.4 (**c**), 136.4 (**h**), 135.8 (**j**), 135.5 (**a**), 135.4 (**d**), 133.7 (**i**), 130.3 (**b**), 128.4 (**g**), 115.3 (**l**), 110.8 (**k**)

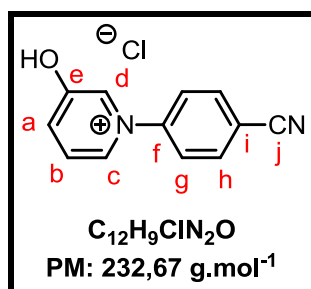
ATR-FTIR (neat) : 3036 (ν_{C-H}), 2232 ($\nu_{C\equiv N}$), 1572 ($\nu_{C=C}$), 1448 ($\nu_{C=C}$), 1323 (δ_{O-H}), 1241 (δ_{O-H}), 767 (γ_{C-H}), 684 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (50 % MeCN / 50 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 1.74 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 197 (C₁₂H₉N₂O⁺, 100 %), 198 (C₁₂H₁₀N₂O²⁺, 15 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₉ClN₂O.H₂O] : C (57.49 %), H (4.42 %), N (11.17 %) ; trouvée C (57.17 %), H (4.14 %), N (10.81 %)

❖ 1-(4-cyanophenyl)-3-hydroxypyridin-1-ium chloride(17k) :



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-3, étape 1** avec : **n** = 1.48 mmol (0.44 g), **I** = 10 mA, **t** = 10 h soit **Q** = 360 C ; **étape 2** avec **V** = 30 mL

Purification : CPC

Rendement isolé : 21 %

Aspect: poudre marron clair

Point de fusion : déc ≤ 250 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 8.74 (s, 1H, **d**), 8.71 (d, 1H, J_{c-b} = 7.1 Hz, **c**), 8.17-8.07 (massif, 4H, **a**, **b** et **g**), 8.00 (d, 2H, J_{h-g} = 8.7 Hz, **h**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 159.7 (**e**), 147.3 (**f**), 137.0 (**c**), 135.8 (**g**), 134.6 (**d**), 134.5 (**a**), 130.1 (**b**), 127.1 (**h**), 118.3 (**i**), 117.0 (**k**)

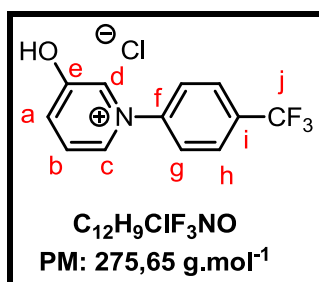
ATR-FTIR (neat) : ν = 3107 (ν_{C-H}), 3053 (ν_{C-H}), 3031 (ν_{C-H}), 2233 ($\nu_{C\equiv N}$), 1571 ($\nu_{C=C}$), 1497 ($\nu_{C=C}$), 1366 (δ_{O-H}), 1264 (δ_{O-H}), 1231 (δ_{O-H}), 847 (γ_{C-H}), 790 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (70 % MeCN / 10 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 2.41 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 197 (C₁₂H₉N₂O⁺, 100 %), 198 (C₁₂H₁₀N₂O²⁺, 13 %), 267 (C₁₂H₉N₂Na₃O³⁺, 6 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₁H₉ClN₂O.3/5H₂O] : C (59.20 %), H (4.22 %), N (11.51 %) ; trouvée C (59.69 %), H (4.38 %), N (11.00 %)

❖ **3-hydroxy-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)pyridin-1-ium chloride (17n):**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-3, étape 1** avec : **n** = 3.14 mmol (1.07 g), **I** = 10 mA, **t** = 21 h 15 min soit **Q** = 765 C ; **étape 2** avec **V** = 50 mL

Purification : CPC

Rendement isolé : 17 %

Aspect: solide marron très visqueux

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 8.77 (s, 1H, **d**), 8.74 (d, 1H, J_{c-b} = 5.9 Hz, **c**), 8.18 (d, 1H, J_{a-b} = 8.6 Hz, **a**), 8.14-8.01 (massif, 5H, **b, g et h**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 159.5 (**e**), 147.2 (**f**), 137.3 (**c**), 135.0-134.0 (q, J_{i-F} = 33.0 Hz, **i**), 134.9 (**d**), 134.3 (**a**), 130.3 (**b**), 129.1-120.9 (q, J_{j-F} = 275.1 Hz, **j**), 129.0 (**h**), 127.0 (**g**)

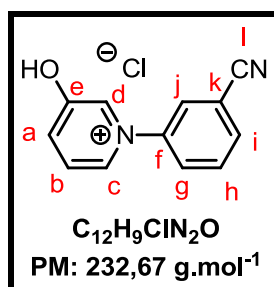
RMN ¹⁹F (376 MHz, MeOD) : δ (ppm) = -64.38

ATR-FTIR (neat) : ν = 3018 (ν_{C-H}), 1578 (ν_{C=C}), 1501 (ν_{C=C}), 1319 (δ_{O-H}), 1263 (δ_{O-H}), 1168 (δ_{CF₃}), 1110 (δ_{CF₃}), 1069 (δ_{CF₃}), 804 (γ_{C-H}), 720 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (50 % MeCN / 50 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 1.46 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 240 (C₁₂H₉F₃NO⁺, 100 %), 241 (C₁₂H₁₀F₃NO²⁺, 14 %)

❖ **1-(3-cyanophenyl)-3-hydroxypyridin-1-ium chloride (17o) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-3, étape 1** avec : **n** = 3.47mmol (1.03 g), **I** = 10 mA, **t** = 23 h 15 min soit **Q** = 837 C ; **étape 2** avec **V** = 50 mL

Purification : CPC

Rendement isolé : 5 %

Aspect: solide marron très visqueux (hygroscopique)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 8.74 (massif, 2H, **c** et **d**), 8.29-7.99 (massif, 5H, **a**, **b**, **g**, **i** et **j**), 7.90 (t, 1H, $J_{h-g} = J_{h-i} = 8.2$ Hz, **h**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 159.4 (**e**), 144.7 (**f**), 137.6 (**c**), 136.5 (**a**), 134.5 (**d**), 134.6 (**i**), 133.1 (**h**), 130.8 (**g**), 130.4 (**b**), 130.0 (**j**), 118.1 (**l**), 115.6 (**k**)

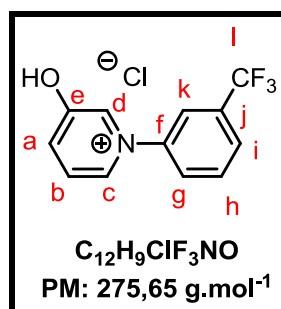
ATR-FTIR (neat) : ν = 3052 (ν_{C-H}), 2234 (ν_{C≡N}), 1574 (ν_{C=C}), 1474 (ν_{C=C}), 1383 (δ_{O-H}), 1320 (δ_{O-H}), 1240 (δ_{O-H}), 799 (γ_{C-H}), 678 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (50 % MeCN / 50 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 2.13 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 197 (C₁₂H₉N₂O⁺, 67 %), 393 (C₂₄H₁₇N₄O₂⁺, 100 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₉ClN₂O.1/2H₂O] : C (59.64 %), H (4.17 %), N (11.59 %) ; trouvée C (59.29 %), H (4.60 %), N (11.75 %)

❖ **3-hydroxy-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)pyridin-1-ium chloride (17r):**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-3, étape 1** avec : **n** = 0.96mmol (0.33 g), **I** = 10 mA, **t** = 6 h 30 min soit **Q** = 234 C ; **étape 2** avec **V** = 20 mL

Purification : CPC

Rendement isolé : 5 %

Aspect : solide marron très visqueux

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 8.77 (s, 1H, **d**), 8.74 (dd, 1H, $J_{c-b} = 7.7$ Hz, $J_{c-a} = 1.7$ Hz, **c**), 8.24 (s, 1H, **k**), 8.17 (dd, 1H, $J_{a-b} = 8.2$ Hz, $J_{a-c} = 1.7$ Hz, **a**), 8.10 (massif, 3H, **b**, **g** et **i**), 7.95 (t, 1H, $J_{h-g} = J_{h-i} = 8.7$ Hz, **j**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 159.4 (**e**), 145.0 (**f**), 137.5 (**c**), 134.8 (**d**), 134.5-132.7 (q, $J_{j-F} = 33.7$ Hz, **j**), 134.3 (**a**), 130.1 (**b**), 129.8 (**g**), 129.6 (q, $J_{i-F} = 3.6$ Hz, **i**), 128.9-120.7 (q, $J_{l-F} = 273.4$ Hz, **l**), 123.3 (q, $J_{k-F} = 3.9$ Hz, **k**)

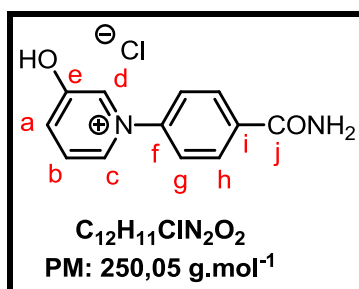
RMN ¹⁹F (376 MHz, MeOD) : δ (ppm) = -64.17

ATR-FTIR (neat) : ν = 3052 (ν_{C-H}), 1577 (ν_{C=C}), 1446 (ν_{C=C}), 1329 (δ_{O-H}), 1223 (δ_{O-H}), 1170 (δ_{CF₃}), 1119 (δ_{CF₃}), 1073 (δ_{CF₃}), 799 (γ_{C-H}), 697 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (50 % MeCN / 50 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 1.48 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 240 (C₁₂H₉F₃NO⁺, 100 %), 241 (C₁₂H₁₀F₃NO²⁺, 14 %)

❖ **1-(4-carbamoylphenyl)-3-hydroxypyridin-1-ium chloride (17s) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-3, étape 1** avec : **n** = 1.82 mmol (0.57 g), **I** = 10 mA, **t** = 12 h15 min soit **Q** = 441 C ; **étape 2** avec **V** = 50 mL

Purification : CPC

Rendement isolé : 12 %

Aspect: solide marron très visqueux (hygroscopique)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 8.75 (massif, 2H, **c** et **d**), 8.34 (d, 2H, $J_{h-g} = 8.2$ Hz, **h**), 8.17 (d, 1H, $J_{a-b} = 7.3$ Hz, **a**), 8.10 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 7.3$ Hz, **b**), 7.93 (d, 2H, $J_{g-h} = 8.2$ Hz, **g**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 166.9 (**j**), 159.5 (**e**), 147.6 (**f**), 137.2 (**c**), 134.5 (**d**), 134.4 (**i**), 134.2 (**a**), 132.8 (**h**), 130.1 (**b**), 126.1 (**g**)

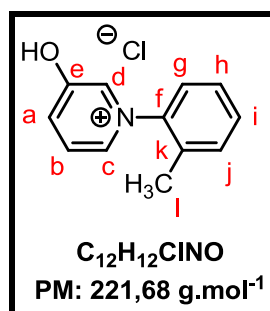
ATR-FTIR (neat) : $\nu = 2989$ (ν_{C-H}), 1665 ($\nu_{C=O}$), 1605 (ν_{N-H}), 1578 ($\nu_{C=C}$), 1485 ($\nu_{C=C}$), 860 (γ_{C-H}), 737 (γ_{C-H}) cm^{-1}

CLHP : (100 % MeOH) $R_t = 2.12$ min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 215 (C₁₂H₁₁N₂O₂⁺, 100 %), 216 (C₁₂H₁₂N₂O₂²⁺, 14 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₁₁ClN₂O₂.3/2H₂O] : C (51.90 %), H (5.08 %), N (10.09 %) ; trouvée C (52.06 %), H (5.46 %), N (10.17 %)

❖ **3-hydroxy-1-(*o*-tolyl)pyridin-1-ium chloride (17v) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-3, étape 1** avec : **n** = 3.48 mmol (1 g), **I** = 10 mA, **t** = 33 h soit **Q** = 1188 C ; **étape 2** avec **V** = 40 mL

Purification : chromatographie éclair sur phase inverse (C₁₈), éluant mélange H₂O/MeOH 95/5, le sel de pyridinium est élué au volume mort.

Rendement isolé : 32 %

Aspect: poudre marron

Point de fusion : 186-188 °C (décomposition)

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 8.61 (s, 1H, **d**), 8.57 (d, 1H, *J*_{c-b} = 5.4 Hz, **c**), 8.24 (d, 1H, *J*_{a-b} = 7.2 Hz, **a**), 8.14 (dd, 1H, *J*_{b-a} = 7.2 Hz, *J*_{b-c} = 5.4 Hz, **b**), 7.59 (massif, 4H, **g, h, i** et **j**), 2.23 (s, 3H, **l**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 159.3 (**e**), 143.9 (**f**), 138.4 (**c**), 135.2 (**d**), 134.2 (**a**), 133.8 (**k**), 133.3 (**j**), 132.8 (**i**), 130.2 (**b**), 129.1 (**h**), 126.8 (**g**), 17.1 (**l**)

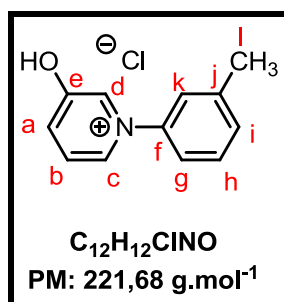
ATR-FTIR (neat) : ν = 3412 (ν_{O-H}), 3032 (ν_{C-H}), 1573 (ν_{C=C}), 1483 (ν_{C=C}), 1384 (δ_{CH₃}), 1325 (δ_{O-H}), 1309 (δ_{O-H}), 1255 (δ_{O-H}), 828 (γ_{C-H}), 809 (γ_{C-H}), 768 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (95 % MeOH / 10 % H₂O acide formique 0.1 %) Rt = 1.88 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 186 (C₁₂H₁₂NO⁺, 100 %), 187 (C₁₂H₁₃NO²⁺, 16 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₁₂ClNO.1/3H₂O] : C (63.30 %), H (5.61 %), N (6.15 %) ; trouvée C (63.31 %), H (5.50 %), N (5.87 %)

❖ **3-hydroxy-1-(*m*-tolyl)pyridin-1-ium chloride (17x) :**



Préparation : se reporter à la procédure générale **P-3, étape 1** avec : **n** = 3.48 mmol (1 g), **I** = 10 mA, **t** = 46 h 40 min soit **Q** = 1752 C ; **étape 2** avec **V** = 40 mL

Purification : chromatographie éclair sur phase inverse (C₁₈), éluant mélange H₂O/MeOH 95/5, le sel de pyridinium est élué au volume mort.

Rendement isolé : 38 %

Aspect : poudre beige

Point de fusion : 90-92 °C

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 8.08 (massif, 2H, **c** et **d**), 8.14 (dd, 1H, $J_{a-b} = 8.9$ Hz, $J_{a-c} = 1.8$ Hz, **a**), 8.06 (t, 1H, $J_{b-a} = J_{b-c} = 8.9$ Hz, **b**), 7.63 (s, 1H, **k**), 7.58 (massif, 3H, **g**, **h** et **i**), 2.52 (s, 3H, **l**)

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 159.3 (**e**), 144.8 (**f**), 142.7 (**j**), 137.2 (**c**), 134.3 (**d**), 133.6 (**a**), 133.5 (**i**), 131.6 (**h**), 130.0 (**b**), 125.9 (**k**), 122.5 (**g**), 21.4 (**l**)

ATR-FTIR (neat) : ν = 3479 (ν_{O-H}), 3107 (ν_{C-H}), 3047 (ν_{C-H}), 1576 (ν_{C=C}), 1484 (ν_{C=C}), 1381 (δ_{CH₃}), 1327 (δ_{O-H}), 1270 (δ_{O-H}), 1251 (δ_{O-H}), 827 (γ_{C-H}), 796 (γ_{C-H}) cm⁻¹

CLHP : (100 % MeOH) Rt = 2.45 min

LC-MS (intensité relative, mode ESI⁺) : 186 (C₁₂H₁₂NO⁺, 84 %), 188 (C₁₂H₁₄NO³⁺, 74 %)

Analyse élémentaire calculée pour [C₁₂H₁₂ClNO.7/3H₂O] : C (54.65 %), H (6.37 %), N (5.31 %) ; trouvée C (54.86 %), H (6.12 %), N (5.07 %).

Chapitre II : Partie expérimentale relative à la Partie III

I. Matériel

Milieu de culture des cellules SHSY5Y : DMEM 1X (4,5g/L D-Glucose, Gibco-Ref : 61965-020) additionné à 1 % de Pénicilline-Streptomycine (Gibco-Réf. : 15140-122), et à 10 % SVF (Gibco-Réf. : 10270-098 - Lot : 41F3343K) décomplémenté par 30 minutes de chauffage à 56 °C (Bain-marie VWB6 - VWR ©).

PBS 1X : provient de Gibco (Réf. : 14190-094).

Trypsine : (0.05% Trypsin-EDTA 1X) provient de chez Gibco (Réf. : 2300-054).

Cellule de comptage : le dénombrement des cellules se fait grâce à des lames de type *Kova Glasstic slide*.

Microscope : l'observation des cellules se fait sous microscope optique à contraste de phase Motic AE21.

Centrifugeuse : Les cellules sont centrifugées dans une centrifugeuse Heraeus Megafuge 16R de chez ThermoScientific.

Incubateur : Les cultures sont maintenues à 37 °C dans un incubateur Binder© - VWR sous 5 % CO₂, en atmosphère humide (95 %), pendant 3 jours avant toute expérimentation.

Sonde pour quantification des EROs : le réactif H₂DCFH-DA provient de chez Calbiochem (Lot : 287810 - MERCK MILLIPORE), il est conservée à -20 °C à l'abri de la lumière.

Sonde pour quantification de la viabilité cellulaire : le réactif CCK-8 (Cell Counting Kit-8) provient de chez DOJINDO GV846, il est conservé à 4 °C à l'abri de la lumière.

Tampon d'extraction des mitochondries : Tris HCl 20 mM, KCl 40 mM, EGTA 20 mM, d'albumine sérique bovine (BSA) 1mg/mL, pH 7,2 à 4 °C

Kit BCA : le kit BCA provient de ThermoFisher Scientific (Lot : #23225).

Tampon hypotonique : préparer 0,85 g de KH₂PO₄ (50 mM) et 0,094 g de MgCl₂ (10 mM) dans 100 mL d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7 avec du NaOH (5 N), à 37 °C. Ce réactif, une fois aliquoté, se conserve pendant 6 mois à -20 °C.

BSA : 0,175 g de BSA dans 5 mL de solution tampon hypotonique, à 37 °C.

Décylubiquinone (10 mM) : Une dilution préalable de 5 µL dans 250 µL d'éthanol est préparée, la solution est ensuite gardée dans de la glace.

NADH : Le β -NADH provient de chez Sigma-Aldrich (Lot : #037K6166). Une solution à 15 mM de NADH doit être préparée extemporanément en dissolvant 4,25 mg de NADH dans 200 μ L de tampon hypotonique. La solution doit être conservée dans la glace et protégée de la lumière.

Roténone : Cet inhibiteur est spécifique du complexe I de la CRM. Une solution de roténone à 2 mM est préparée en reprenant 1,58 mg de roténone par 2 mL d'éthanol. Une fois aliquotée, cette solution peut être conservée pendant un mois à -20 °C.

Cyanure de potassium (KCN) : Cet inhibiteur est spécifique du complexe IV de la CRM. 13 mg de cyanure de potassium sont dissous dans 2 mL d'eau distillée pour obtenir une concentration de 100 mM. La solution se conserve pendant un mois à -20 °C.

Cytochrome C : Le cytochrome C de cœur de cheval provient de chez Sigma-Aldrich (Lot : #129K7012). Une solution contenant 4,2 mg de cytochrome C dans 340 μ L de tampon hypotonique

Extraits de mitochondries : Une solution diluée d'extraits de mitochondrie est préparée et gardée dans de la glace. Il s'agit d'obtenir au final dans la cuve de 1 mL 100 μ g de mitochondries. La dilution choisie ainsi que le volume de cette solution diluée à ajouter dépendent des résultats obtenus lors du dosage protéique. Par exemple si le dosage protéique a donné une concentration de 20 μ g/ μ L, il faudra ajouter : $V = 100 (\mu\text{L})/20 (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = 5\mu\text{L}$ de mitochondries. Pour pouvoir injecter un volume raisonnable, une dilution au 5^{ème} est réalisée, puis 25 μ L de cette solution diluée sont ajoutés lors du dosage.

Spectrophotomètre : Les dosages de l'activité du complexe I et des complexes I à III ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre JASCO.V530.

II. Protocoles expérimentaux

II.1 Culture cellulaire

II.1.1 Ensemencement des cellules SH-SY5Y

II.1.1.1 Etape 1 : Décrocher des cellules adhérentes

A partir d'une flasque stock T75 de cellules adhérentes SH-SY5Y, l'ancien milieu de culture est éliminé. La flasque est rincée au PBS 1X, éliminant notamment les cellules mortes surnageantes. Puis, les cellules sont traitées à la trypsine (2 mL/T75) pour décoller toutes les cellules vivantes adhérentes. La trypsine est laissée agir 1 à 2 minutes à 37 °C dans l'incubateur. Les cellules se détachent de leur support et il est possible de vérifier au microscope qu'elles sont toutes bien décollées. A l'aide d'une pipette, un maximum de cellules est récupéré, par aspiration et refoulement du milieu, sur toute la paroi où les cellules avaient adhéré. Puis, la suspension cellulaire est introduite dans un Falcon de 15 mL stérile contenant du milieu complet (4 mL) afin d'inhiber l'action de la trypsine.

II.1.1.2 Etape 2 : Compter les cellules

Pour ensemercer précisément un nombre de cellule défini, les cellules sont dénombrées à l'aide d'une cellule de comptage sous microscope optique à contraste de phase. Le but est de connaître le nombre de cellules présentes dans la flasque en vue d'ensemencer des plaques de cultures et/ou un ou des nouveaux stocks de T75. Pour cela et après avoir bien re-suspendu les cellules plusieurs fois (afin que l'échantillon prélevé soit le plus représentatif possible du nombre de cellule présente dans la flasque), 20 µL de cellules sont introduits par capillarité dans une encoche de la cellule de comptage.

Afin de déterminer la densité cellulaire (N) d'une culture, c'est à dire le nombre de cellules par unité de volume, on utilise la lame *Kova Slide®* qui permet de dénombrer les cellules dans un volume connu, selon la formule :

$$N = n \times \text{Volume de resuspension} \times 10^4$$

Avec : n, le nombre de cellules comptées dans 9 petits carrés et dans un volume égal à 10^{-4} mL ; Volume de resuspension en mL (volume de trypsine + milieu) et N en cellules/mL. Pour davantage de précision, plusieurs comptages sont réalisés afin de calculer une moyenne.

II.1.1.3 Etape 3 : Ensemencer les cellules

Après le comptage, la suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 min à 1000 rpm. Le surnageant est alors éliminé puis le culot cellulaire resuspendu une dizaine de fois pour bien dissocier les agrégats de cellules dans un volume connu de milieu de culture, qui dépendra de la dilution souhaitée.

II.1.1.3.1 Ensemencement flasque de stock

Pour ensemer une nouvelle flasque réceptrice T75 (un nouveau stock de cellule), 10 mL de milieu de culture sont introduits dans un premier temps. Puis, un volume connu de cellules est introduit. Le volume dépendra de la dilution à appliquer et de la confluence initiale des cellules. Enfin, la flasque est incubée à 37 °C.

II.1.1.3.2 Ensemencement plaques multi-puits

Pour ensemer des plaques de culture multi-puits (24 puits dans cette étude), 200 μ L de milieu de culture sont introduits dans chaque puits. Les plaques sont préchauffées à 37 °C pour accueillir les cellules. Dans notre cas, nous voulons tester l'activité sur une population de semencée à la densité de 20 000 cellules/puits. Ainsi 300 μ L de mélange cellulaire sont introduits dans chaque puits et la plaque de culture est ensuite incubée 24 h à 37 °C.

II.1.2 Exposition des SH-SY5Y aux composés à tester

L'exposition des SH-SY5Y aux composés à tester est réalisée 24 h après semencement des cellules dans la plaque. La variation du nombre de cellule/puits, d'une plaque à l'autre est corrigée par la présence des témoins indispensables pour l'exploitation des résultats : PBS 1X pour les composés solubles dans le PBS et un mélange PBS/DMSO 50/50 pour les composés moins solubles. Les composés sont ensuite dilués dans le DMSO et/ou le PBS, puis ajoutés à du milieu complet afin d'avoir une concentration finale dans chaque puits de 1 mM. Dans chaque puits, l'ancien milieu de culture est éliminé pour ne pas comptabiliser les pertes qui ne

sont pas dues à l'ajout des molécules mais qui correspondent à la durée entre l'ensemencement des cellules et leur exposition aux molécules. Puis, 500 μL du mélange milieu complet/composés sont uniformément réparties dans les puits après homogénéisation. Sur une même plaque de culture, chaque composé est testé en triplicate et cette expérience est renouvelée 3 fois avec des cellules de passages différents.

II.2 Quantification des EROs

Au temps d'exposition souhaité, après avoir contrôlé l'état des cellules sous microscope, 3 μL de $\text{H}_2\text{DCFH-DA}$ de concentration égale à 2 mg/mL dans l'éthanol sont dilués dans 2 mL de PBS 1X. Après homogénéisation, 20 μL de $\text{H}_2\text{DCFH-DA}$ sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont finalement incubées à 37 °C pendant 3-4 h. Enfin, la fluorescence dans chaque puits est mesurée par le monochromateur Tecan, à $\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 560 \text{ nm}$.

II.3 Quantification de la viabilité cellulaire

Au temps d'exposition souhaité, après avoir contrôlé l'état des cellules sous microscope, 200 μL de milieu de culture sont éliminés de chaque puit. Puis 30 μL de CCK8 sont ajoutés dans chaque puits (300 μL final). Les plaques sont finalement incubées à 37 °C pendant 2 h. Enfin, l'absorbance dans chaque puits de la plaque est lue par le monochromateur Tecan, à 450 nm.

II.4 Dosage de l'activité du complexe I

II.4.1 Extraction et préparation des échantillons de mitochondries cérébrales

Le cerveau d'un rat (mâle ou femelle) Wistar de 280-300 g est prélevé le plus rapidement possible après décapitation. Les méninges sont éliminées et selon les besoins, le *striatum*, le cortex ou le cerveau complet est ensuite homogénéisé dans un Potter Elvehjem contenant 6

mL de tampon d'extraction à 4 °C.²⁸⁴ L'homogénéisation par 6 allers-retours permet ainsi de casser les cellules et libérer les mitochondries. L'homogénat obtenu est centrifugé à 2000 g pendant 8 minutes. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 13000 g pendant 11 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est remis en suspension avec un volume de tampon de respiration déterminé à partir du dosage colorimétrique (BCA). Les échantillons de mitochondries sont aliquotés et stockés à -20 °C en vue des futures analyses.

II.4.2 Dosage protéique par la méthode au BCA

II.4.2.1 Préparation de la gamme d'étalonnage de BSA

Une série de dilutions est réalisée à partir d'une solution de concentration connue de BSA (2000 µg/mL) (Tableau 40).

Tableau 40 : Gamme d'étalonnage de BSA

échantillon	Volume de tampon µL	volume BSA µL	[BSA] final (µg/mL)
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175 de B dilué	750
E	325	325 de C dilué	500
F	325	325 de E dilué	250
G	325	325 de F dilué	125
H	400	100 de G dilué	25
I	400	0	0

II.4.2.2 Préparation des échantillons à doser

Une série de tubes contenant différentes dilutions de l'échantillon à doser est préparée (Tableau 41).

²⁸⁴Rustin P1, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Act.* 1994; **228**: 35-51.

Tableau 41 : Gamme de dilution de l'échantillon à doser.

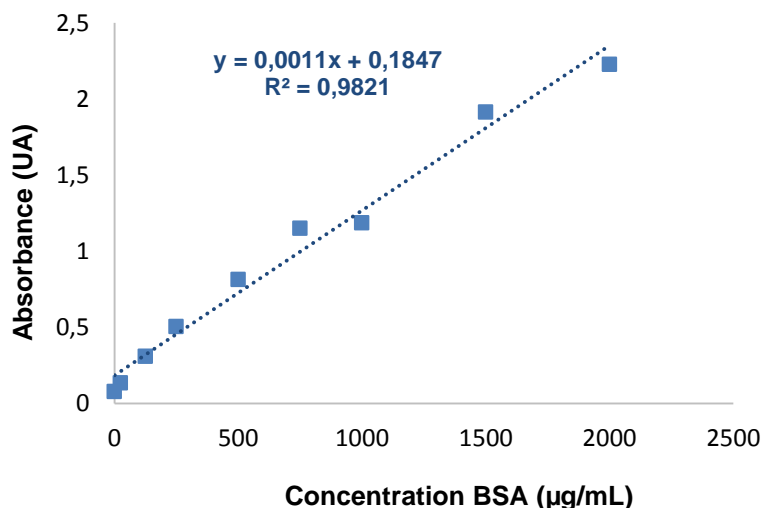
facteur 1/X	5	10	20
Volume (µL)	4	2	1
Volume Tampon hypotonique (µL)	16	18	19

II.4.2.3 Droite d'étalonnage et dosage de l'échantillon inconnu

Dans une plaque multi-puits, 20 µL de chaque échantillon préparé (BSA et échantillon à doser) sont ajoutés ainsi que 200 µL du réactif de Bradford. La plaque est ensuite incubée à 37 °C pendant 30 minutes et l'absorbance est ensuite mesurée à l'aide de TECAN à 562 nm (Tableau 42). Les valeurs obtenues à partir des tubes de la gamme étalon permettent de tracer une gamme étalon (Figure 138).

Tableau 42 : Absorbance des différents échantillons de BSA.

Echantillon	A	B	C	D	E	F	G	H	I
BSA									
A (UA)	2,286	1,973	1,196	1,147	0,818	0,513	0,318	0,136	0,082
	2,170	1,855	1,178	1,155	0,812	0,498	0,302	0,135	0,073

**Figure 138 : Droite d'étalonnage de BSA pour le dosage protéique.**

II.4.3 Dosage de l'activité du complexe I

La cinétique de la réaction d'oxydation du NADH en NAD⁺ à 340 nm à 37 °C, a été suivie par spectrophotométrie. Pour cela, les mitochondries préalablement réparties en plusieurs

aliquotes congelées sont décongelées rapidement quelques minutes avant la manipulation. Les réactifs sont introduits dans l'ordre suivant la procédure ci-dessous (Tableau 43).

Tableau 43 : Procédure pour le dosage de l'activité du complexe I.

réactifs	volume à introduire
Tampon hypotonique	900 μ L
Mitochondries	Dépend du dosage protéique ^a
Attendre 2 minutes	
BSA (17,5 mg/mL) + Tampon	100 μ L
Décyubiquinone (10 mM)	10 μ L
Faire l'auto zéro	
Composé à tester ^b (100 mM)	10 μ L
KCN (10 mM)	10 μ L
NADH, H ⁺ (6,3mM)	25 μ L

a : attention prendre en compte les dilutions et trouver le volume pour 100 μ g. b : soit une concentration finale de composé à tester dans la cuve de 1 mM. Pour la mesure du témoin positif, ajouter 10 μ L de DMSO et/ou PBS au lieu du composé à tester et pour la mesure du témoin négatif, ajouter 10 μ L de roténone (2 mM).

II.4.4 Dosage de l'activité des complexes I à III

La cinétique de la réaction de réduction du cytochrome c oxydé à 550 nm à 37 °C, a été suivie par spectrophotométrie. Pour cela, les mitochondries préalablement réparties en plusieurs aliquotes congelées sont décongelées rapidement quelques minutes avant la manipulation. Les réactifs sont introduits dans l'ordre suivant la procédure ci-dessous (Tableau 44).

Tableau 44 : Procédure pour le dosage de l'activité des complexes I à III.

Cuve référence	Cuve de mesure
Faire l'auto zéro	
Cytochrome C (10 µL)	Cytochrome C (10 µL)
KCN (10 µL)	KCN (10 µL)
Mitochondrie (25 µL) ^a	Mitochondrie (25 µL) ^a
Tampon hypotonique (230 µL)	Tampon hypotonique (200 µL)
Roténone (10 µL)	Composé à tester (10 µL) ^b
Tampon hypotonique (230 µL)	Tampon hypotonique (230 µL)
Attendre 2 minutes	
NADH, H ⁺ (10 µL)	NADH, H ⁺ (10 µL)

a : dépend du dosage protéique, volume pour avoir 100 µg de mitochondries. b : solution à 100 mM du composé à tester, soit une concentration finale dans la cuve de 1 mM. Pour la mesure du témoin positif, ajouter 10 µL de DMSO et/ou PBS au lieu du composé à tester. Pour la mesure du témoin négatif, ajouter 10 µL de roténone (2 mM).

Un composé de type *N*-aryle pyridinium (PF) a montré un réel potentiel en tant qu'inducteur chimique de la maladie de Parkinson (MP). Son administration *in vitro* et *in vivo* a permis d'induire l'apparition des marqueurs cellulaires caractéristiques de la MP mais suivant une cinétique d'action beaucoup plus lente que les inducteurs parkinsoniens actuellement disponibles. Ces travaux préliminaires ont suggéré l'existence d'un lien entre le motif *N*-aryle pyridinium et la capacité pour la molécule qui le porte à induire chimiquement la MP. Ces résultats ont dès lors laissé envisager la préparation de composés structurellement inspirés, capables de mimer plus fidèlement les mécanismes biochimiques impliqués lors de l'apparition de la MP.

Partant du même composé de départ – un dérivé de l'aniline – deux voies de synthèse ont été suivies et ont permis d'aboutir à des *N*-aryle pyridiniums diversement fonctionnalisés. La première voie d'accès, exploitant la réaction de Zincke, a permis d'aboutir à des composés ne portant pas de groupement hydroxyle sur le noyau pyridinium. La deuxième voie d'accès, comprenant une étape-clé d'activation anodique et inspirée de la préparation du PF, a permis d'aboutir à des *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés. Pour ces deux voies de synthèse, la nature du composé de départ a contraint à la modification des protocoles opératoires décrits dans la littérature afin de pouvoir accéder aux molécules ciblées.

L'évaluation toxicologique de ces *N*-aryle pyridiniums a donné lieu à une étude de relation structure/activité. Les résultats de cette étude ont permis d'identifier les éléments structuraux permettant à la fois l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'induction d'une neurotoxicité *in vitro*. Il a également été possible d'identifier, pour la première fois, un paramètre permettant la modulation de la pénétration cellulaire dopaminergique et par suite, de l'activité de ces inducteurs chimiques de la MP.

Mots-Clés : maladie de Parkinson, inducteurs chimiques, *N*-aryle pyridiniums, relation structure/activité

N-aryl pyridinium derivative (PF) has shown promising results as a chemical inducer of Parkinson's disease (PD). Its *in vitro* and *in vivo* administration has induced the appearance of characteristic cellular markers of PD but following a much slower kinetics than currently available PD inducers. These preliminary studies have suggested the existence of a link between the *N*-aryl pyridinium moiety and the ability of the molecule bearing it to chemically induce PD. These results have therefore led to the preparation of structurally related compounds, able to mimic more closely the biochemical mechanisms involved in the onset of PD.

Using the same starting material - an aniline derivative - two synthetic pathways have been followed and have led to diversely functionalized *N*-aryl pyridiniums. The first pathway, based on the Zincke reaction, afforded compounds without hydroxyl group on the pyridinium ring. The second pathway, including a key step of anodic activation and inspired the preparation of PF, led to 3-hydroxy-*N*-aryl pyridiniums. For both synthetic routes, the nature of the starting material has implied the modification of previously described protocols to gain access to the targeted molecules.

The toxicological evaluation of these *N*-aryl pyridiniums gave rise to a structure / activity relationship study. The results of this study have led to the identification of structural elements allowing both the inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain and the induction of *in vitro* neurotoxicity. It was also possible to identify for the first time, a parameter for the modulation of dopaminergic cell penetration and hence the activity of these chemical inducers of PD.

Keywords: Parkinson disease, chemical inducers, *N*-aryl pyridiniums, structure/activity relationship

Résumé

Un composé de type *N*-aryle pyridinium (PF) a montré un réel potentiel en tant qu'inducteur chimique de la maladie de Parkinson (MP). Son administration *in vitro* et *in vivo* a permis d'induire l'apparition des marqueurs cellulaires caractéristiques de la MP mais suivant une cinétique d'action beaucoup plus lente que les inducteurs parkinsoniens actuellement disponibles. Ces travaux préliminaires ont suggéré l'existence d'un lien entre le motif *N*-aryle pyridinium et la capacité pour la molécule qui le porte à induire chimiquement la MP. Ces résultats ont dès lors laissé envisager la préparation de composés structurellement inspirés, capables de mimer plus fidèlement les mécanismes biochimiques impliqués lors de l'apparition de la MP.

Partant du même composé de départ – un dérivé de l'aniline – deux voies de synthèse ont été suivies et ont permis d'aboutir à des *N*-aryle pyridiniums diversement fonctionnalisés. La première voie d'accès, exploitant la réaction de Zincke, a permis d'aboutir à des composés ne portant pas de groupement hydroxyle sur le noyau pyridinium. La deuxième voie d'accès, comprenant une étape-clé d'activation anodique et inspirée de la préparation du PF, a permis d'aboutir à des *N*-aryle pyridiniums 3-hydroxylés. Pour ces deux voies de synthèse, la nature du composé de départ a contraint à la modification des protocoles opératoires décrits dans la littérature afin de pouvoir accéder aux molécules ciblées.

L'évaluation toxicologique de ces *N*-aryle pyridiniums a donné lieu à une étude de relation structure/activité. Les résultats de cette étude ont permis d'identifier les éléments structuraux permettant à la fois l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'induction d'une neurotoxicité *in vitro*. Il a également été possible d'identifier, pour la première fois, un paramètre permettant la modulation de la pénétration cellulaire dopaminergique et par suite, de l'activité de ces inducteurs chimiques de la MP.

Mots-Clés : maladie de Parkinson, inducteurs chimiques, *N*-aryle pyridiniums, relation structure/activité