



HAL
open science

Conception et synthèse de molécules à visée anti-infectieuse selon deux stratégies : le criblage à haut débit et l'approche par fragments

Hugues Prevet

► **To cite this version:**

Hugues Prevet. Conception et synthèse de molécules à visée anti-infectieuse selon deux stratégies : le criblage à haut débit et l'approche par fragments. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S037 . tel-01553411

HAL Id: tel-01553411

<https://theses.hal.science/tel-01553411>

Submitted on 3 Jul 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.

UNIVERSITE DE LILLE 2 – U.F.R. DE PHARMACIE

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Sciences du médicament

Présentée et soutenue publiquement par

Hugues Prevet

Le 30 Septembre 2016

Conception et synthèse de molécules à visée anti-infectieuse selon deux stratégies : le criblage à haut débit et l'approche par fragments.

Jury

Pr. Christophe Rochais	Université de Caen	Rapporteur
Pr. Sylvain Routier	Université d'Orléans	Rapporteur
Dr. Brigitte Lesur	Laboratoires Servier	Examineur
Pr. Benoît Déprez	Université de Lille 2	Examineur
Dr. Marion Flipot	Université de Lille 2	Directrice de thèse
Pr. Nicolas Willand	Université de Lille 2	Co-directeur de thèse

Laboratoire *Médicaments et Molécules pour Agir sur les Systèmes Vivants*
INSERM U1177 – Institut Pasteur de Lille – Université de Lille 2
Faculté de Pharmacie de Lille, 3 rue du Professeur Laguesse B.P. 83 59006 LILLE Cedex

A la mémoire de ma Grand-Mère et de mon Grand-Père
M^{me} Marie-Thérèse PREVET & M^r Jacques PREVET

Remerciements

Messieurs Christophe Rochais et Sylvain Routier

Je suis très honoré de l'intérêt que vous portez à ces travaux en acceptant d'en être les rapporteurs. Veuillez recevoir toute ma gratitude.

Madame Brigitte Lesur

Vous me faites l'honneur de juger ce travail et d'apporter votre vision industrielle à ce jury de thèse. Je vous en suis sincèrement reconnaissant.

Monsieur Benoît Déprez

Tout d'abord merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Merci aussi et surtout de m'avoir accueilli au sein de votre unité ainsi que de la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ces travaux de recherche.

Monsieur Nicolas Willand

Je vous sais gré de votre encadrement tout au long de ces travaux de recherche. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Mademoiselle Marion Flipo

Je vous exprime aussi toute ma gratitude pour l'encadrement et le soutien que m'avez apportés tout au long de ces années. Merci d'avoir accepté de juger cette thèse.

Cette thèse dont la rédaction s'achève, est le fruit de plusieurs collaborations et rencontres. De nombreuses personnes sont, en effet, associées à mes travaux et ont pu me faire bénéficier de leurs conseils, leurs visions extérieures et critiques ainsi que de leur soutien.

C'est pourquoi je souhaiterais, en premier lieu, remercier le directeur de l'unité U1177, Monsieur Benoît Déprez, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire il y a de ça un peu plus de 3 ans. Merci pour toute la connaissance scientifique que vous avez pu me transmettre lors de nos discussions au sein du laboratoire ainsi qu'à l'extérieur. Merci également pour vos précieux conseils dans ces moments de recherche d'après-thèse.

Je souhaite remercier tout particulièrement mes directeurs de thèse, Marion Flipo et Nicolas Willand sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir fait arrivé là où j'en suis aujourd'hui. Merci Marion d'avoir cru en moi et de m'avoir offert la possibilité de poursuivre en thèse lors de mes travaux de Master. Je te suis infiniment reconnaissant pour tout le temps que tu m'as consacré tout au long de ces années (et encore plus pendant ces derniers mois de rédaction). En plus de tes précieux conseils scientifiques, ton soutien, ta joie, ta disponibilité ainsi que ta sympathie ont été fortement appréciables durant cette thèse et encore plus dans les moments compliqués. Tu t'es transformée en incubateur d'idées. Ça a été un réel privilège pour moi que de pouvoir évoluer, tant scientifiquement qu'humainement, à tes côtés. J'espère pouvoir discuter avec toi sciences (malgré mon niveau ;)) et pas que pendant encore de nombreuses années. Je me répète mais, MERCI !!!

Un immense merci à Nicolas pour tous les conseils avisés que j'ai pu recevoir en travaillant à tes côtés ainsi que pour le regard critique que tu as porté sur ces travaux. Merci pour tout le temps que tu m'as consacré tant sur le plan de la rédaction que sur les nombreuses répétitions orales que l'on a partagées. La sérénité naturelle que tu dégages a été un véritable allié pour moi durant cette thèse et je t'en suis profondément reconnaissant. En fait, tu as été mon alambic à culture scientifique. Et enfin, *de façon très intéressante*, je te suis reconnaissant de m'avoir fait découvrir le monde moderne ;).

A Catherine Piveteau, merci pour ta grande gentillesse, ta disponibilité et ton soutien sans faille. Ton aide lors de mes mesures de solubilité et de mes HRMS, entre autre, a été précieuse. Et forcément, un immense merci pour toute l'énergie que tu dépenses à faire en sorte que les instruments LC/MS fonctionnent à merveille. Et surtout les petits chocolats lors de ma période de rédaction ont été un dopant naturel mais extrêmement efficace.

A Julie Charton, ma tutrice pédagogique comme il est coutume de dire, merci pour ta bonne humeur au quotidien, ton enthousiasme ainsi que les conseils que tu m'as prodigué depuis le début.

A Terence Beghyn, un merci tout particulier pour m'avoir initié au monde de l'HPLC préparative. Merci de m'avoir transmis tes connaissances concernant le fonctionnement de la prep' et merci pour les conseils que tu as su distiller tout au long de mes travaux de recherche.

A Jean-Claude Gesquière, merci pour les échanges constructifs que l'on a pu avoir depuis mon arrivée au sein du laboratoire.

J'aimerais apporter une attention particulière au nouveau maître de conf^o, j'ai nommé Monsieur Baptiste Villemagne (et non je ne ferai pas la faute ;)). Un sincère merci pour l'aide précieuse que tu m'as adressé dès ton arrivée. Ces presque 2 ans de partage de paillasse ont été extrêmement bénéfiques pour moi tant scientifiquement que personnellement. Je te remercie aussi pour le temps que tu m'as consacré dans ma préparation d'après-thèse ainsi que pour ta patience et ta disponibilité. Si je n'ai

qu'un seul regret c'est justement de ne t'avoir côtoyé que si tardivement et de ne pas avoir partagé de tels moments plus tôt.

A Cyril Couturier, je te suis très reconnaissant de m'avoir accueilli pendant une semaine passée à l'Institut Pasteur dès mon arrivée en M2. Cela a été très formateur pour que je puisse appréhender au mieux la problématique de l'hépatite C et les tests biologiques appropriés.

A Marilyne Bourotte, ma co-responsable de la prep'. Merci d'avoir partagé ces moments de galère lorsqu'elle ne fonctionnait pas. Merci pour ton humeur égale. Merci aussi pour ton aide lors de la préparation des tests biologiques. Et ne t'en fais pas, je m'occupe des tubes RMN d'ici peu.

A Catalin Pintiala, mon collègue de bureau, merci pour ces moments d'échanges et de discussions. Merci également pour ta bonne humeur permanente.

A Ronan Gealageas, merci pour le temps que tu as consacré à corriger mon anglais et mes erreurs de prononciation. Un merci particulier pour le regard attentif que tu as su porter sur ma partie expérimentale.

A Carole Desruelles mais aussi et surtout à Nathalie Dekeyne, je vous remercie sincèrement pour le soutien administratif que vous m'avez adressé depuis mon arrivée. Merci Nathalie pour ta patience, ton écoute et ton aide.

A mes anciens et présents co-thésards : Antoine Henninot, Chau Tran, Gonzague Berthe, Manuel Lasalle, Paul Hermant, Vanessa Hoguet, Marion Prieri et Béatrice Colin. Pour les actuels (Paul, Vanessa, Marion et Béatrice), je vous souhaite plein de courage mais comme vous le savez déjà, vous êtes au sein d'une excellente unité et je me fais aucun souci pour vous.

A Antoine Henninot, je te remercie profondément pour le temps que tu as passé avec moi pour m'expliquer le fonctionnement de l'HPLC préparative ainsi que de m'avoir inculqué la méthode à adopter pour envisager une purification. Un immense merci à toi et à ta petite famille pour votre accueil aux Etats-Unis et d'avoir fait de ce séjour un moment inoubliable. J'espère te retrouver un de ces quatre afin de savourer une succulente *margarita* tout en discutant science.

A Manuel Lasalle, un immense merci d'avoir été là lorsque j'en avais besoin. Que de chemin parcouru ensemble et sache que ton soutien a été d'une aide cruciale. J'espère que tu as apprécié notre *road trip* américain autant que moi. Ce sont des moments mémorables, et merci pour tout ça.

A Paul Hermant, merci pour tous les fous rires que l'on a pu partager. Je vais peut-être t'apprendre quelque chose, mais sache que la Saint Hugues ça a été le 1^{er} avril cette année, mais il est fort probable que ce soit également le 1^{er} avril de l'année prochaine et peut-être même celui de l'année d'après..... Merci mon gars Paul.

A l'ensemble des membres passés et actuels de l'unité U1177 : Sylvain Picon, Aurélia Dinut, Damien Bosc, Nicolas Probst, Tristan Verdelet, Camille Moreau, Laure Saas, Geoffroy Dequirez, Keguang Cheng, Jouda Jakhal, Adrien Herdelan, Cyril Ronco, Julie Dumont, Rébecca Déprez, Florence Leroux, Asahi Kawana, Rajaa Boulahjar, Arthur Pinto, Sandrine Dassonneville, Arnaud Matthieu, Aurélie Beghin, Ingrid Ciliberti, Valérie Landry, Xavier Maréchal, Alexandre Biela je vous remercie d'avoir fait de nos différentes rencontres des moments privilégiés.

J'adresse également un merci aux stagiaires ayant contribué à ces travaux ou non, que j'ai pu côtoyer : Matthieu, Valentin, Guillaume, Hélène, Nina, Léa, Tiphaine, Robert, Eva, Kevin, Matthieu.

Je remercie très chaleureusement l'ensemble de l'équipe du service commun de RMN, Nathalie Azaroual, Pierre, Vincent, Alexandre et Jérôme, pour leur aide, leur soutien et leur grande disponibilité.

J'adresse un remerciement à Nicolas Renault, en charge du criblage virtuel. Merci pour ton investissement et pour les nombreuses réponses que tu as su apporter à toutes mes questions.

J'aimerais adresser une attention particulière au groupe Stockholm (initialement connu sous le nom de Chicken Street) et plus particulièrement à quatre types formidables : Kiki (chanteur hors-norme mais en léger surpoids, au passage encore désolé pour ton orteil), Romain (la guitare est pour lui ce qu'un ballon de foot est pour Zidane), Simon (batter fou comme il en existe plus beaucoup aujourd'hui) et Paul (bassiste légèrement au-dessus de la moyenne et conseiller en mode à ses heures perdues). Merci pour ces moments intenses que vous m'avez fait vivre et en espérant qu'il y en aura encore beaucoup d'autres. Un merci également aux compagnes de ces artistes, j'ai nommé Marine, MA et Charlotte. Bien évidemment, ces remerciements s'adressent également à Maxime (allez le SCO), Perrine, Flo, Louis, Miss (Virgi) & Mister (Jerem) Boivin. Kiss Love à Johny et aux Stan Smith !

Un immense merci à ma belle-famille, et plus particulièrement à mon beau-papa, Didi (surnommé le Grand Siou dans ma tribu). Merci pour tout ce que j'ai pu vivre avec vous et tout ce que vous m'avez fait découvrir. Merci pour tout !

Je remercie vivement toute ma famille qui m'a soutenu durant toutes ces années d'études. Sachez que cet accomplissement est aussi le vôtre puisque sans vous je ne serai pas ici: merci Maman, merci Papa et merci à ma sœur. Un immense merci à ma Mamie et à mon Papy pour leur soutien inconditionnel. A vous tous, je vous serai toujours reconnaissant de tout ce que vous avez fait pour moi. MERCI !

Je tiens à témoigner une reconnaissance particulière à mon fidèle ami, Mathieu (dit ma petite). Merci pour ton soutien, ta vive amitié, ta justesse et ta sincérité. Que de beaux souvenirs passés avec toi, entre une visite de Budapest, où le froid rugueux nous a fait dérapier (un peu pour moi et beaucoup pour toi..... enfin je ne sais plus l'ordre), une virée express dans les Landes, où nous avons affronté des rouleaux tonitrueux et surpuissants, en passant bien sûr par l'attaque de la fameuse araignée géante (mon mur d'appartement s'en souvient encore). Tout ça pour dire que je te suis sincèrement reconnaissant.

Enfin, je remercie tout particulièrement ma compagne, Camille, sans qui, tout cela aura été insurmontable. Merci de m'avoir supporté durant ces années (et plus particulièrement pendant ces derniers mois qui n'ont pas été faciles j'en suis sûr, désolé), de m'avoir apporté le second souffle dont j'avais besoin pour passer un palier supplémentaire, de m'avoir encouragé et d'avoir cru en moi alors que je doutais. Tout au long de cette expérience et bien plus encore, tu as été comme une drogue pour moi dont je ne veux pas me passer. Je suis profondément admiratif et touché pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci du fond du cœur, ma bouteille d'oxygène qui m'a évité la narcose.

Liste des publications et des communications

Publication :

Hugues Prevet, Marion Flipo, Pascal Roussel, Benoit Deprez, Nicolas Willand. "Microwave-assisted synthesis of functionalized spirohydantoins as 3-D privileged fragments for scouting the chemical space" *Tetrahedron Letters*, **2016**, 57 (26), 2888-2894.

Communications orales :

Hugues Prevet, Marion Flipo, Baptiste Villemagne, Asahi Kawana, Nicolas Renault, Benoit Deprez and Nicolas Willand. "New 3D-scaffolds for Fragment-based Lead Discovery (FBLD): exploration of chemical space using highly functionalized spirohydantoins."

3rd Young Medicinal Chemist Symposium of European Federation for Medicinal Chemistry (YMCS-EFMC), Manchester, UK, 1st – 2nd September, **2016**.

Invited.

Hugues Prevet, Marion Flipo, Oliver Sperandio, Benoit Deprez and Nicolas Willand. "New 3D-scaffolds for Fragment-based Lead Discovery (FBLD): exploration of chemical space using highly functionalized spirohydantoins. "

23rd Young Research Fellow Meeting of French Medicinal Chemistry Society (YRFM-SCT), Lille, France, 15th – 17th February, **2016**.

Best oral communication award.

Hugues Prevet, Marion Flipo, Benoit Deprez and Nicolas Willand. "Original & Novel 3-D fragments for fragment-based drug discovery (FDBB) approaches. "

One-day meeting on Medicinal Chemistry, F3-Meeting, Ghent, Belgium, 24th March, **2015**.

Communications par affiche :

Hugues Prevet, Marion Flipo, Oliver Sperandio, Benoit Deprez and Nicolas Willand. "High functionalized spirohydantoins as 3-dimensional fragment templates for fragment screening. "

251st American Chemical Society National Meeting & Exposition (ACS), San Diego, CA, USA, 13th – 17th March, **2016**.

Hugues Prevet, Marion Flipo, Benoit Deprez and Nicolas Willand. “Design and synthesis of new spirohydantoin scaffolds as fragment templates to the 3-D chemical space. ”

2nd Young Medicinal Chemist Symposium of European Federation for Medicinal Chemistry (YMCS-EFMC), Antwerp, Belgium, 17th September, **2015**.

Hugues Prevet, Marion Flipo, Benoit Deprez and Nicolas Willand. “Design and synthesis of new spirohydantoin scaffolds as fragment templates to the 3-D chemical space. ”

15th Journée André Verbert, Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, France, 16th September, **2015**.

Hugues Prevet, Marion Flipo, Benoit Deprez and Nicolas Willand. “Design and synthesis of C-spiranic hydantoin scaffold as 3-D fragment for fragment-based drug discovery (FBDD) approaches. ”

22nd Young Research Fellow Meeting of French Medicinal Chemistry Society (YRFM-SCT), Romainville, France, 4th – 6th February, **2015**.

Hugues Prevet, Marion Flipo, Laure Saas, Laurence Cocquerel, Jean Dubuisson, Nicolas Willand, Cyril Couturier, and Benoit Deprez. “Discovery and Synthesis of modulators of the CD81/CLDN-1 complex as a new approach to prevent entry of the hepatitis C virus. ”

14th Journée André Verbert, Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, France, 11th September, **2014**.

Hugues Prevet, Marion Flipo, Laure Saas, Laurence Cocquerel, Jean Dubuisson, Nicolas Willand, Cyril Couturier, and Benoit Deprez. “Discovery and Synthesis of modulators of the CD81/CLDN-1 complex as a new approach to prevent entry of the hepatitis C virus. ”

50th International Conference on Medicinal Chemistry (RICT Interfacing Chemical Biology and Drug Discovery), Rouen, France, 2nd – 4th July, **2014**.

Hugues Prevet, Marion Flipo, Laure Saas, Laurence Cocquerel, Jean Dubuisson, Nicolas Willand, Cyril Couturier, and Benoit Deprez. “Discovery and Synthesis of modulators of the CD81/CLDN-1 complex as a new approach to prevent entry of the hepatitis C virus. ”

21st Young Research Fellow Meeting of French Medicinal Chemistry Society (YRFM-SCT), Montpellier, France, 23th – 25th March, **2014**.

Best flash poster communication award.

Avant-propos

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de l'équipe mixte de recherche U1177 (Inserm, Université de Lille 2, Institut Pasteur de Lille), *Médicaments et Molécules pour Agir sur les Systèmes Vivants*, dirigée par le Professeur Benoît Déprez.

Les évaluations biologiques présentées dans le premier chapitre ont été mises au point et réalisées au laboratoire par le Docteur Cyril Couturier ainsi que l'ingénieure Laure Saas. Par ailleurs, ce projet a été mené en collaboration avec les membres de l'équipe du Docteur Jean Dubuisson du centre d'infection et d'immunité de Lille (Inserm U1019, CNRS UMR8204).

Les structures radio-cristallographiques présentées dans le second chapitre ont été déterminées par le Docteur Pascal Roussel, membre de l'*Unité de Catalyse et de Chimie du Solide* (UCCS, CNRS UMR 8181). Le criblage *in silico* sur la protéine MDM2 a été réalisé par le Docteur Nicolas Renault, membre de l'équipe "Therapeutic innovation targetting inflammation" (LIRIC UMR U995 – Inserm, Université Lille 2, CHRU de Lille).

L'évaluation biologique des ligands d'EthR₂ présentés dans le dernier chapitre a été réalisée par l'équipe du Docteur Alain Baulard au centre d'infection et d'immunité de Lille (Inserm U1019, CNRS UMR8204). L'affinité des molécules pour la protéine EthR₂ a été déterminée par le Docteur Martin Moune et les tests sur bactéries ont été réalisés par le Docteur Rosangela Frita. Par ailleurs, la capacité des molécules à empêcher la fixation d'EthR₂ à l'ADN a été déterminée par le Docteur Christian Kemmer de la société BioVersys (Bâle, Suisse). Enfin, la cristallographie de la protéine EthR₂ a été réalisée par le Docteur Alexandre Wohlkonig (VIB Structural Biology Research Center, Bruxelles) et le Docteur René Wintjens (Université Libre de Bruxelles).

Toutes les expériences RMN ont été effectuées à la Faculté de pharmacie de Lille au *Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire* (LARMN) dirigé par le Professeur Nathalie Azaroual.

Résumé

La découverte d'un candidat médicament repose sur l'identification de hits, présentant des propriétés physico-chimiques adéquates pour leur optimisation. Le criblage à haut débit et l'approche par fragments sont deux techniques couramment utilisées lors de cette étape d'identification et elles ont été mises en œuvre au cours de ma thèse dans le but de découvrir de nouveaux composés ciblant d'une part le complexe CD81/CLDN-1 pour empêcher l'entrée du virus de l'hépatite C (VHC) dans les hépatocytes et d'autre part EthR₂, un régulateur transcriptionnel mycobactérien, afin de potentialiser l'activité d'un antituberculeux sur les souches résistantes de *M. tuberculosis*.

Dans une première partie, un criblage à haut débit sur le complexe CD81/CLDN-1 a permis d'identifier des modulateurs en série thiéno[2,3-c]pyrazole. Ces composés ont été pharmacomodulés et un composé spécifique de l'étape d'entrée du VHC, non toxique et présentant une activité submicromolaire a pu être ainsi identifié. Cette sonde pharmacologique permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le processus d'entrée virale.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à la conception de nouveaux fragments dits privilégiés. Ainsi, le développement des voies de synthèse, sous irradiation micro-onde, de deux entités moléculaires, le noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et le noyau spirohydantoïne, nous a permis d'obtenir 34 composés originaux. Afin d'évaluer le potentiel de cette stratégie, une librairie virtuelle de fragments a été générée et son criblage *in silico* sur la protéine MDM2 a été effectué. La mesure *in vitro* de l'activité des hits identifiés permettra de valider l'intérêt de cette approche pour la découverte de nouveaux ligands ciblant les interactions protéine-protéine.

Dans une troisième partie, des inhibiteurs d'un répresseur transcriptionnel mycobactérien impliqué dans la potentialisation de l'activité de l'éthionamide ont été développés. A l'issue d'un criblage de 960 fragments, l'identification d'un hit en série tropinone, et sa cocrystallisation avec la protéine EthR₂, a permis d'entamer une optimisation rationnelle qui a conduit à l'obtention rapide de composés présentant de meilleures activités.

MOTS CLÉS : virus de l'hépatite C, CD81, Claudine-1, inhibiteurs, hépatocytes, HTS, fragments privilégiés, 3D, FBDD, chimiothèque, tuberculose, éthionamide, EthR₂, potentialisation.

Abstract

Design and synthesis of anti-infectious molecules using two different strategies: high throughput screening and fragment-based drug discovery approaches.

The discovery of drug candidates is based on the identification of hits with appropriated physico-chemical properties for further development. High throughput screening and fragment-based drug discovery approaches are two strategies commonly used for this identification. These strategies were applied during my PhD research work for identifying not only new modulators of the CD81/CLDN-1 complex to prevent entry of the Hepatitis C virus (HCV) into hepatocytes but also inhibitors of the mycobacterial transcriptional repressor, called EthR₂, to boost ethionamide antibacterial activity against resistant strains of *M. tuberculosis*.

Firstly, a high throughput screening assay was developed to identify molecules bearing a thieno[2,3-c]pyrazole scaffold that modulate the CD81/CLDN-1 complex. The structure-activity relationships allowed us to design and synthesize one non-toxic compound that inhibits viral entry with an IC₅₀ in the submicromolar range. This best analog will be used as pharmacological tool to understand the molecular mechanism involving the CD81/CLDN-1 interaction during virus entry.

Secondary, we worked on the design and synthesis of a new generation of fragments called privileged fragments. We focused our interest on the 1,4-benzodiazepine-2,5-dione and spirohydantoin scaffolds and using microwave-assisted conditions 44 original privileged fragments have been synthesized. To further illustrate the potential of our privileged fragments, a virtual focused library has been generated and screened *in silico* on MDM2 protein. The *in vitro* evaluation of the identified hits will allow us to validate our approach and to show the potential of our privileged fragments for the discovery of new hits against protein-protein interactions.

Finally, inhibitors of a new mycobacterial transcriptional repressor involved in the boosting of ethionamide activity have been developed. Screening of 960 fragments allowed us to identify a hit bearing a tropinone scaffold which was cocrystallized with EthR₂. A rational design from this cocrystal structure led rapidly to more potent ligands.

KEY WORDS: hepatitis C virus, CD81, Claudin-1, inhibitors, hepatocytes, HTS, privileged fragments, 3D, FBDD, chemical library, tuberculosis, ethionamide, EthR₂, boosting.

Sommaire

Sommaire

Remerciements	3
Liste des publications et des communications	7
Avant-propos	9
Résumé	11
Abstract	12
Sommaire	13
Abréviations	21
Introduction Générale	25
Chapitre I – Développement d’inhibiteurs de l’entrée du virus de l’hépatite C : découverte et synthèse de modulateurs de l’interaction CD81/CLDN-1	29
Introduction	31
I. Description de la pathologie et des traitements actuels	31
I.1. L’infection par le virus de l’hépatite C et son épidémiologie	32
I.1.1. <i>Prévalence à travers le monde et modes de transmission du virus</i>	32
I.1.2. <i>Evolution de la maladie et diagnostic de l’infection</i>	33
I.2. Variabilité génétique du VHC	34
I.3. Le virus de l’hépatite C et son cycle viral	35
I.3.1. <i>Le virus de l’hépatite C (VHC)</i>	35
I.3.2. <i>Cycle viral du VHC</i>	37
I.4. L’évolution des traitements contre le VHC de 1970 à aujourd’hui.....	38
I.4.1. <i>De 1970 jusqu’à 2011 : découverte et développement de la bithérapie associant l’interféron alpha pégylé à la ribavirine (INF-α-PEG/RBV)</i>	38
I.4.2. <i>De 2011 à maintenant : mise sur le marché d’antiviraux à action directe (DAAs) et développement de nouvelles thérapies</i>	39
II. Empêcher l’entrée du virus dans les hépatocytes : une nouvelle stratégie antivirale	43
II.1. Mécanisme de l’entrée du virus dans les hépatocytes et implication du complexe CD81/CLDN-1	44
II.1.1. <i>Mécanisme d’entrée du VHC dans les hépatocytes</i>	44
II.1.2. <i>HTAs spécifiques de l’entrée virales actuellement en développement</i>	47
II.2. Utilisation de la technologie de BRET pour le criblage d’une chimiothèque généraliste sur le complexe CD81/CLDN-1.....	48
II.2.1. <i>Principe de la technologie de BRET et adaptation pour l’étude du complexe CD81/CLDN-1</i>	48
II.2.2. <i>Propriétés physico-chimiques des 14400 molécules</i>	49
II.2.3. <i>Criblage d’une chimiothèque généraliste sur le complexe CD81/CLDN-1</i>	50

II.3. Identification de modulateurs du complexe CD81/CLDN-1 et validation d'une famille d'inhibiteurs de l'entrée virale	51
II.3.1. Modèles d'études expérimentaux pour évaluer l'entrée du VHC dans les hépatocytes	51
II.3.2. Identification d'une famille de modulateurs du complexe CD81/CLDN-1 capables d'inhiber l'entrée du VHC dans les hépatocytes	53
III. Relations structure-activité en série thiéno-pyrazole	54
III.1. Importance du noyau 3-phenylthiéno[2,3-c]pyrazole	55
III.1.1. Analogues envisagés.....	55
III.1.2. Synthèses des composés 13 à 26	55
III.1.3. Résultats et discussion.....	57
III.2. Modification du substituant en position 3 du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole	58
III.2.1. Analogues envisagés.....	58
III.2.2. Rétro-synthèse et synthèses envisagées pour l'obtention des analogues en série thiéno-pyrazole	59
III.2.2.1. Rétro-synthèse envisagée	59
III.2.2.2. Synthèse des intermédiaires thiéno-pyrazole présentant une fonction acide carboxylique à partir des β-cétoesters commercialement disponibles.....	59
III.2.2.3. Formation des dérivés N-[3-(4-benzylpipérazin-1-yl)propyl]-amide et N-[3-(3,5-diméthyl-1-pipéridyl)propyl]-amide à partir des acides carboxyliques 57 à 66	66
III.2.3. Résultats et discussion.....	69
III.2.4. Conclusion.....	72
III.3. Modification du substituant en position 5 du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole	72
III.3.1. Modification du groupement 3-(4-benzylpipérazin-1-yl)propan-1-amine du composé 1	72
III.3.1.1. Analogues envisagés	72
III.3.1.2. Synthèse des composés 95 à 105	73
III.3.1.3. Résultats et discussion.....	74
III.3.2. Modulation de la chaîne aliphatique carbonée	75
III.3.2.1. Stratégie de synthèse	75
III.3.2.2. Synthèse des analogues 110 à 112	75
III.3.2.3. Résultats et discussion.....	77
III.3.3. Conclusion.....	79
III.3.4. Modification autour du groupement benzylpipérazine.....	79
III.3.4.1. Analogues envisagés	79
III.3.4.2. Synthèses des composés 116 à 136	80
III.3.4.3. Résultats et discussion.....	82
Conclusion.....	85

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique.....	87
Introduction	89
I. L'utilisation de fragments pour la découverte de molécules biologiquement actives	89
I.1. Principe de l'approche par fragments	90
I.1.1. Naissance de l'approche par fragments	90
I.1.2. Définition d'un fragment	91
I.1.3. Approche par fragments vs approche HTS.....	91
I.1.3. Les grandes étapes d'une approche par fragments	93
I.2. Principes pour concevoir une chimiothèque de fragments	95
I.2.1. Critères de sélection d'un fragment pour la conception d'une chimiothèque.....	95
I.2.2. Analyse des chimiothèques commerciales et de la chimiothèque de notre laboratoire	96
I.2.2.1. Analyses des chimiothèques commerciales.....	96
I.2.2.3. Analyse de la chimiothèque de fragments de notre laboratoire.....	98
I.3. Concept de fragments privilégiés	102
I.3.1. Cahier des charges du fragment privilégié	102
I.3.2. Intérêts des noyaux 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione	103
II. Conception de chimiothèques focalisées autour des noyaux 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione	104
II.1. Voies d'accès au noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et caractérisation de la chimiothèque focalisée.....	104
II.1.1. Voies d'accès existantes du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione	104
II.1.2. Synthèses développées pour conduire au noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione	108
II.1.2.1. Synthèse du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione dans le liquide ionique [bmim]BF ₄	108
II.1.2.1.1. Influence d'une irradiation micro-ondes par rapport à un chauffage thermique	108
II.1.2.1.2. Produits obtenus et rendements associés à partir de cette voie de synthèse dans le liquide ionique [bmim]BF ₄ par irradiation micro-ondes	108
II.1.2.1.3. N-monométhylation d' α -aminoacides cycliques.....	110
II.1.2.2. Synthèse du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione dans la pyridine anhydre	111
II.1.2.2.1. Influence du solvant dans des conditions d'irradiation micro-ondes	111
II.1.2.2.2. Influence du temps et de la température.....	111
II.1.2.2.3. Produits obtenus et rendements associés à partir de cette voie de synthèse dans la pyridine	113
II.1.2.2.4. Optimisation de conditions réactionnelles pour la synthèse du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione possédant un carbone spiranique en position 3	114

II.1.2.2.5.	Synthèse d'α-aminoesters cycliques.....	115
II.1.2.3.	Conclusion sur les stratégies développées pour synthétiser le noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione.....	117
II.1.3.	<i>Caractérisation de la chimiothèque focalisée autour du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione</i>	118
II.1.3.1	Propriétés physico-chimiques.....	118
II.2.	Voies d'accès au noyau spirohydantoïne et caractérisation de la chimiothèque focalisée ¹⁴⁴	120
II.2.1.	<i>Voies d'accès existantes du noyau spirohydantoïne</i>	120
II.2.2.	<i>Synthèses développées pour conduire au noyau 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione</i> 123	
II.2.2.1.	Influence de l'irradiation micro-ondes par rapport au chauffage thermique pour la synthèse du noyau 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione	123
II.2.2.2.	Influence du solvant dans des conditions d'irradiation micro-ondes	123
II.2.2.3.	Spirohydantoïnes synthétisées par irradiation micro-ondes	124
II.2.3.	<i>Caractérisation de la chimiothèque focalisée autour du noyau spirohydantoïne</i>	130
II.2.3.1.	Formes géométriques des 29 composés synthétisés	130
II.2.3.2.	Solubilité mesurée des 29 composés synthétisés.....	130
II.2.3.3.	Propriétés physico-chimiques des 29 composés synthétisés	132
II.3.	N-alkylation sélective du noyau spirohydantoïne	133
II.3.1.	<i>Stratégie de synthèse envisagée pour la N-alkylation sélective de l'hétérocycle hydantoïne</i>	133
II.3.2.	<i>Synthèses des spirohydantoïnes alkylées</i>	134
II.3.2.1.	Synthèse du composé 8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione substitué sur la position N3 par le groupement propargyle	134
II.3.2.2.	Synthèse du composé 8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione substitué sur la position N1 par le groupement propargyle	135
II.3.3.	<i>Exploration de l'espace chimique suite à une substitution sélective des atomes d'azote du noyau spirohydantoïne</i>	136
III.	Application aux interactions protéine-protéine : criblage <i>in silico</i> sur MDM2 d'une chimiothèque focalisée autour du noyau spirohydantoïne	138
III.1.	Rôle biologique et structure de l'interaction p53-MDM2	138
III.1.1.	<i>Implication de l'interaction p53-MDM2 dans le cancer</i>	138
III.1.2.	<i>Informations structurales sur le domaine de liaison de l'interaction p53-MDM2</i>	138
III.2.	Génération d'une chimiothèque virtuelle focalisée autour du noyau spirohydantoïne substitué en différentes positions par des agents alkylants commerciaux.....	140
III.2.1.	<i>Sélection des agents alkylants commercialement disponibles</i>	140
III.2.2.	<i>Synthèse de la chimiothèque virtuelle</i>	141
III.3.	Résultat du criblage <i>in silico</i>	143

III.3.1.	<i>Système d'étude pour le criblage in silico de MDM2</i>	143
III.3.2.	<i>Résultat du criblage in silico</i>	145
III.3.2.1.	Sélection basée sur la structure 2D des 17500 molécules	146
III.3.2.2.	Sélection basée sur les structures 3D des ligands et sur leur mode d'interaction avec la poche MDM2	148
III.3.2.3.	Affinement basée sur le mode de liaison <i>in silico</i> à MDM2 des 363 structures sélectionnées.....	148
Conclusion		152
Chapitre III – Application de l'approche par fragments : conception et synthèse d'inhibiteurs du répresseur transcriptionnel mycobactérien EthR₂ comme nouvelle approche pour traiter la tuberculose		153
Introduction		155
I. Description de la pathologie, traitements actuels et stratégie envisagée au laboratoire		156
I.1.	Présentation de la tuberculose	156
I.1.1.	<i>Données épidémiologiques</i> ¹⁶²	156
I.1.2.	<i>L'agent pathogène : Mycobacterium tuberculosis</i>	158
I.1.3.	<i>Transmission du bacille de Koch et développement de la tuberculose</i>	159
I.2.	Les traitements de première et seconde intentions	161
I.2.1.	<i>Traitement de première intention</i>	161
I.2.2.	<i>Traitements de seconde intention</i>	162
I.3.	L'approche par potentialisation de médicaments existants	164
I.3.1.	<i>Ethionamide : une prodrogue au centre de cette stratégie de potentialisation</i>	164
I.3.2.	<i>Développement d'inhibiteurs de la protéine EthR et preuve de concept de cette stratégie de potentialisation</i>	165
I.3.2.1.	Approche rationnelle basée sur la construction d'un pharmacophore.....	166
I.3.2.2.	Approche basée sur l'utilisation de fragments	167
II. Découverte d'un nouveau répresseur transcriptionnel		168
II.1.	EthR ₂ : une nouvelle cible pour lever la résistance à l'éthionamide	169
II.1.1.	<i>EthR₂/EthA₂ : une nouvelle voie éventuelle de bioactivation de l'éthionamide</i>	169
II.1.2.	<i>Intérêt du réveil des gènes ethR₂/ethA₂</i>	170
II.2.	Criblage d'une librairie de fragments par Thermal Shift Assay sur EthR ₂	171
II.2.1.	<i>Principe du Thermal Shift Assay (TSA)</i>	171
II.2.2.	<i>Criblage par TSA de la librairie de fragments sur EthR₂</i>	172
II.3.	Identification d'un hit et mode de liaison du composé à EthR ₂	172
II.3.1.	<i>Identification d'un hit capable d'empêcher la fixation d'EthR₂ à son l'opérateur ADN..</i>	172
II.3.2.	<i>Stratégies d'optimisation envisagées à partir de la structure cristallographique</i>	174
III. Optimisation du composé hit 198		175

III.1. Modifications autour du groupement 4-chlorophénéthyle	175
<i>III.1.1. Stratégie et analogues envisagés</i>	175
III.1.1.1. Synthèses des composés 198 à 208	175
III.1.1.2. Résultats et discussion	177
<i>III.1.2. Stratégie et analogues envisagés à partir des données cristallographiques</i>	179
III.1.2.1. Synthèses des composés 209 à 216	181
III.1.2.2. Résultats et discussion	181
<i>III.1.3. Analogues envisagés pour compléter les relations structure-activité</i>	182
III.1.3.1. Synthèses des analogues 217 à 224	183
III.1.3.2. Résultats et discussion	183
<i>III.1.4. Conclusion concernant les modifications autour du groupement 4-chlorophénéthyle</i>	184
III.2. Modifications du noyau tropinone.....	185
<i>III.2.1. Analogues envisagés</i>	185
<i>III.2.2. Synthèses des analogues 227 à 234</i>	187
<i>III.2.3. Résultats et discussion</i>	189
III.3. Modifications autour de la fonction carbonyle.....	191
<i>III.3.1. Analogues envisagés</i>	191
<i>III.3.2. Synthèses des analogues 235 à 240</i>	191
<i>III.3.3. Résultats et discussion</i>	195
III.4. Remplacement de la fonction amine par une fonction amide et introduction d'atomes de fluor pour diminuer la basicité des composés	196
<i>III.4.1. Introduction d'une fonction amide : synthèse, résultat et discussion</i>	196
<i>III.4.2. Analogues envisagés</i>	197
<i>III.4.2. Synthèses des analogues 244 et 249</i>	197
Conclusion	201
Conclusion Générale	203
Bibliographie	211
Partie expérimentale	225
I. Chemistry	227
II. Chapter I: synthesis of compounds 1 to 137	229
III. Chapter II: synthesis of compounds 138 to 196	282
IV. Chapter III: synthesis of compounds 198 to 249	312
V. Compound characterization	335
VI. Biological testing	337

Abréviations

2D	deux dimensions	IC₅₀	concentration inhibitrice 50
3D	trois dimensions	IDABO	8,8-diméthyl-3-oxo-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octane
AA	acides-aminés	INF-α-PEG	interféron- α -pégylé
AcOEt / EtOAc	acétate d'éthyle	INH	isoniazide
AcOH	acide acétique	ITGB1	intégrin subunit beta 1
ADME	absorption distribution métabolisme excrétion	K_D	constante de dissociation
ADN	acide désoxyribonucléique	LC/MS	liquid chromatography/mass spectrometry
Akt	proteïn kinase	LDL-R	low-density lipoprotein receptor
APTS	acide paratoluènesulfonique	LE	ligand efficiency
Ar	aryle	LEL	large extracellular loop
ARN	acide ribonucléique	Ligand conc. - C	concentration
ATP	adénosine triphosphate	LVP	lipo-viro-particule
BCG	bacille de Calmette et Guérin	MDM2	murine double minute 2
BCL-2	B-cell lymphoma 2	MDR-TB	tuberculose multi-drug resistant
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large	Me	méthyle
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle	MeCN	acétonitrile
(Boc)₂O	dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle	MeOH	méthanol
[bmim]BF₄	tétrafluoroborate de 1-butyl-3-méthylimidazolium	MeONa	méthanolate de sodium
[bmim]Br	bromure de 1-butyl-3-méthylimidazolium	miR-122	micro-ARN 122
BRET	bioluminescence resonance energy transfer	MMP3	matrix metalloproteinase-3
C	core	MOE	molecular operating environment
CD81	tétraspamine	MVL	virus de la leucémie murine
CHO	chinese hamster ovary	MW	molecular weight
CLDN-1	claudine-1	NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
CMI	concentration minimale inhibitrice	ND	non déterminé
Cpd	compound	Nombre H-Acc	nombre d'atomes accepteurs de liaisons hydrogène
Csp³	atome de carbone sp ³	Nombre H-Don	nombre d'atomes donneurs de liaisons hydrogène
Cspiro	atome de carbone spiranique	NPC1L1	niemann-pick C1-like 1
DAAs	direct-acting antivirals	NPR1	normalized PMI ratios 1
DAST	trifluorure de diéthylaminosulfure	NPR2	normalized PMI ratios 2
DCE	dichloroéthane	NRot	nombre de liaisons à libre rotation
DCM	dichlorométhane	NS	protéine non structurale
DIEA	diisopropyléthylamine	OCLN	occludin
DMAP	diméthylaminopyridine	OMS	organisation mondiale de la santé
DME	diméthoxyéthane	PCR	polymerase chain reaction
DMF	diméthylformamide	PI3K	phosphoinositide 3-kinase

DMSO	diméthylsulfoxyde	PMI	principal moments of inertia
DOS	diversity oriented synthesis	PSA	surface polaire
EC₅₀	concentration efficace 50	PZA	pyrazinamide
EGFR	epidermal growth factor receptor	QSAR	quantitative structure activity relationship
EMB	éthambutol	RBV	ribavirine
EphA2	ephrin type-A receptor 2	RD114pp	particules RD114 pseudotypées
eq	équivalent	Rdt	rendement
Et	éthyle	RIF	rifampicine
ETH	éthionamide	RLuc	rénilla luciférase
EtOH	éthanol	RMN (NMR)	résonance magnétique nucléaire
FBDD	fragment-based drug discovery (or design)	rmsd	root-mean-square deviation
FDA	food and drug administration	Ro3	règle des 3
Fe	fer	RPS	résonance plasmonique de surface
FLuc	firefly luciférase	RVP	réponse virologique prolongée
FRET	fluorescent resonance energy transfer	RX	rayon X
FS	functionalisation sites	SAR	structure-activity relationship
GABA	acide γ -aminobutyrique	SEL	small extracellular loop
GFP	green fluorescent protein	SN2	substitution nucléophile d'ordre 2
GLuc	gaussia luciférase	SRB1	récepteur scavenger B de type 1
GP	groupement protecteur	t_R	temps de rétention
HAC	heavy atom count	TA	température ambiante
HBA	hydrogen bound acceptor	TB	tuberculose
HBD	hydrogen bound donor	TEA	triéthylamine
HBTU	O-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-guanidinium-hexafluorophosphate	TfR1	récepteur de la transferrine 1
HEK-293T	human embryonic kidney 293	THF	tétrahydrofurane
Het	heteroatome	T_m	température de dénaturation
HOBt	hydroxybenzotriazole	TSA	thermal shift assay
HPLC	high performance liquid chromatography	VHB	virus de l'hépatite B
HRMS	high resolution mass spectrometry	VHC	virus de l'hépatite C
HSPG	heparan sulfate proteoglycan	VIH	virus de l'immunodéficience humaine
HTAs	host-targeting agents	VLDL	very low-density lipoprotein
HTH	helix turn helix	XDR-TB	tuberculose extensively drug-resistant
HTS	high-throughput screening		

Å	angström	M	molaire
g	gramme	mM	millimolaire
mg	milligramme	µM	micromolaire
mL	millilitre	nM	nanomolaire
µL	microlitre	ppm	partie par million
min	minute	W	watt
h	heure		

Ala	alanine	Leu	leucine
Asp	acide aspartique	Phe	phénylalanine
Glu	acide glutamique	Pro	proline
Gly	glycine	Pro-OMe	proline ester méthylique
Gly-OMe	glycine ester méthylique	Ser	serine
His	histidine	Thr	thréonine
HomoPro	homoproline	Trp	tryptophane
Ile	isoleucine	Val	valine

Introduction Générale

Le criblage à haut débit de chimiothèques de molécules drug-like ou de fragments sont deux stratégies couramment utilisées pour la découverte de candidats médicaments. La différence fondamentale entre ces deux stratégies est basée sur la taille et la masse molaire des molécules criblées. En effet, celles impliquées dans un criblage généraliste respectent bien souvent les règles énoncées par Lipinski et Veber avec comme critère premier une masse molaire inférieure à 500 g.mol⁻¹. Les fragments quant à eux, sont des entités moléculaires moins complexes présentant généralement une masse molaire n'excédant pas 300 g.mol⁻¹. Ces deux approches ont été abordées dans ce manuscrit dans deux thématiques distinctes et ont permis d'identifier des molécules présentant des activités biologiques sur deux types de cibles : une interaction protéine-protéine afin d'empêcher l'entrée du virus de l'hépatite C dans les hépatocytes et un régulateur transcriptionnel mycobactérien afin de potentialiser l'activité d'un antituberculeux existant.

Le premier chapitre illustre l'utilisation du criblage à haut débit pour la découverte de modulateurs du complexe protéique CD81/CLDN-1 afin d'empêcher l'entrée du virus de l'hépatite C (VHC) dans les hépatocytes. Après avoir identifié une famille de molécules capable de moduler le complexe CD81/CLDN-1 et d'empêcher l'entrée du VHC dans les hépatocytes, l'optimisation des composés a été réalisée en effectuant des modifications structurales. Ce travail a permis d'aboutir à des molécules plus actives et d'identifier un outil pharmacologique pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'entrée virale.

Le second chapitre présente en détail l'approche par fragments pour l'identification de touches à l'issue d'un criblage. L'une des étapes déterminantes pour assurer le succès de cette approche concerne la conception de la librairie de fragments. Une analyse des chimiothèques commerciales a montré qu'elles étaient principalement composées de fragments plans enrichis en carbone sp². Ainsi, pour pallier cette absence de diversité géométrique, nous avons introduit le concept de fragments privilégiés qui correspond à une structure rigide, respectant la règle des 3, possédant un caractère tridimensionnel et présentant différents sites de fonctionnalisation. Nous avons ainsi travaillé autour de deux structures chimiques : le noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et le noyau spirohydantoïne enrichis en carbone sp³ et nous avons développé de nouvelles voies de synthèse par irradiation micro-ondes afin d'introduire rapidement de la diversité sur ces noyaux. Dans un second temps et afin d'illustrer le potentiel de ces molécules, une librairie virtuelle de fragments fonctionnalisés a été générée et son criblage *in silico* sur la protéine MDM2 a été effectué. 51 hits ont été sélectionnés et la validation *in vitro* de ces hits, dont la synthèse est actuellement en cours, permettra de montrer l'intérêt de concevoir et d'inclure de tels fragments dans nos chimiothèques.

Le troisième chapitre présente l'utilisation d'une approche par fragments pour identifier des inhibiteurs du répresseur transcriptionnel EthR₂ afin de potentialiser l'activité bactéricide de l'éthionamide. L'éthionamide est une prodrogue utilisée dans le traitement de seconde intention contre la tuberculose. Cette prodrogue doit être bioactivée par la bactérie afin d'acquérir son pouvoir bactéricide. Très récemment, nous avons pu identifier une nouvelle voie de bioactivation de cet antituberculeux qui implique une oxydo-réductase appelée EthA₂, dont la production est sous contrôle du répresseur transcriptionnel EhR₂. Il a été montré que les bactéries préalablement résistantes à l'éthionamide, redeviennent sensibles à cet antituberculeux en présence d'inhibiteurs spécifiques d'EhR₂. Afin d'identifier de nouveaux inhibiteurs de ce répresseur, une chimiothèque de fragments a été criblée. Une nouvelle famille d'inhibiteurs a été ainsi découverte et le mode de liaison d'un des fragments avec la protéine EthR₂ a été déterminé par cristallographie. Ces données ont permis d'entamer un design rationnel pour optimiser l'activité de ces composés.

**Chapitre I – Développement d'inhibiteurs de
l'entrée du virus de l'hépatite C : découverte et
synthèse de modulateurs de l'interaction
CD81/CLDN-1**

Introduction

Près de 185 millions d’individus sont chroniquement infectés par le virus de l’hépatite C (VHC) et courent le risque que leur atteinte hépatique évolue vers une cirrhose ou un cancer du foie. Le traitement de référence a été, pendant près de 20 ans, non spécifique au VHC. L’arrivée tardive de modèles d’études *in vitro* associée à l’absence de modèles animaux de petites tailles a été un réel frein pour le développement d’antiviraux spécifiques du VHC.

Aujourd’hui de nombreux antiviraux, ayant reçu une autorisation de mise sur le marché très récemment, ciblent des protéines virales impliquées dans le cycle répliatif du VHC telles que la sérine protéase NS3/4A, responsable du clivage de la polyprotéine virale dans les cellules hépatiques, la protéine NS5A, contrôlant l’assemblage des nouveaux virions, et la polymérase NS5B, nécessaire à la répliation de l’ARN viral. Même si ces antiviraux ont permis la prise en charge d’un nombre considérable de patients, de plus en plus de phénomènes de résistance apparaissent.

Pour proposer une alternative thérapeutique, nous avons développé une stratégie antivirale consistant à identifier des molécules capables de cibler les facteurs cellulaires de l’hôte impliqués dans l’infection. Parmi les différentes étapes de l’infection, l’entrée du virus dans les hépatocytes représente une phase essentielle de ce processus et donc constitue une cible intéressante pour empêcher l’infection. Très récemment, il a été montré que, parmi les récepteurs spécifiques du VHC présents à la surface des hépatocytes, les protéines CD81 et CLDN-1, s’associent pour former un complexe indispensable à l’entrée du VHC.

A partir de cette étude, un test biologique basé sur la technique de BRET a été mis au point et un criblage à haut débit d’une chimiothèque de 14400 molécules a permis d’identifier une famille de composés capables de moduler l’interaction entre CD81 et CLDN-1 et ainsi d’empêcher l’entrée du virus dans les cellules hépatiques. Différents analogues structuraux de cette famille chimique ont été synthétisés afin de pouvoir établir des relations structure-activité et d’identifier un outil pharmacologique pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce processus d’entrée du virus.

I. Description de la pathologie et des traitements actuels

L’hépatite C, causée par le virus de l’hépatite C (VHC), est une maladie infectieuse du foie, largement répandue, qui touche près de 185 millions d’individus, soit 2,8% de la population mondiale. Selon l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 3 à 4 millions de personnes sont nouvellement infectées chaque année et cette maladie est responsable de 500 000 décès dans le même laps de temps¹.

1.1. L’infection par le virus de l’hépatite C et son épidémiologie

1.1.1. Prévalence à travers le monde et modes de transmission du virus

L’hépatite C est inégalement répartie à travers le monde² avec des taux de prévalence variant de moins de 1% au Canada et en Europe du Nord à plus de 10% en Egypte³ ou au Cameroun⁴ (Figure 1).

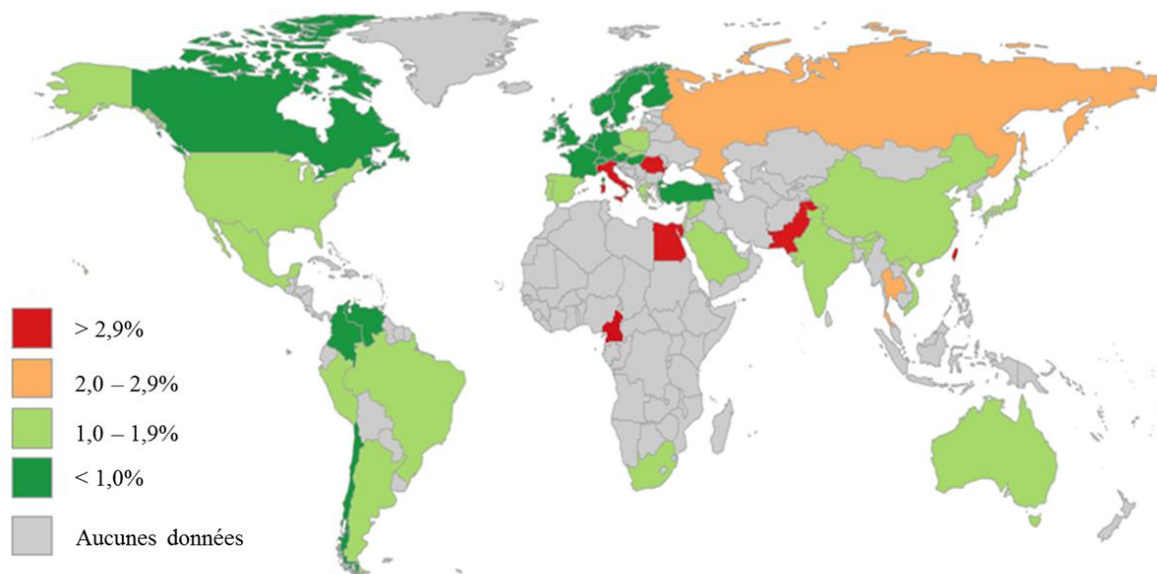


Figure 1 : Prévalence du VHC à travers le monde
(D’après <http://www.centerforda.com/HepC/HepMap.html>)

Le virus se transmet essentiellement et très efficacement par le sang. Jusque dans les années 70, l’infection a été principalement véhiculée par la transfusion sanguine. Cependant depuis la mise en place d’un dépistage systématique des dons de sang dans les pays développés, le risque transfusionnel a été réduit considérablement⁵. C’est à présent la toxicomanie par voie intraveineuse qui est devenue le principal mode de contamination dans les pays développés. En revanche, dans les pays en développement, plusieurs cas d’infections sont corrélés à des injections thérapeutiques et des transfusions de sang réalisées dans de mauvaises conditions d’asepsie⁶. Par exemple, des années 1950 aux années 1980, une large campagne a été menée en Egypte pour éradiquer la schistosomiase en administrant par voie intraveineuse du tartrate d’antimoine et de potassium à des millions de résidents. Ces administrations ont été effectuées dans de mauvaises conditions de stérilisation et ont donc conduit à une transmission massive du virus⁷. De ce fait, cette maladie a une prévalence variable d’un pays à l’autre.

Enfin, d’autres transmissions plus rares peuvent survenir si du matériel, ayant été en contact avec du sang et non stérilisé, est réutilisé lors de tatouages ou d’acupuncture par exemple. Les transmissions par voies sexuelles et périnatales sont également peu fréquentes⁶. Néanmoins, pour 20% des malades, le mode de transmission reste inconnu.

I.1.2. Evolution de la maladie et diagnostic de l’infection

L’infection par le VHC se manifeste avec une gravité variable, qui peut aller d’une forme bénigne, qui dure quelques semaines voire quelques mois, à une maladie grave qui s’installe à vie⁷ (Figure 2).

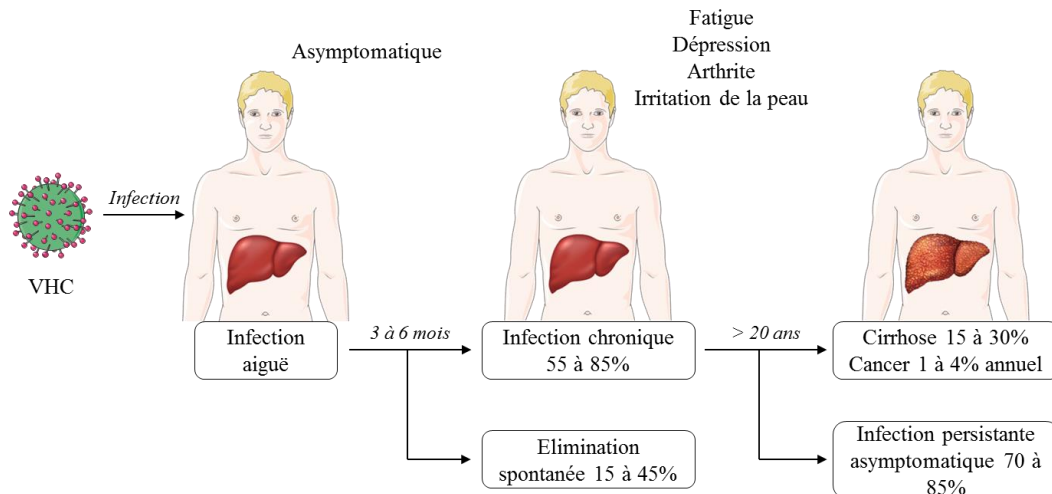


Figure 2 : Evolution de l’hépatite au cours du temps

Suite à une contamination par le VHC, le patient va développer une hépatite aiguë qui est le plus souvent asymptomatique⁸ et dont le diagnostic clinique est difficilement établi⁹. Selon l’OMS, environ 15 à 45% des sujets infectés vont éliminer spontanément le virus dans les 6 mois qui suivent l’infection sans aucun traitement. En revanche, dans la majorité des cas (de 55 à 85%), l’hépatite aiguë évolue vers une infection chronique qui se caractérise par une persistance de plus de 6 mois du virus dans le sang. Fatigue, dépression, arthrite et agressions au niveau de la peau sont des symptômes pouvant se produire à ce stade de la maladie sans pour autant être spécifiques de l’hépatite C chronique⁷. L’hépatite C chronique est également associée à de multiples symptômes extra-hépatiques le plus souvent d’origine auto-immune. En effet, l’apparition d’une cryoglobulinémie mixte est la plus fréquente des manifestations extra-hépatiques associées à l’infection par le VHC. Cette maladie est caractérisée par la présence d’immunoglobulines qui précipitent à froid et redeviennent solubles lors du réchauffement provoquant ainsi pour un quart des patients des problèmes cutanés (syndrome de Raynaud, purpura), rénaux (glomérulonéphrite) et neurologiques (vascularité cérébrale). Parmi d’autres manifestations extra-hépatiques connues, des lymphomes non-hodgkiniens de type B ainsi que des cas de diabète non insulino-dépendants ont été rapportés dans la littérature ces dernières années^{10, 11}. Ces manifestations extra-hépatiques peuvent représenter le premier signe d’une infection par le VHC chez certains malades. Cependant, pour la majorité des patients il faut attendre quelques décennies pour voir apparaître des symptômes spécifiques de l’hépatite C.

Au stade de la chronicité, l’évolution de l’infection varie considérablement d’une personne à l’autre. Des facteurs aggravants peuvent accélérer la progression de l’atteinte du tissu hépatique tels que l’âge avancé du patient lors de l’infection, la consommation d’alcool anormalement élevée, la co-infection avec le virus de l’hépatite B (VHB) ou avec le virus de l’immunodéficience humaine (VIH)¹²⁻¹⁵. L’OMS estime que 15 à 30% des patients chroniquement infectés risquent de développer

une cirrhose du foie sur une durée de 20 ans qui peut ensuite évoluer vers un cancer du foie. Chaque année 1 à 4% des cancers du foie sont dus au VHC¹⁵.

Le diagnostic clinique est rarement et difficilement établi puisqu’il n’existe aucun symptôme spécifique de l’infection aiguë et chronique. Bien que les manifestations extra hépatiques puissent servir à détecter une infection par le VHC, un diagnostic biologique doit être établi afin de confirmer l’infection et d’évaluer son stade¹⁶. Ce diagnostic s’effectue en deux temps :

- Il y a d’abord un dépistage des anticorps anti-VHC qui est réalisé par des tests sérologiques tels que les tests immunoenzymatiques. Ces anticorps, détectables 6 à 8 semaines après l’infection, sont des marqueurs indirects d’une infection par le VHC. Les résultats positifs doivent ensuite être confirmés par détection de l’ARN viral.
- L’ARN viral est rapidement détectable après contamination (de 1 à 3 semaines). Différentes techniques peuvent être utilisées pour détecter le génome du VHC comme par exemple la PCR (Polymerase Chain Reaction). Le génome viral est un marqueur très important puisqu’il permet de diagnostiquer une hépatite aiguë et de confirmer une infection chronique.

Le stade de l’infection est défini par une biopsie du foie qui établit la sévérité de l’atteinte du tissu hépatique, allant de l’inflammation à la fibrose, puis à la cirrhose, pour finir par le cancer du foie.

En plus de ces outils permettant la détection d’anticorps anti-VHC et du génome virale, d’autres techniques moléculaires capables de déterminer le type de génotype engagé dans l’infection existent afin de pouvoir adopter la stratégie antivirale la plus appropriée.

1.2. Variabilité génétique du VHC

Comme de nombreux virus à ARN, le VHC possède un génome ayant une grande capacité à muter. En effet, le VHC se réplique en utilisant une ARN polymérase ce qui est susceptible d’introduire des erreurs aléatoires au cours du processus de réplication générant ainsi une diversité génétique au sein des individus infectés¹⁷. Cette variabilité génétique se traduit par un VHC présentant sept génotypes différents (numérotés de 1 à 7), eux-mêmes subdivisés en sous-types (classés par lettre a, b, ...). Les sept génotypes diffèrent entre eux de plus de 30% au niveau de leurs séquences nucléotidiques. La diversité dans la séquence de chaque sous-type est de 20%¹⁸.

Par ailleurs, ces génotypes sont inégalement répartis à travers le monde (Figure 3)².

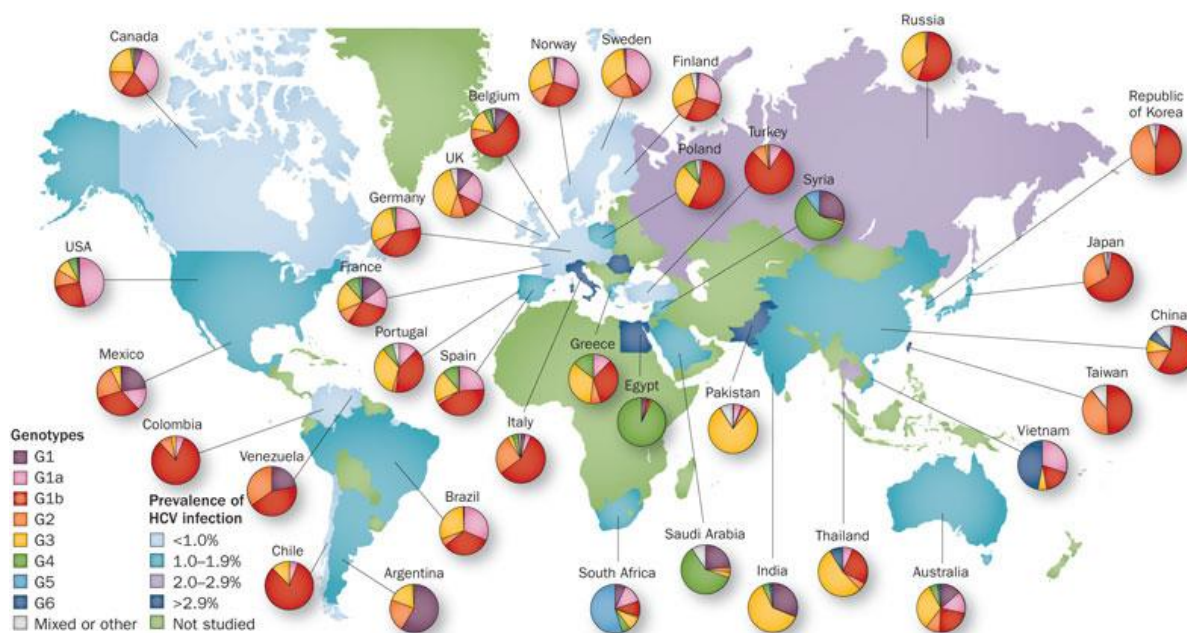


Figure 3 : Distribution géographique des différents génotypes du VHC²

Comme l’indique la Figure 3, les génotypes 1, 2 et 3 sont très largement répandus à travers le monde alors que les génotypes 4, 5 et 6 sont généralement confinés à des zones géographiques spécifiques. Concernant le génotype 7, seuls des cas en Afrique centrale et en Thaïlande ont été recensés¹⁶. La manière dont le virus peut s’adapter à l’environnement de l’hôte qu’il infecte pourrait expliquer cette variabilité de génotypes à travers le monde.

Ces génotypes n’entraînent pas de différences dans l’évolution de l’hépatite virale mais ils ont une incidence sur la réponse aux traitements. Du fait de sa forte prévalence et de sa faible réponse au traitement standard, le génotype 1 est celui pour lequel de nombreuses stratégies antivirales sont développées¹⁹.

1.3. Le virus de l’hépatite C et son cycle viral

Au début des années 1970, les virus de l’hépatite A et de l’hépatite B sont identifiés, mais la moitié des hépatites virales restent sans étiologie, d’où la notion d’hépatites virales baptisées « non A, non B ». Ce n’est qu’en 1989 que le virus responsable de la plupart de ces hépatites « non A, non B » est découvert : il est appelé virus de l’hépatite C²⁰.

1.3.1. Le virus de l’hépatite C (VHC)

C’est un virus de très petite taille avec un diamètre compris entre 50 et 80 nanomètres. Il appartient à la famille des *Flaviviridae*. La particule virale est composée (Figure 4) :

- d’une enveloppe au sein de laquelle sont ancrées deux glycoprotéines, E1 et E2, permettant au virus de se fixer sur les cellules du foie avant d’y pénétrer,

Chapitre I – Développement d’inhibiteurs de l’entrée du virus de l’hépatite C : découverte et synthèse de modulateurs de l’interaction CD81/CLDN-1

- d’une capsid protéique protégeant le virus de l’extérieur,
- d’un génome viral constitué d’un ARN simple brin de polarité positive.

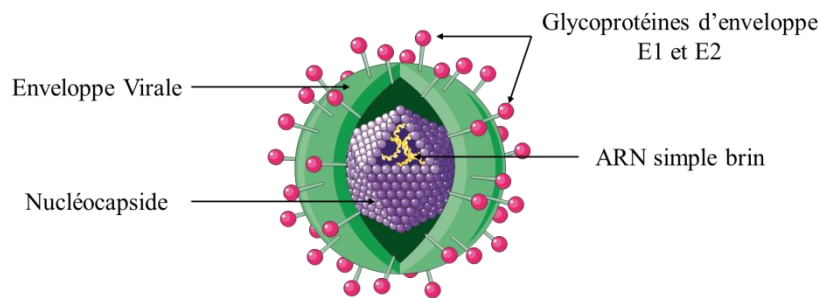


Figure 4 : Représentation schématique d'une particule de VHC

Le génome du VHC, long de 9600 nucléotides, peut être subdivisé en trois régions (Figure 5)²¹ :

- la région 5' non codante, très structurée et indispensable pour la traduction de l'ARN viral.
- la région 3' non codante indispensable à la réplication du virus.
- entre ces deux régions, un cadre de lecture codant pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés qui est clivée par des protéases cellulaires (représenté par des losanges blancs et noirs sur la Figure 5) et virales (représenté par des flèches) pour donner naissance à trois protéines structurales (C, E1 et E2) et sept protéines non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Toutes ces protéines virales sont localisées dans le réticulum endoplasmique de la cellule infectée.

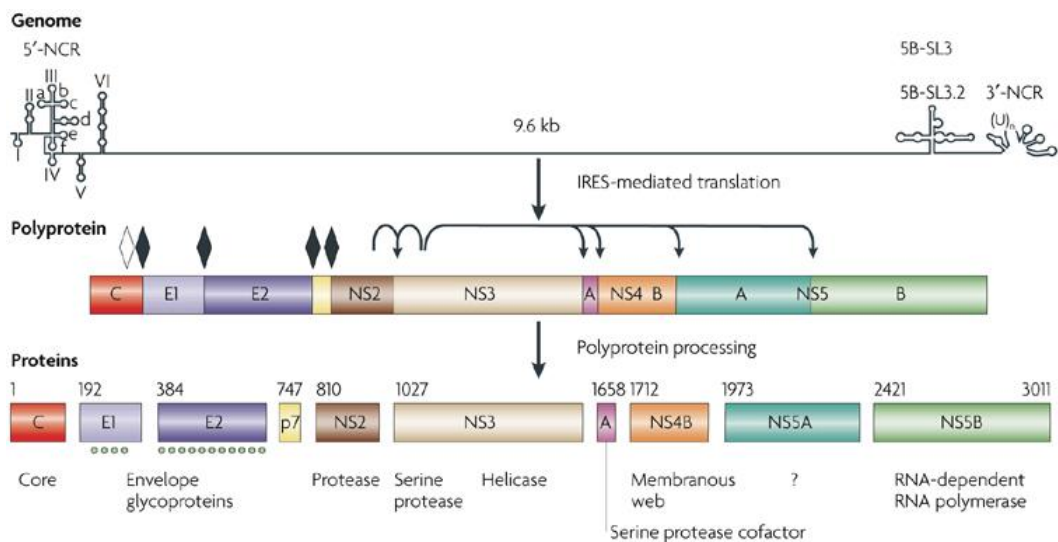


Figure 5 : Organisation génétique et polyprotéine du VHC²¹

Les sept protéines non structurales sont impliquées dans le processus de clivage de la polyprotéine et/ou dans la réplication du virus. En effet, la protéine NS2, en association avec la partie aminotermine de NS3 va permettre l'auto-clivage à la jonction NS2-3 tandis que l'activité

protéolytique de NS3 va permettre la libération des autres protéines non structurales (Figure 5)^{19, 21}. Ces protéines virales non structurales libérées vont permettre la réplication du virus.

I.3.2. Cycle viral du VHC

Le cycle réplcatif du VHC est représenté Figure 6. Il est divisé en 8 étapes²²⁻²⁴ :

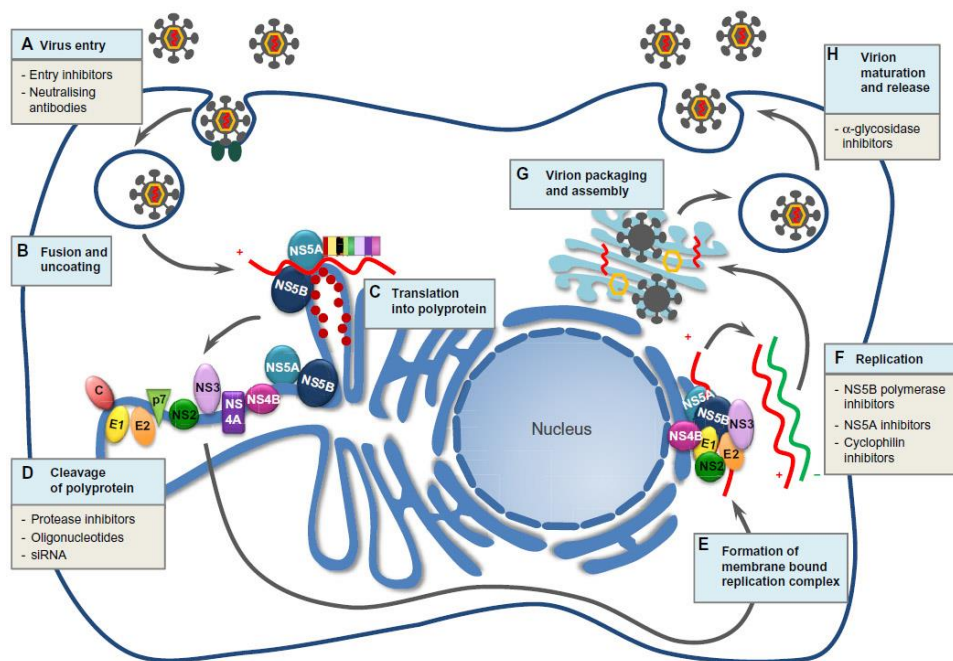


Figure 6 : Cycle viral du VHC²²

A. Le virus entre dans les hépatocytes grâce aux glycoprotéines de son enveloppe. Ce mécanisme sera détaillé dans la section suivante.

B. Après pénétration dans la cellule, l'ARN est libéré dans le cytoplasme et les étapes de réplication peuvent débuter.

C et D. L'ARN viral est traduit par le ribosome de la cellule hôte en une polyprotéine unique. Le clivage de la polyprotéine par les protéases cellulaires et virales permet de produire toutes les protéines virales nécessaires à la multiplication du virus. Ainsi la métalloprotéase NS2 va permettre l'auto-clivage à la jonction NS2/3 tandis que la sérine protéase NS3/4A va permettre le clivage de toutes les autres jonctions : NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A et NS5A/5B aboutissant à la formation du complexe de réplication.

E et F. Le complexe de réplication, reconnaît la région 3' terminale du génome virale à polarité positive (3'+) et permet la synthèse du brin complémentaire ou brin de polarité négative. La synthèse du brin de polarité négative est catalysée par la protéine NS5B qui assure une fonction d'ARN polymérase ARN-dépendante. Ce brin négatif sert de matrice au complexe de réplication pour la synthèse de brins de polarités positives. De plus, bien que son rôle exact soit mal connu, la protéine NS5A interviendrait dans la régulation de la réplication virale et dans le processus d'assemblage.

G et H. Après assemblage dans le cytoplasme des ARN viraux avec leurs capsides protéiques (appelés virions), les virus quittent la cellule pour aller infecter d'autres hépatocytes. L'infection virale se propage ainsi dans le foie. Le VHC a un niveau élevé de réplication pouvant aller jusqu'à 10^{12} virions produits par jour²⁵.

Comme nous venons de le voir, la sérine protéase NS3/4A, la protéine NS5A et la polymérase NS5B sont des protéines essentielles pour la réplication du VHC. En effet le clivage de la polyprotéine est dépendant de la sérine protéase NS3/4A, la polymérase NS5B est nécessaire pour construire l'ARN de polarité négative qui servira de matrice pour la synthèse des ARNs de polarités positives et l'assemblage de ces nouveaux ARNs avec leurs capsides est sous contrôle de la protéine NS5A. Ces trois protéines constituent donc des cibles prometteuses pour développer de nouvelles stratégies antivirales contre l'infection chronique par le VHC.

1.4. L'évolution des traitements contre le VHC de 1970 à aujourd'hui

Depuis la découverte de l'hépatite virale baptisée « non A, non B » jusqu'à aujourd'hui, de nombreuses avancées concernant les stratégies antivirales contre le VHC ont eu lieu. Cependant, il aura fallu attendre une vingtaine d'années avant de voir apparaître les premiers traitements spécifiques du VHC. Cela s'explique par l'arrivée tardive de modèles d'étude puisque le premier test cellulaire de réplique du VHC n'est apparu qu'en 1999. De plus, l'absence de modèles animaux de petites tailles a été un réel frein pour le développement de molécules contre l'infection chronique du VHC¹⁹. En effet, seul le chimpanzé est infecté par le VHC et dans un tiers des cas il éradique spontanément le virus.

1.4.1. De 1970 jusqu'à 2011 : découverte et développement de la bithérapie associant l'interféron alpha pégylé à la ribavirine (INF- α -PEG/RBV)

L'efficacité des traitements est déterminée à partir de tests capables de mesurer le taux d'ARN viral dans le sang. L'absence d'ARN viral dans le sang, 24 semaines après la fin du traitement, définit la réponse virologique prolongée (RVP) correspondant à une guérison définitive de l'infection dans la majorité des cas.

Dans les années 80 et suite aux effets bénéfiques obtenus contre le VHB, l'interféron alpha était le seul traitement disponible pour les patients chroniquement infectés par le VHC. Malgré les optimisations faites sur la durée ainsi que sur la dose du traitement, seuls 15 à 20% des patients, tous génotypes confondus, obtenaient une RVP après 48 semaines de traitement²⁶.

En 1998, l'administration par voie intraveineuse de l'interféron alpha associé à la ribavirine, qui est un antiviral à large spectre, a permis d'améliorer significativement l'efficacité thérapeutique puisque 41 à 47% des patients ont obtenu une RVP à l'issue de 48 semaines de traitement^{27, 28}. En 2001, la bithérapie associant l'interféron alpha pégylé (INF- α -PEG) combiné à la ribavirine (RBV) est devenue le traitement de référence contre les infections chroniques du VHC. Même si les mécanismes d'action de cette bithérapie ne sont pas complètement connus, il a été montré que l'interféron pourrait avoir une activité antivirale en induisant la production de protéines inhibant la réplication virale. L'interféron aurait également un rôle d'immunomodulateur en augmentant la réponse immunitaire

adaptative spécifique au VHC²⁹. Concernant la ribavirine, sa tri-phosphorylation intracellulaire inhiberait la polymérase NS5B alors que sa mono-phosphorylation inhiberait l’inosine monophosphate ce qui conduirait à l’épuisement en guanosine triphosphate nécessaire à la synthèse de l’ARN viral. Elle aurait également un rôle d’immunomodulateur en favorisant la réponse immunitaire²⁹.

L’utilisation de cette bithérapie pendant 24 à 48 semaines a conduit à un taux de RVP compris entre 70 et 90% pour les génotypes 2/3/5 et 6, 65% pour le génotype 4 et environ 40% pour le génotype 1^{30,31}. Néanmoins, ce traitement est long et associé à des effets secondaires non négligeables tels qu’une anémie, un état dépressif et une neutropénie. De plus son efficacité antivirale est faible contre le génotype 1 qui est le plus répandu à travers le monde. Il était donc primordial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques en identifiant des antiviraux à action directe (DAAs pour *direct-acting antivirals*) ciblant directement des protéines virales.

I.4.2. De 2011 à maintenant : mise sur le marché d’antiviraux à action directe (DAAs) et développement de nouvelles thérapies

Les DAAs développés ciblent les protéines virales impliquées dans le cycle réplcatif du VHC telles que la sérine protéase NS3/4A, la protéine NS5A et la polymérase NS5B.

Les premiers DAAs à avoir eu une autorisation de mise sur le marché sont bocéprévir et télaprévir en 2011. Ce sont deux inhibiteurs covalents réversibles de la sérine protéase NS3/4A. L’inhibition de cette sérine protéase NS3/4A empêche le clivage de la polyprotéine et ainsi la libération des différentes protéines non structurales formant le complexe de réplcation. Bocéprévir et télaprévir constituent la première génération d’inhibiteurs de NS3/4A.

En 2014, siméprévir a obtenu une autorisation de mise sur le marché. Il s’agit également d’un inhibiteur de la sérine protéase NS3/4A mais qui n’est pas covalent. Il fait partie de la seconde génération d’inhibiteurs de NS3/4A. De nombreux composés de cette classe thérapeutique sont actuellement en cours de développement clinique.

Enfin, toujours en 2014, le sofosbuvir a également été approuvé. Il s’agit du premier inhibiteur de la polymérase NS5B. Cette protéine est responsable de la réplcation de l’ARN viral en catalysant la synthèse des brins de polarités négatives et positives de l’ARN. Cette polymérase est donc indispensable pour la réplcation du virus.

Ces quatre inhibiteurs sont administrés avec la bithérapie de référence précédemment décrite et les résultats obtenus pour chacune de ces nouvelles trithérapies en fonction du génotype engagé dans l’infection virale sont illustrés dans le Tableau 1³⁰⁻³⁴.


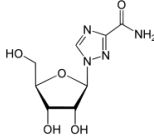
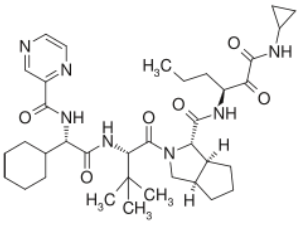

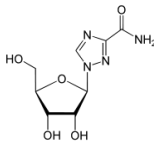
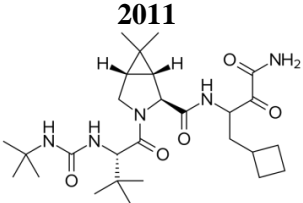

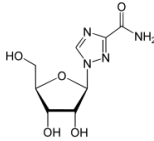
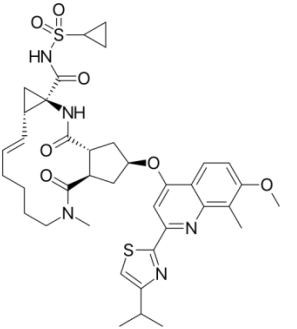

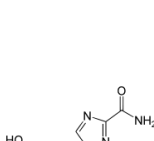
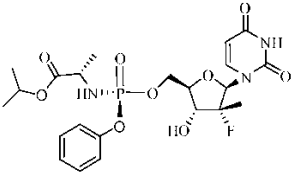
DAA (compagnie et année de mise sur le marché)	Cible thérapeutique	Régime thérapeutique		Durée	RVP	
		<i>INF-α-PEG</i>	<i>RBV</i>			
Télaprévir Vertex 2011	NS3/4A			De 24 à 48 semaines	Génotype 1 : 60% à 75% ^{30, 31}	
						
Bocéprévir Merck 2011	NS3/4A					
						
Siméprévir Jansen 2014	NS3/4A			24 semaines	Génotype 1 : 80% à 85% ^{30, 31}	
						
Sofosbuvir Gilead 2014	NS5B			12 semaines	Génotype 1, 4, 5 et 6 : 89% à 100% ³²	
				Pas d' <i>INF-α-PEG</i>	12 semaines	Génotype 2 : 95% ³³
					24 semaines	Génotype 3 : 65% ³⁴

Tableau 1 : Combinaison *INF-α-PEG*, *RBV* + DAA et RVP associée en fonction du génotype

Les RVPs indiquées dans le Tableau 1 concernent des patients naïfs de tout traitement. L'administration de télaprévir ou bocéprévir avec la bithérapie de référence a permis de passer de 40% de RVP à 60% pour le génotype 1 après 24 à 48 semaines de traitement. Ces deux nouvelles trithérapies ont permis d'accroître l'efficacité antivirale contre le génotype 1 tout en conservant une durée de traitement identique à la bithérapie de référence.

Cependant ces traitements étaient mal tolérés puisqu'ils entraînaient la potentialisation des effets indésirables liés à l'administration par voie intraveineuse de l'interféron alpha pégylé ou à la prise de ribavirine. De plus des effets indésirables spécifiques à ces deux DAAs tels que des complications dermatologiques ou une dysgueusie^{30, 31} ont été observés et des phénomènes de résistance à ces deux nouveaux DAAs sont apparus³⁵.

La nouvelle trithérapie avec le siméprévir, seconde génération d'inhibiteurs de la sérine protéase NS3/4A, a conduit à une RVP de plus de 80% pour le génotype 1 tout en réduisant la durée de traitement à 24 semaines et en ne provoquant pas la potentialisation des effets secondaires connus^{30, 31}. La découverte du premier inhibiteur de la polymérase NS5B, le sofosbuvir, a permis une avancée considérable dans la prise en charge des patients. Administré avec l'INF- α -PEG et la RBV, le sofosbuvir a abouti à une RVP de plus de 89% pour les génotypes 1/4/5 et 6 en seulement 12 semaines de traitement³². Par ailleurs et de façon intéressante, l'administration de sofosbuvir avec uniquement la RBV a permis d'aboutir à une RVP de 95% après 12 semaines de traitement pour le génotype 2³³ et à une RVP de 85% après 24 semaines de traitement pour le génotype 3³⁴. Ces résultats montrent pour la première fois qu'il est possible de s'affranchir de l'administration par voie intraveineuse de l'INF- α -PEG, dont l'utilisation est contre-indiquée chez certains patients³⁶. De nouvelles stratégies antivirales innovantes en associant des DAAs sans l'INF- α -PEG ont ensuite été développées.

Parmi ces nouvelles associations de DAAs, trois sont illustrés dans le Tableau 2. Les RVPs indiquées dans le tableau ci-dessous concernent des patients naïfs de tout traitement³¹.

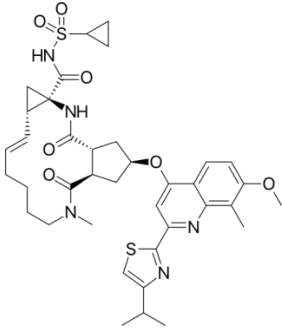
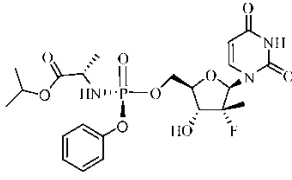
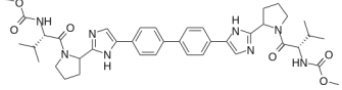
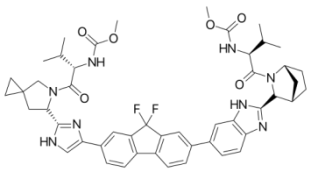
1 ^{er} DAA (compagnie et année de mise sur le marché)	2 ^{ème} DAA (compagnie et année de mise sur le marché)	Ribavirine (RBV)	Durée	RVP
<p>Siméprévir Jansen 2014 NS3/4A</p> 	<p>Sofosbuvir Gilead 2014 NS5B</p> 	+/-	12 semaines	Génotype 1 et 4 : 94% ³¹
<p>Daclatasvir Bristol-Myers Squibb 2014 NS5A</p> 		+/-	De 12 à 24 semaines	Génotype 1 : 99% ³¹ Génotype 2 : 96% ³¹ Génotype 3 : 89% ³¹
<p>Lédipasvir Gilead 2015 NS5A</p> 		+/-	12 semaines	Génotype 1 et 4 : 97% ³¹

Tableau 2 : Combinaisons de DAAs sans INF- α -PEG et RVPs associées en fonction du génotype

Comme l’indique le Tableau 2, l’association de siméprévir, inhibiteur de la sérine protéase NS3/4A, et de sofosbuvir, inhibiteur de la polymérase NS5B, avec ou sans RBV ont conduit à une RVP de 94% pour les génotypes 1 et 4 après seulement 12 semaines de traitement.

Le daclatasvir et lédipasvir ont récemment obtenu leurs autorisations de mise sur le marché (fin 2014 - début 2015). Ce sont les premiers inhibiteurs de la protéine NS5A. Bien que son rôle exact ne soit pas encore déterminé, la protéine NS5A serait impliquée dans le processus d’assemblage des nouveaux ARNs viraux avec leurs capsides. Les résultats obtenus pour ces deux inhibiteurs de NS5A, associés au sofosbuvir avec ou sans RBV, sont très prometteurs pour la lutte contre le VHC quel que soit le génotype responsable de l’infection. En effet, 12 à 24 semaines de traitement avec daclatasvir plus sofosbuvir avec ou sans RBV ont abouti à des RVPs de 99%, 96% et 89% pour les génotypes 1, 2 et 3 respectivement³¹. L’association de lédipasvir et de sofosbuvir avec ou sans RBV a permis d’obtenir une RVP de 97% pour les génotypes 1 et 4 après 12 semaines de traitement³¹. De façon très intéressante, ces stratégies antivirales basées sur l’association de DAAs permettent non seulement d’éviter l’administration de l’INF- α -PEG, qui est associé à de sévères effets secondaires, mais aussi

d’obtenir des meilleures RVPs pour l’ensemble des génotypes du VHC tout en diminuant la durée de traitement (24 semaines maximum).

Par ailleurs, le profil de tolérance des différents DAAs est globalement satisfaisant. Durant les études cliniques, la fréquence des effets secondaires rapportés était moins importante pour les traitements courts (2 à 3 mois) et en l’absence de ribavirine. Selon les molécules, les effets indésirables fréquemment rencontrés ont été l’insomnie, les nausées, l’anémie et l’hyperbilirubinémie. Ces deux derniers symptômes ont principalement été observés dans les groupes recevant de la ribavirine.

Malgré ces avancées, seul le sofosbuvir présente une barrière génétique élevée le rendant ainsi plus résistant aux phénomènes de résistance découlant de mutations du VHC. En revanche, pour les autres DAAs, des phénomènes de résistance apparaissent déjà chez certains patients. En effet, 85% des patients en échec à une trithérapie daclatasvir, INF- α -PEG/RBV et 78% des patients en échec à un traitement par lédipasvir/sofosbuvir ont développé une résistance résultant d’une substitution d’acides aminés de la protéine NS5A³¹. Pour pallier à ce phénomène d’échappement, une stratégie antivirale consisterait à développer une nouvelle classe thérapeutique d’agents capables de cibler directement les facteurs cellulaires de l’hôte (on les nommera HTAs, pour *host-targeted agents*). De nombreux facteurs cellulaires humains sont impliqués au cours du cycle de réplication du VHC et constituent donc des cibles de choix pour développer de tels agents. Parmi les molécules actuellement en développement, le miravirsén, inhibiteur de miR-122 impliqué dans la traduction du brin génomique et dans la réplication de l’ARN viral, est en phase 2 des essais cliniques tandis que l’alisposivir, inhibiteur de la cyclophiline A impliquée dans la réplication de l’ARN viral, est en phase 2/3 des essais cliniques³⁷. En plus de leurs barrières génétiques élevées, de telles molécules offrirait des nouvelles perspectives thérapeutiques puisqu’elles pourraient être associées aux DAAs afin d’agir de manière synergique contre le virus³⁷.

L’ancrage et l’entrée du virus dans les hépatocytes, phases essentielles et indispensables dans le processus d’infection, apparaissent également comme des cibles intéressantes de cette nouvelle stratégie antivirale consistant à cibler des facteurs cellulaires humains. De plus, bloquer l’entrée du VHC dans les hépatocytes permettrait d’empêcher la réinfection systématique du foie sain chez les patients atteint d’un cancer du foie et ayant reçu une greffe.

II. Empêcher l’entrée du virus dans les hépatocytes : une nouvelle stratégie antivirale

L’étape d’entrée du virus dans les cellules du foie est une cible thérapeutique de choix puisque si le virus ne peut se lier à la surface cellulaire, l’infection ne peut pas avoir lieu. Comme cela a été mentionné précédemment, les nouvelles stratégies thérapeutiques dirigées contre les protéines virales permettent d’aboutir à une réponse virologique prolongée supérieure à 89% quel que soit le génotype responsable de l’infection et avec des durées de traitement relativement courtes. Néanmoins, des phénomènes de résistance, liés à des mutations au niveau des protéines virales ciblées, commencent à apparaître et sont responsables de l’échappement du virus aux antiviraux à action directe. Par conséquent, cibler les protéines de l’hôte et non celles du virus pourrait être une piste thérapeutique prometteuse.

II.1. Mécanisme de l’entrée du virus dans les hépatocytes et implication du complexe CD81/CLDN-1

II.1.1. Mécanisme d’entrée du VHC dans les hépatocytes

Les données actuelles indiquent que l’entrée du VHC dans une cellule est un processus impliquant différents facteurs cellulaires. Elle est composée de trois étapes séquentielles : (i) adsorption à la surface membranaire des hépatocytes, (ii) endocytose dépendante de la clathrine et de facteurs cellulaires et (iii) fusion dans les endosomes précoces.

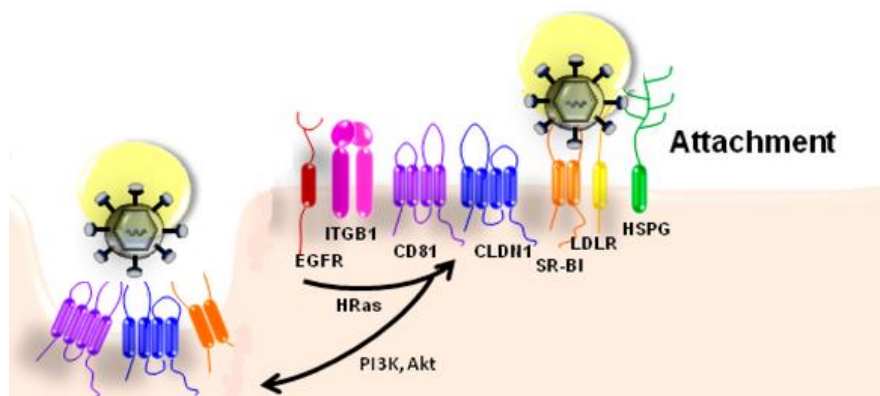


Figure 7 : Etape d'adsorption du VHC à la surface des hépatocytes³⁷

(i) adsorption à la surface membranaire des hépatocytes (Figure 7) : les particules virales s’associent aux lipoprotéines basses (LDL) et très basses densités (VLDL) et forment des complexes appelés lipoviraux-particules (LVP). Ces complexes permettent l’ancrage primaire des particules virales à la surface membranaire grâce à des molécules d’attachement telles que les glycosaminoglycanes de type héparane sulfate (HSPG) et les récepteurs aux lipoprotéines de basse densité (LDL-R)^{38, 39}. Ces facteurs cellulaires d’encrage ne sont pas des récepteurs spécifiques du VHC. Ils concentrent les particules virales à la surface membranaire des hépatocytes et les dirigent vers des récepteurs spécifiques du VHC.

Le récepteur scavenger B de type 1 (SRB1) est l’un de ces récepteurs spécifiques du VHC. Il interviendrait juste après l’attachement primaire en interagissant avec une région spécifique de la glycoprotéine E2 du VHC. Cette interaction faciliterait le transfert du virus vers la protéine membranaire CD81, autre récepteur spécifique identifié, en lui exposant la glycoprotéine E2 nécessaire à sa fixation^{38, 40}.

Le récepteur CD81 appartient à la famille des tétraspanines. Cette protéine est constituée de quatre domaines transmembranaires et de deux boucles extracellulaires (une petite, nommée Small Extracellular Loop ou SEL, et une grande, appelée Large Extracellular Loop ou LEL). C’est justement cette boucle LEL qui établit une interaction spécifique avec la glycoprotéine E2⁴⁰. En effet, il a été montré *in vivo* qu’en présence d’anticorps dirigés contre cette boucle de CD81, le virus ne peut pas se fixer à la surface de la cellule empêchant ainsi l’infection⁴⁰. Néanmoins, le récepteur CD81 bien qu’indispensable à ce mécanisme d’entrée du virus n’est pas suffisant puisque un (d’) autre(s) récepteur(s) interviendrait (aient) dans le déroulement de cette première étape du cycle viral.

La protéine des jonctions serrées Claudine-1 (CLDN-1) a été identifiée comme étant un facteur nécessaire à l'entrée du virus³⁸. Les jonctions serrées sont des composantes majeures des complexes d'adhésion cellule/cellule. Elles assurent l'étanchéité des épithéliums. La protéine CLDN-1 est constituée de quatre domaines transmembranaires et de deux boucles extracellulaires notées EL1 et EL2. CLDN-1 n'est pas directement impliquée dans l'entrée virale mais elle est capable d'interagir avec la protéine CD81 pour former un complexe qui est nécessaire à l'entrée virale. En effet, il a d'abord été montré par des études d'imagerie et de transfert de fluorescence (Fluorescent Resonance Energy Transfer, FRET) que CD81 et CLDN-1 s'associent à la surface des hépatocytes⁴¹. Il a ensuite été montré le rôle critique de EL1 dans l'entrée virale puisqu'une mutagenèse dirigée des résidus 32 et 48 de CLDN-1/EL1 empêche la formation du complexe CD81/CLDN-1 conduisant ainsi à l'inhibition de l'entrée virale⁴². De plus, l'utilisation d'anticorps spécifiques de CLDN-1/EL1 empêche l'entrée virale en réduisant l'association de CLDN-1 avec CD81⁴⁰. Il a par ailleurs été montré que la formation de ce complexe était favorisée par deux récepteurs à activité tyrosine kinase (EGFR et EphA2). L'activation de ces deux récepteurs déclencherait un signal permettant la diffusion latérale de CD81 à la surface membranaire ce qui est indispensable à son interaction avec CLDN-1⁴³.

(ii) endocytose dépendante de la clathrine et de facteurs cellulaires (Figure 8) : après avoir interagi avec une série de récepteurs, le virus est internalisé dans la cellule sous forme de vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine⁴⁴. En effet, les différentes unités de clathrine vont s'assembler pour former une cage protéique autour des vésicules d'endocytose afin de les acheminer vers les endosomes. Ce processus d'endocytose est dépendant de la clathrine³⁸ et du complexe CD81/CLDN-1⁴⁵. De plus, il semblerait que d'autres récepteurs soient impliqués dans ce processus tels que la protéine des jonctions serrées occludine (OCLN) et le récepteur de la transferrine 1 (TfR1)³⁸.

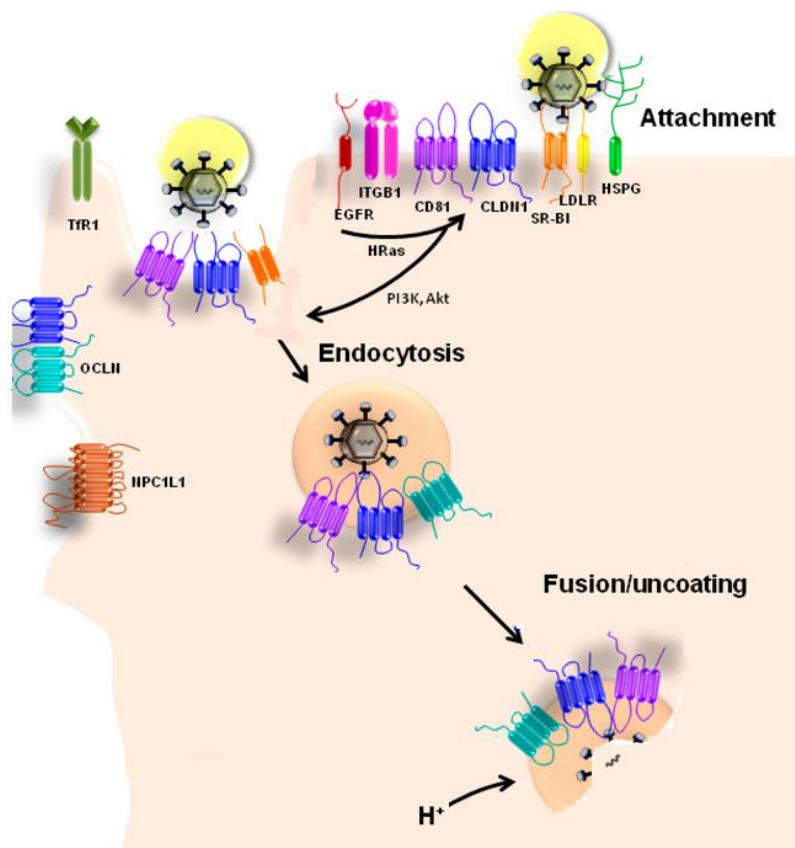


Figure 8 : Etape d'endocytose et de fusion des membranes virales et endosomales³⁷

(iii) fusion dans les endosomes précoces (Figure 8) : à la suite de l’internalisation du VHC, les vésicules d’endocytose rejoignent les endosomes précoces où le pH acide permet la fusion des membranes virales et endosomales³⁸. Par ailleurs, la protéine Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), responsable du transport du cholestérol, serait impliquée dans cette étape de fusion³⁸. L’ARN du VHC est ensuite libéré permettant ainsi la poursuite du cycle viral et la multiplication du virus dans l’organisme, comme nous l’avons vu précédemment (Figure 6).

En plus de ce mode d’entrée dans les hépatocytes, le virus est capable de se propager de cellule-en-cellule par contact direct (Figure 9). Des facteurs cellulaires tels que CD81/CLDN-1 et les récepteurs à activité tyrosine kinase (EGFR et EphA2) seraient impliqués dans ce processus nécessaire à la propagation du virus dans l’organisme³⁷.

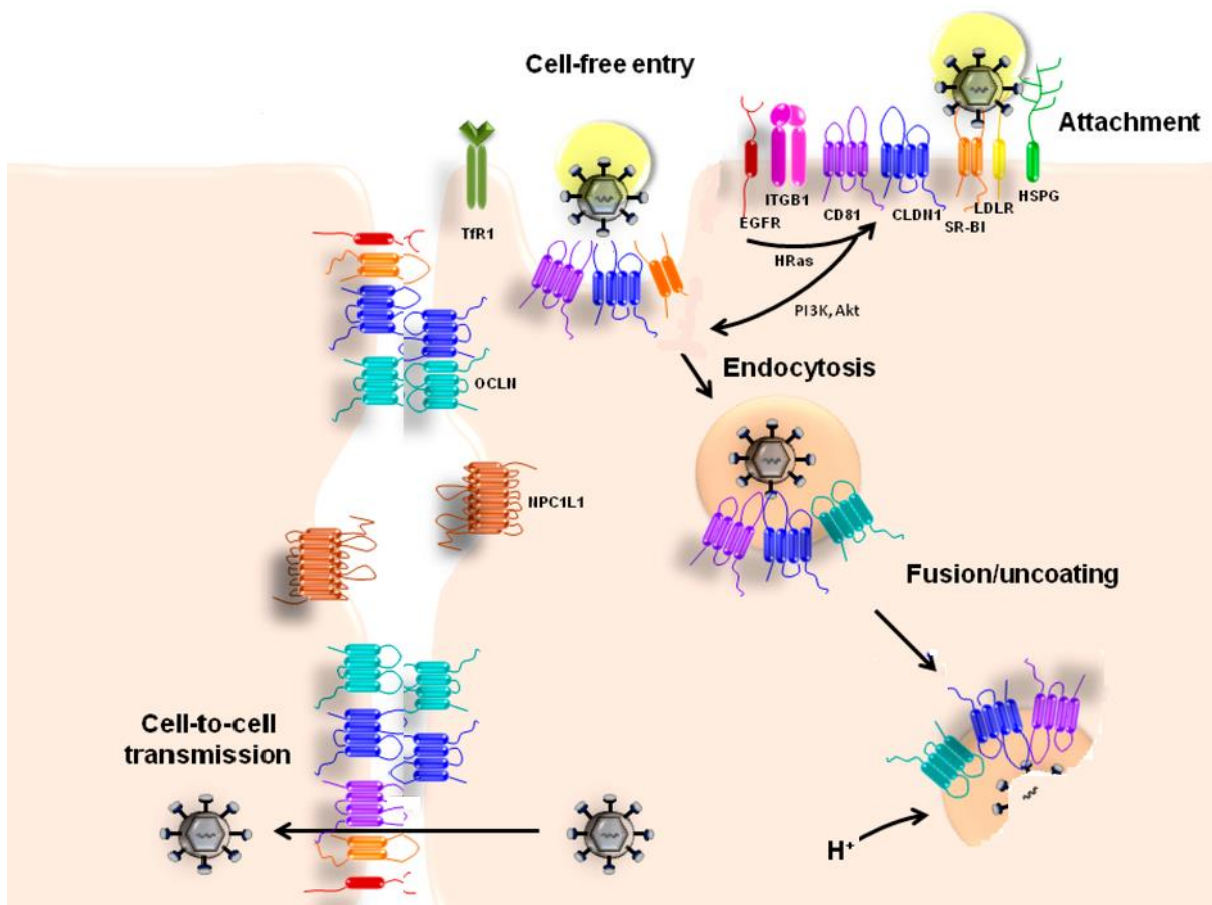


Figure 9 : Processus de transmission cellule-en-cellule³⁷

Ce mode de transmission de cellule-en-cellule permettrait au virus d’échapper et de résister aux DAAs⁴⁶. Par conséquent, développer des agents ciblant les facteurs cellulaires de l’hôte (*host-targeted agents* HTAs) impliqués dans l’étape d’entrée virale pourrait être une piste thérapeutique prometteuse pour pallier à ce phénomène de transmission. L’entrée du VHC dans les hépatocytes étant un processus hautement coordonné et impliquant de nombreux facteurs cellulaires, plusieurs HTAs spécifiques de l’entrée virale sont actuellement en cours d’étude.

II.1.2. HTAs spécifiques de l'entrée virales actuellement en développement

ITX5061 (Figure 10) est un inhibiteur du récepteur SRB1 impliqué dans l'adsorption du virus à la surface membranaire des hépatocytes. Ce composé est actuellement en phase 1 des essais cliniques pour empêcher l'entrée du virus dans les cellules du greffon sain chez les patients infectés par le VHC et ayant reçu une greffe du foie. Des études *in-vitro* ont montré que son association avec des DAAs permettait d'avoir un effet synergique contre l'infection virale faisant de cet inhibiteur un candidat prometteur pour ce type de combinaison thérapeutique⁴⁷.

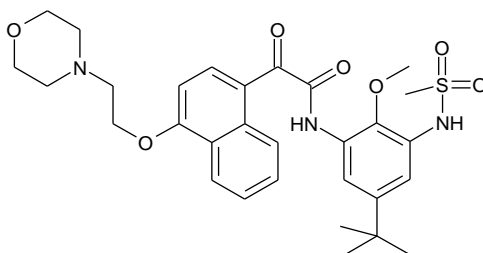


Figure 10 : Structure d'ITX5061, inhibiteur de SRB1

L'erlotinib (Figure 11) est un inhibiteur de l'EGFR, un récepteur à activité tyrosine kinase qui favorise la formation du complexe CD81/CLDN-1. Déjà sur le marché pour traiter le cancer, ce composé est actuellement en phase 1/2 d'études cliniques⁴⁷ pour empêcher l'entrée du virus dans les hépatocytes.

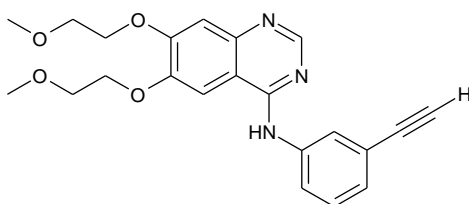


Figure 11 : Structure de l'erlotinib, inhibiteur de l'EGFR

Développer des HTAs spécifiques de l'entrée virale semblerait donc être une stratégie prometteuse pour prévenir la transmission cellule-à-cellule, empêcher la réinfection du foie sain après transplantation et traiter l'infection chronique. Qui plus est, administrés en association avec des DAAs, ces HTAs spécifiques de l'entrée ont un effet synergique⁴⁸. Parmi les facteurs cellulaires impliqués dans ce processus de l'entrée virale, le complexe protéique formé par CD81 et CLDN-1 joue un rôle essentiel. Par conséquent, il représente une nouvelle cible thérapeutique très intéressante pour empêcher l'entrée du virus dans les hépatocytes et ainsi prévenir l'infection par le VHC.

Nous nous sommes donc intéressés à l'identification d'inhibiteurs de ce complexe protéique. Pour cela, un test basé sur la technique de *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* (BRET), permettant le criblage à haut débit, a été développé.

II.2. Utilisation de la technologie de BRET pour le criblage d’une chimiothèque généraliste sur le complexe CD81/CLDN-1

II.2.1. Principe de la technologie de BRET et adaptation pour l’étude du complexe CD81/CLDN-1

La technologie de BRET est basée sur le phénomène de bioluminescence mis en évidence dans les années 1960. Elle est dérivée d’un processus biologique naturel qui existe chez certains organismes marins tels que la méduse *Aequorea victoria* ou la pensée de mer *Renilla reniformis*. Cette dernière possède une enzyme particulière, la Renilla luciférase (RLuc), qui en catalysant la réaction d’oxydation de son substrat, la coelenterazine (luciférine), émet une lumière bleue à 480 nm. Cette énergie est transmise à une protéine fluorescente, la *Green Fluorescent Protein* (GFP), qui émet à une autre longueur d’onde. Ce phénomène est appelé bioluminescence.

Au cours de l’année 1999, cette technologie de BRET a été adaptée pour étudier des interactions protéine-protéine en fusionnant une protéine d’intérêt avec la RLuc donneur d’énergie et l’autre protéine d’intérêt avec la GFP accepteur d’énergie.^{49, 50} Pour l’étude du complexe CD81/CLDN-1, la RLuc a été attachée à la protéine CD81 tandis que la GFP a été fusionnée à la protéine CLDN-1. La luciférase est excitée avec son substrat. Si les deux protéines n’interagissent pas, alors seul le signal émis par la luciférase est détecté à 480 nm. Dans le cas contraire, le transfert d’énergie de la RLuc vers la GFP conduit à l’émission d’un signal supplémentaire à 530 nm (Figure 12A)^{49, 50}. Parmi les critères nécessaires au transfert d’énergie, la distance entre les deux protéines doit être inférieure à 10 nm et le spectre d’émission du donneur doit coïncider avec le spectre d’excitation de l’accepteur (Figure 12B)^{49, 50}.

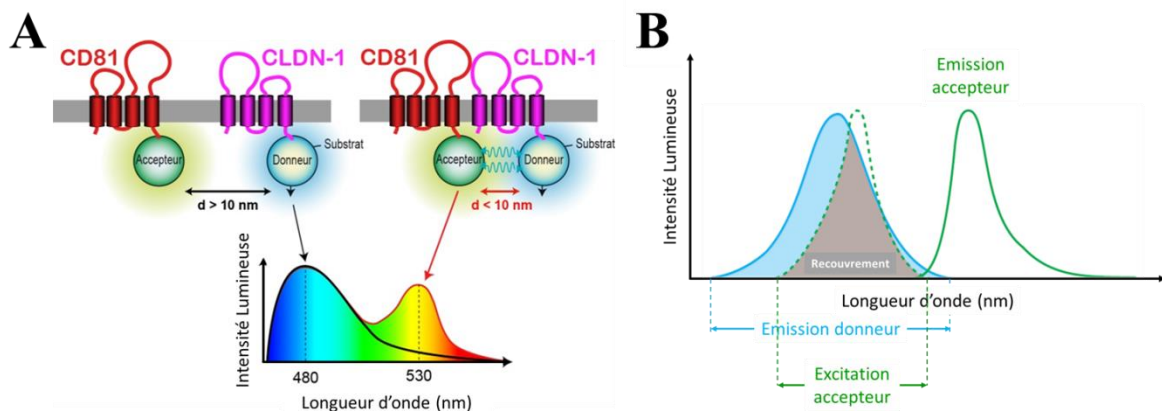


Figure 12 : A. Illustration de la technologie de BRET

B. Représentation du recouvrement du spectre d’émission du donneur et du spectre d’excitation de l’accepteur

Cette technologie a été utilisée pour suivre l’interaction entre les protéines CD81 et CLDN-1 ce qui a permis de réaliser un criblage d’une chimiothèque généraliste de 14400 molécules.

II.2.2. Propriétés physico-chimiques des 14400 molécules

Les 14400 molécules criblées ont été achetées auprès des fournisseurs Asinex et ChemDiv. Ces composés ont été sélectionnés à la fois sur la base des règles énoncées par Lipinski et Veber, mais aussi sur des critères structuraux, puisque tout composé présentant une fonction électrophile a été écarté.

Afin de pouvoir estimer les chances d'une molécule à présenter une bonne biodisponibilité, des règles, construites sur l'étude des propriétés physico-chimiques d'un panel de composés mis sur le marché avant les années 2000, ont été proposées. Suite à cette étude, quatre propriétés structurales ont été identifiées comme critiques pour la biodisponibilité, et la règle dite des 5 a été publiée Lipinski *et al.*⁵¹ en 2001. Cette règle stipule qu'une bonne absorption ou perméabilité est plus probable lorsque le composé présente au moins trois des critères suivants :

- une masse molaire (MW) inférieure à 500 g.mol⁻¹
- un nombre d'atomes accepteurs de liaisons hydrogène (Nombre H-Acc) inférieur à 10 (2x5)
- un nombre d'atomes donneurs de liaisons hydrogène (Nombre H-Don) inférieur à 5
- un clogP inférieur à 5

Cette règle a ensuite été complétée par celle présentée par Veber *et al.*⁵² dont les travaux se sont appuyés sur l'étude de 1100 composés dont la biodisponibilité orale chez l'animal était connue. Ainsi, cette étude a permis de mettre en évidence deux critères qui permettent de favoriser la biodisponibilité orale d'un composé :

- une surface polaire (PSA) inférieure à 140 Å²
- un nombre de liaisons à libre rotation (NRot) inférieur à 10

Ces six propriétés ont été calculées sur l'ensemble des 14400 molécules de la chimiothèque. Les résultats sont illustrés dans la Figure 13 sous forme d'histogrammes.

Chapitre I – Développement d’inhibiteurs de l’entrée du virus de l’hépatite C : découverte et synthèse de modulateurs de l’interaction CD81/CLDN-1

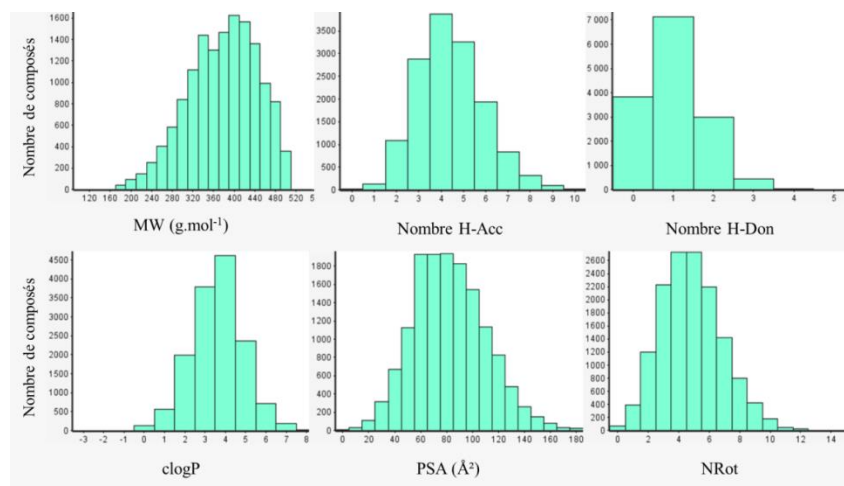


Figure 13 : Propriétés physico-chimiques des 14400 composés de la chimiothèque régionale

Ces résultats montrent que l’ensemble des composés de la chimiothèque respectent bien les deux règles énoncées précédemment et que par conséquent ce panel de composés constitue l’élément idéal pour démarrer un criblage biologique en vue de la recherche de hits.

II.2.3. Criblage d’une chimiothèque généraliste sur le complexe CD81/CLDN-1

Afin de tester rapidement l’ensemble de cette chimiothèque, tout en minimisant les quantités de matériel biologique nécessaire, le criblage a été effectué au format 384 puits et les molécules ont été testées à une concentration de 10 μM sur des cellules CHO. A l’issue du criblage, ce test a mis en évidence deux types de composés : des modulateurs de la conformation du complexe, capables d’augmenter le signal de BRET, et des modulateurs de la conformation du complexe capable de diminuer le signal de BRET (Figure 14).

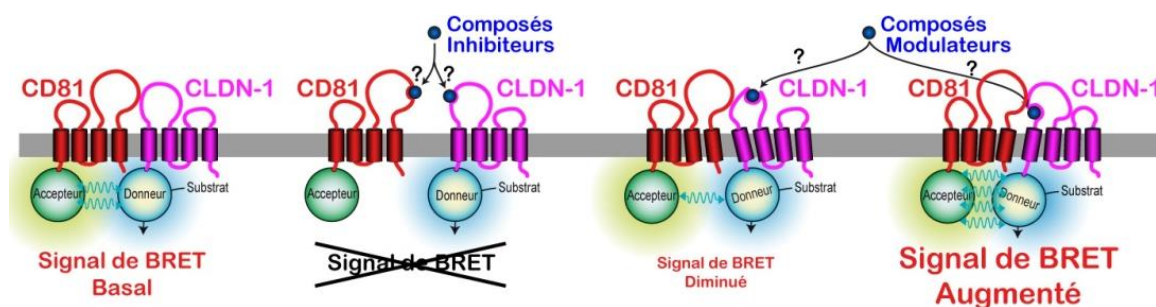


Figure 14 : Représentation schématique de l’effet sur le signal de BRET des composés inhibiteurs ou modulateurs du complexe CD81/CLDN-1

A la suite de ce criblage, les composés augmentant le signal de BRET au-delà de 190% ou le diminuant en dessous de 75% par rapport au signal de BRET basal ont été sélectionnés, soit au total 380 composés (Figure 15).

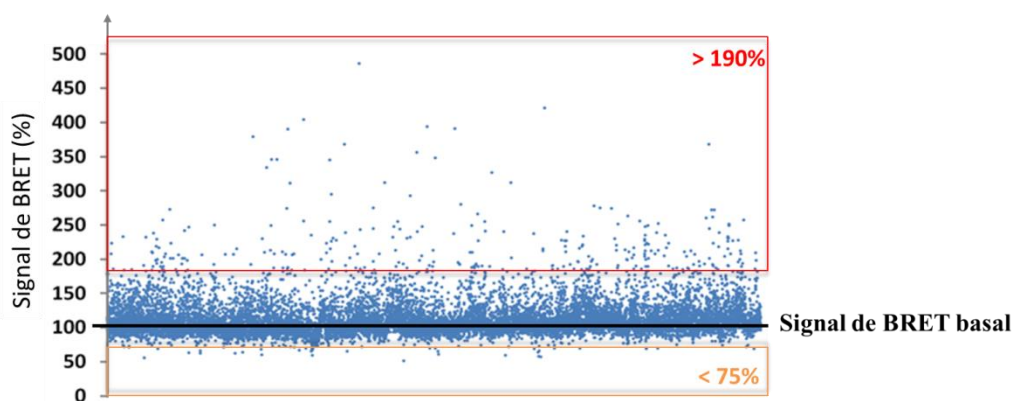


Figure 15 : Résultat du criblage primaire par la technologie de BRET

L'activité de ces composés a ensuite été confirmée par des expériences de dose-réponse au moyen du même test et en utilisant une gamme de concentrations allant de 40 nM à 10 μ M. 152 composés sont ainsi ressortis comme modulant de manière dose dépendante le signal de BRET et donc la conformation du complexe ciblé. Les composés toxiques pour les hépatocytes humains ont été éliminés et l'effet inhibiteur de l'entrée virale des 72 composés restants a été mesuré à partir d'un test permettant de suivre l'infection d'hépatocytes humains par le VHC et d'un autre permettant de suivre uniquement l'étape d'entrée du VHC dans les cellules.

II.3. Identification de modulateurs du complexe CD81/CLDN-1 et validation d'une famille d'inhibiteurs de l'entrée virale

II.3.1. Modèles d'études expérimentaux pour évaluer l'entrée du VHC dans les hépatocytes

Trois modèles d'étude ont été utilisés respectivement pour le suivi de l'inhibition de l'infection virale, le suivi de l'inhibition de l'entrée virale et l'évaluation de la spécificité des composés pour le VHC. En parallèle, la viabilité cellulaire des hépatocytes humains a été vérifiée (Figure 16).

Le premier modèle utilisé permet à la fois de déterminer l'inhibition de l'infection virale ainsi que l'éventuelle toxicité des composés. Ce modèle est basé sur la culture cellulaire permettant de produire efficacement des particules infectieuses du VHC (Figure 16A). Il repose sur la transfection d'une lignée d'hépatocytes humaines Huh-7 avec des ARN d'une souche isolée d'un patient atteint d'une hépatite fulminante. Ce système permet de produire des particules virales, appelées VHCcc, capables de réinfecter de nouvelles cellules Huh-7. Le génome viral des VHCcc est modifié pour exprimer la Firefly luciférase (FLuc) afin de suivre l'infection par luminescence après contamination des cellules Huh-7. Ces cellules expriment une autre luciférase, la Gaussia luciférase (GLuc), permettant de vérifier la viabilité cellulaire. Si le composé testé sur VHCcc conduit à une inhibition de l'infection virale sans diminuer la viabilité des cellules Huh-7, il est alors testé sur le second modèle cellulaire.

Ce second modèle permet de mesurer l'inhibition de l'entrée virale (Figure 16B). Il est basé sur l'utilisation de particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

spécifiques du VHC. Par conséquent, ces pseudo-particules, appelées VHCpp, expriment les glycoprotéines E1 et E2 à leurs surfaces. Elles sont obtenues par transfection de cellules humaines HEK-293T au moyen de trois vecteurs : le premier code pour les glycoprotéines E1 et E2, le deuxième exprime les protéines de la matrice, capside, nucléocapside, protéase, transcriptase inverse et intégrase du rétrovirus de la leucémie murine (différentes de celles du VHC, MVL) et le troisième exprime la FLuc. Les VHCpp sont sécrétées dans le surnageant de cultures cellulaires et sont utilisées pour infecter des hépatocytes humains Huh-7. L’infectiosité des VHCpp est déterminée par quantification de l’expression de la FLuc. Ce modèle ne permet d’étudier que l’étape d’entrée puisque ces particules ne possèdent pas le génome du VHC et ne sont donc pas capables de se répliquer une fois à l’intérieur des hépatocytes.

Enfin de manière à montrer la spécificité des composés pour le VHC, des pseudo-particules exprimant à leurs surfaces des protéines d’enveloppe du virus RD114 (différentes de celles du VHC) ont été utilisées. Ces pseudo-particules ont été construites selon le même schéma que celui décrit précédemment mais en utilisant un vecteur exprimant des glycoprotéines différentes de celles du VHC (Figure 16C).

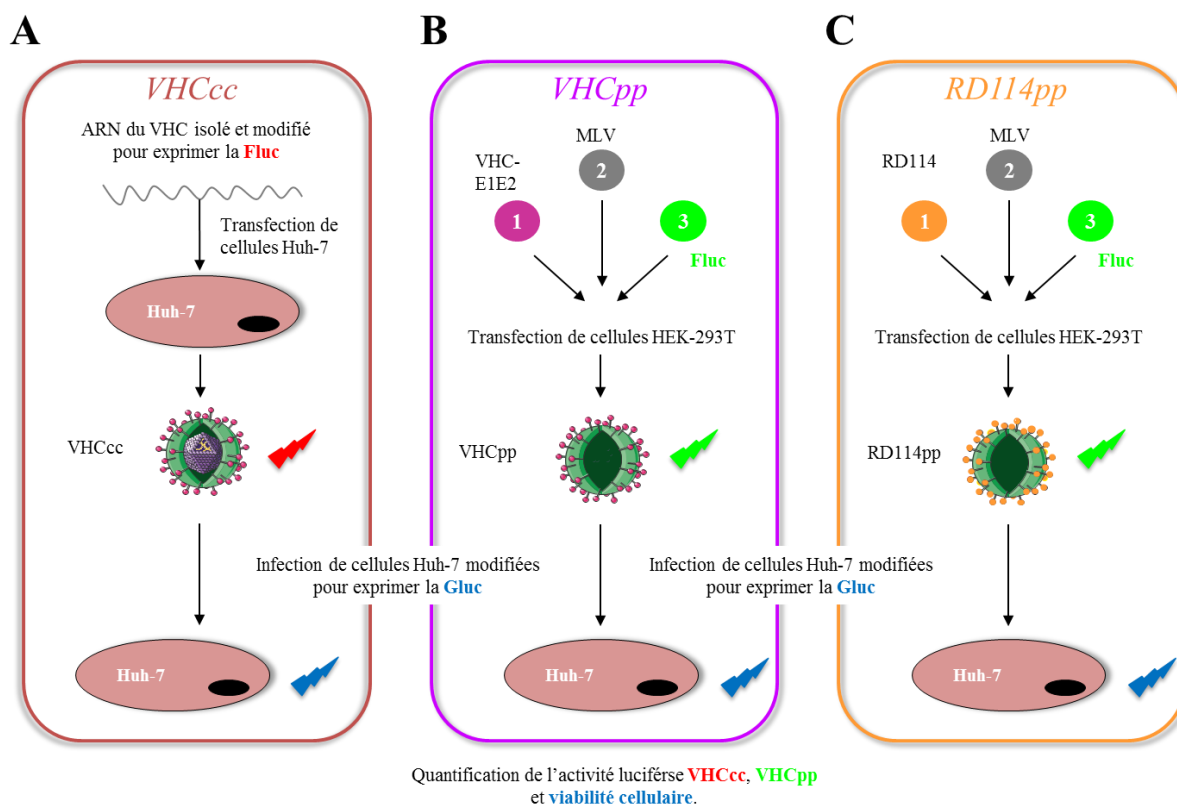


Figure 16 : Modèles d’études expérimentaux pour évaluer l’entrée du VHC dans les hépatocytes

- A. Modèle VHCcc permettant d’étudier l’inhibition de l’infection virale et de la viabilité des hépatocytes. Les particules virales possèdent les glycoprotéines d’enveloppe et le génome du VHC**
- B. Modèle VHCpp permettant d’étudier l’inhibition de l’entrée virale. Les pseudo-particules virales possèdent les glycoprotéines d’enveloppe du VHC et le génome du rétrovirus de la leucémie murine (MVL)**
- C. Modèle RD114pp permettant d’étudier la spécificité des composés pour le VHC. Les pseudo-particules virales possèdent les glycoprotéines d’enveloppe du virus RD114 et le génome du rétrovirus MVL**

Ces trois modèles expérimentaux ont été utilisés pour identifier des composés capables d’inhiber l’entrée virale.

II.3.2. Identification d'une famille de modulateurs du complexe CD81/CLDN-1 capables d'inhiber l'entrée du VHC dans les hépatocytes

Les 72 composés sélectionnés à partir du criblage BRET ont été testés sur ces trois systèmes cellulaires à une concentration de 10 μM . 24 produits ont montré une inhibition de l'infection des hépatocytes par les VHCcc et VHCpp de plus de 50% sans inhiber l'infection par le virus RD114. L'activité de ces 24 composés a ensuite été confirmée par des expériences de dose réponse en utilisant une gamme de concentrations allant de 40 nM à 10 μM . Une inhibition dose dépendante de l'infection virale par les VHCcc et VHCpp a ainsi pu être observée.

Ceci a permis d'identifier une famille chimique de quatre modulateurs du complexe CD81/CLDN-1 capables d'inhiber l'entrée virale avec des IC_{50} de l'ordre du micromolaire (Tableau 3).

Cpd	Structure	IC_{50} VHCcc (μM)	IC_{50} VHCpp (μM)	Cpd	Structure	IC_{50} VHCcc (μM)	IC_{50} VHCpp (μM)
1		1.0	1.1	2		0.6	1.1
3		1.0	0.9	4		3.2	7.6

Tableau 3 : Structures et activités biologiques des 4 composés de la famille identifiée et sélectionnée

Ces 4 composés possèdent tous un noyau thiéno[2,3-c]pyrazole substitué en position 1 par un méthyle, en position 3 par un phényle et en position 5 par une fonction amide. L'atome d'azote de cette fonction amide est lié à une amine protonable par une chaîne carbonée constituée de trois chaînons méthyléniques. Plusieurs stratégies ont été envisagées pour modifier les différentes régions de cette entité moléculaire afin de pouvoir établir des relations structure-activité.

III. Relations structure-activité en série thiényopyrazole

Après avoir identifié et sélectionné 4 hits présentant le même squelette thiényopyrazole, différentes parties de la molécule de référence **1** ont été modifiées pendant la phase d'optimisation afin d'établir des relations structure-activité. Ces modifications sont présentées en Figure 17.

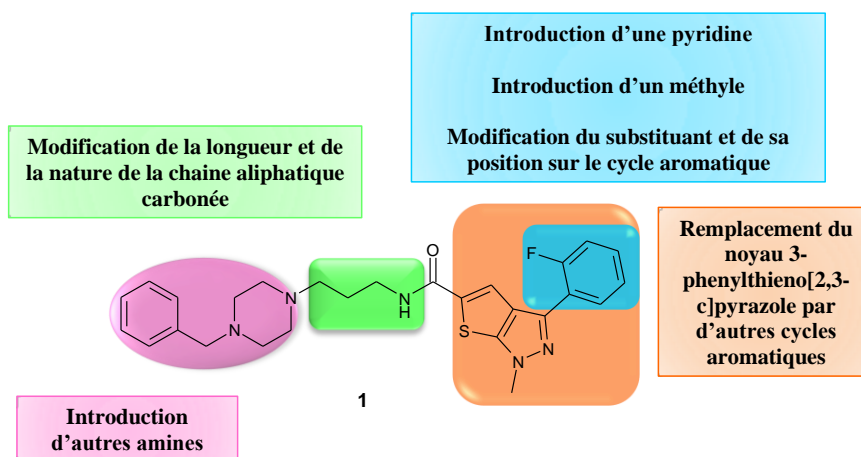


Figure 17 : Modifications envisagées pour l'optimisation du composé **1**

Dans un premier temps, et dans le but de valider l'importance du cycle 3-phénylthieno[2,3-c]pyrazole, son remplacement par un benzène, un thiophène, ou des cycles quinoléines, naphtyles et bi-phényles a été envisagé.

La nature du groupement en position 3 du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole a ensuite été modifiée en introduisant une pyridine ou un groupement méthyle. Par la suite, l'effet électronique et la position du substituant présent sur le cycle phényle ont été évalués.

Les modifications précédemment décrites ont été réalisées à la fois avec la benzylpipérazine, pour obtenir des analogues de la molécule **1**, et avec la 3,5-diméthylpipéridine, pour obtenir des analogues de la molécule **2**.

Une réduction d'un chaînon méthylénique de la chaîne aliphatique carbonée, son élimination ou sa rigidification par l'introduction d'un groupement alcyne, ont permis d'évaluer l'importance de cette chaîne pour l'activité du composé. Par ailleurs, il a été envisagé de substituer l'atome d'azote de la fonction amide par un méthyle afin de compléter ces relations structure-activité.

Pour finir, la modification de la benzylpipérazine de la molécule **1** a très largement été explorée afin d'examiner l'impact :

- de la basicité (*via* le remplacement de la pipérazine par une pipéridine, une morpholine, un imidazole ou un cyclohexyle)
- de l'encombrement stérique (*via* le remplacement de la benzylpipérazine par des groupements phénylpipérazine ou méthylpipérazine)
- du nombre d'atomes d'azote protonables

- du remplacement de la benzylpipérazine par une fonction éther ou des amines aliphatiques non cycliques.

Afin d'évaluer l'inhibition de l'infection virale, l'inhibition de l'entrée du VHC dans les hépatocytes, la spécificité pour le VHC et la non toxicité des composés pour les hépatocytes, tous les analogues synthétisés ont été testés sur les 3 modèles cellulaires décrits précédemment (Figure 16). Les composés qui ne permettaient pas d'inhiber l'infection virale n'ont pas été testés sur le modèle cellulaire spécifique de l'entrée virale (VHCpp).

III.1. Importance du noyau 3-phénylthiéno[2,3-c]pyrazole

III.1.1. Analogues envisagés

L'importance du noyau 3-phénylthiéno[2,3-c]pyrazole a été évaluée sur les composés **1** et **2** (série benzylpipérazine et 3,5-diméthylpipéridine respectivement), en remplaçant cet hétérocycle par différents cycles aromatiques tels qu'un phényle, des bi-phényles et des naphtyles. Des cycles hétéroaromatiques tels qu'un thiophène et des quinoléines ont également été introduits (Figure 18).

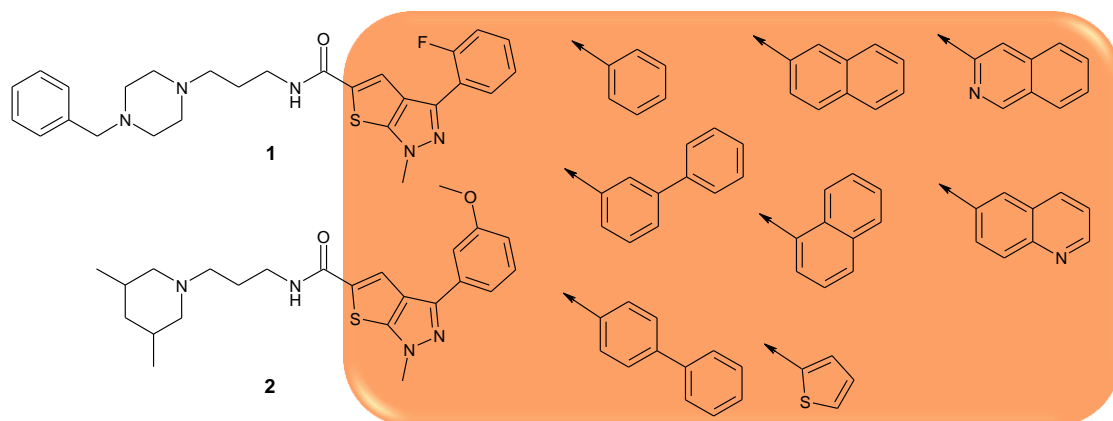


Figure 18 : Analogues des composés **1** et **2** obtenus en modifiant le noyau 3-phénylthiéno[2,3-c]pyrazole

III.1.2. Synthèses des composés **13** à **26**

La voie de synthèse des composés **13** à **26** est présentée Figure 19. Les deux composés de référence **1** et **2** ont également été re-synthétisés afin de confirmer leur activité. La voie de synthèse des deux composés de référence sera détaillée dans la prochaine partie III.2.

Chapitre I – Développement d'inhibiteurs de l'entrée du virus de l'hépatite C : découverte et synthèse de modulateurs de l'interaction CD81/CLDN-1

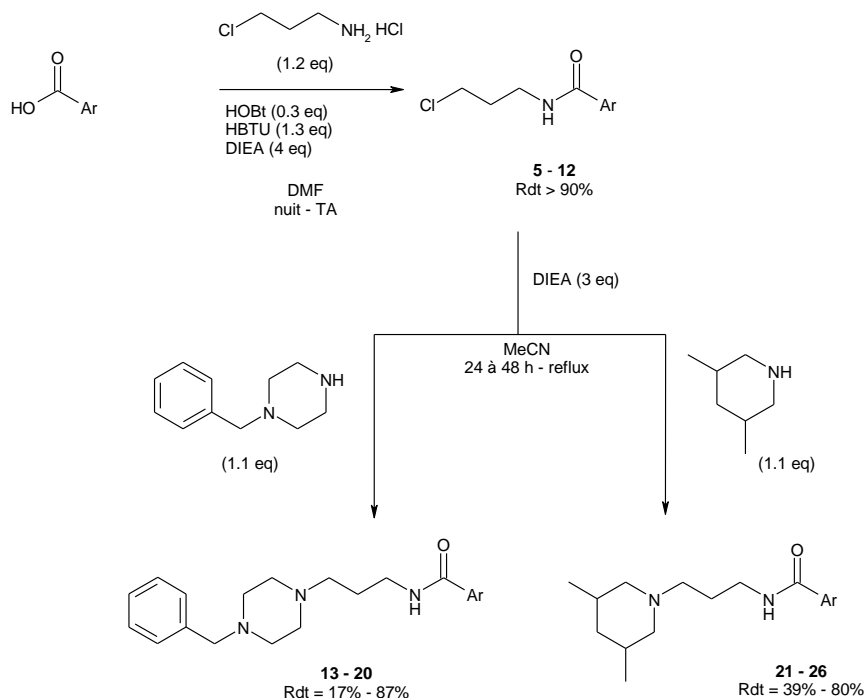


Figure 19 : Schéma de synthèse des composés 13 à 26

La première étape a consisté à former les amides (**5 à 12**) en couplant les acides carboxyliques aromatiques commercialement disponibles avec le chlorhydrate de la 3-chloropropylamine en utilisant l'HOBt et l'HBTU comme agents d'activation, la diisopropyléthylamine (DIEA) comme base et le DMF comme solvant. Les intermédiaires **5 à 12** ont été obtenus avec des rendements supérieurs à 90%. Le mécanisme réactionnel de cette étape de couplage est détaillé en Figure 20.

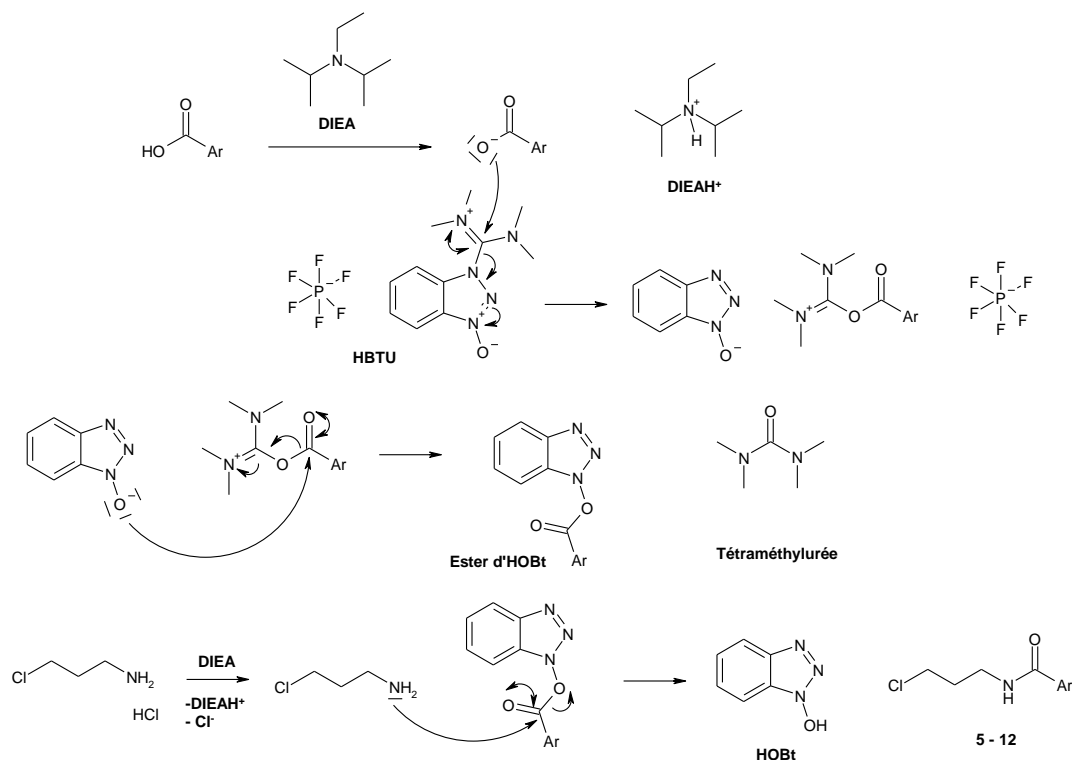


Figure 20 : Mécanisme réactionnel de couplage entre un acide carboxylique et le chlorhydrate de la 3-chloropropylamine en présence d'HOBt/HBTU

L’HBTU est un agent de couplage découvert en 1978. Sa structure a été caractérisée par diffraction des rayons X permettant de confirmer qu’il s’agit d’un sel de guanidinium et non d’uronium⁵³. Il est utilisé afin de générer une espèce activée, l’ester d’HOBt, à partir de l’acide carboxylique correspondant et de la base DIEA. Ensuite, l’utilisation de la DIEA permet également d’obtenir la 3-chloropropylamine sous forme libre. Celle-ci réagit avec l’ester d’HOBt afin de conduire à la formation de l’amide désiré (composés **5** à **12**) et à la régénération de l’HOBt.

Les composés **13** à **20** et **21** à **26** ont respectivement été obtenus par substitution nucléophile de la benzylpipérazine ou de la 3,5-diméthylpipéridine sur les dérivés chlorés **5** à **12**. Cette réaction de substitution nucléophile a été effectuée en présence de DIEA dans l’acétonitrile⁵⁴. A l’issue d’une purification en phase inverse, les produits **13** à **20** (série benzylpipérazine) ont été obtenus avec des rendements allant de 17% à 87% et les produits **21** à **26** (série 3,5-diméthylpipéridine) ont été isolés avec des rendements variant de 39% à 80%. Ces produits ainsi que les produits de référence re-synthétisés ont d’abord été testés sur le modèle cellulaire des VHCcc afin d’évaluer leur capacité à inhiber l’infection virale.

III.1.3. Résultats et discussion

Les résultats biologiques obtenus pour les composés **13** à **26** sont présentés dans le Tableau 4.

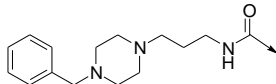
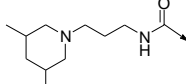
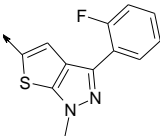
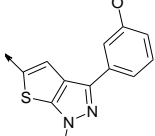

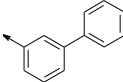
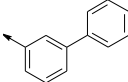
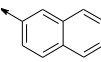
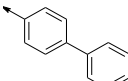

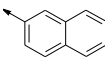


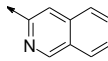

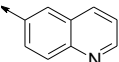
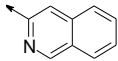
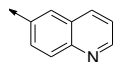
					
Composé	Groupement	IC ₅₀ (μM) VHCcc	Composé	Groupement	IC ₅₀ (μM) VHCcc
1, référence		2.6	2, référence		0.8
13		> 10	21		> 10
14		> 10	22		> 10
15		> 10	23		> 10
16		> 10	24		> 10
17		> 10	25		> 10
18		> 10	26		> 10
19		> 10			
20		> 10			

Tableau 4 : Résultats biologiques obtenus pour les composés **1,2 13** à **26**

Ces premiers résultats montrent que les composés de référence re-synthétisés **1** et **2** conservent des activités de l'ordre du micromolaire (**1**, $IC_{50} = 2.6 \mu M$ – **2**, $IC_{50} = 0.8 \mu M$) similaires à celles obtenues lors du criblage de la chimiothèque (**1**, $IC_{50} = 1.0 \mu M$ – **2**, $IC_{50} = 0.6 \mu M$).

En revanche, lorsque le noyau 3-phénylthiéno[2,3-c]pyrazole est remplacé par des groupements phényle (**13**), bi-phényles (**14**, **15**, **21**), naphthyles (**16**, **17**, **22** et **23**), thiophène (**18** et **24**) et quinoléines (**19**, **20**, **25** et **26**) aucune activité n'est observée dans la gamme de concentration testée (de 40 nM à 10 μM). Ainsi, ces résultats mettent en évidence la nécessité du noyau 3-phénylthiéno[2,3-c]pyrazole pour l'inhibition de l'infection virale.

III.2. Modification du substituant en position 3 du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole

III.2.1. Analogues envisagés

Afin d'évaluer l'importance du groupement phényle, en position 3 du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole, pour l'activité des composés, le groupement 2-F-phényle en série benzylpipérazine et le groupement 3-OMe-phényle en série 3,5-diméthylpipéridine ont été remplacés par un groupement méthyle. L'effet électronique sur le cycle phényle a été investigué en introduisant des groupements électrodonneurs ou électroattracteurs en différentes positions. Un analogue pyridine a également été envisagé pour étudier l'influence de l'introduction d'un hétéroatome. Les différents analogues, présentés en Figure 21, ont été synthétisés en séries benzylpipérazine et 3,5-diméthylpipéridine.

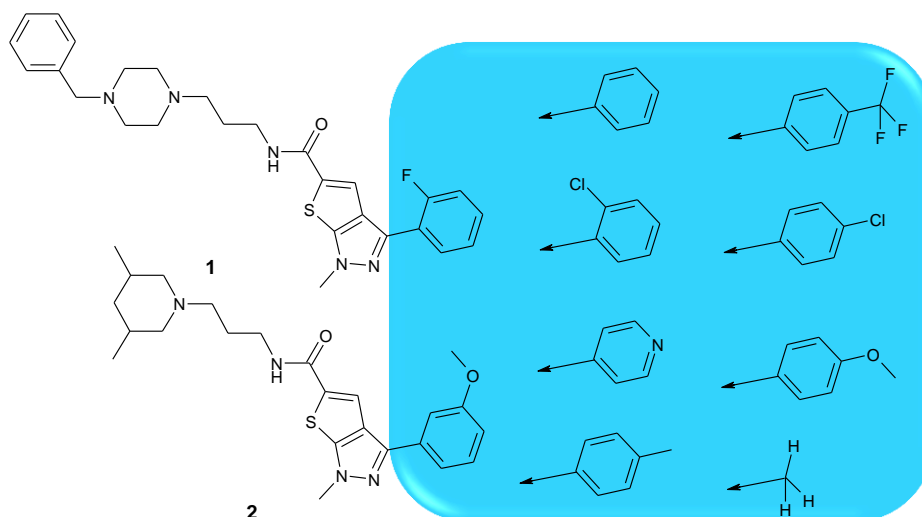


Figure 21 : Analogues des composés **1** et **2** obtenus en modifiant le substituant en position 3 du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole

III.2.2. Rétro-synthèse et synthèses envisagées pour l'obtention des analogues en série thiéno-pyrazole

III.2.2.1. Rétro-synthèse envisagée

L'arbre de rétrosynthèse utilisé pour synthétiser les composés de référence **1** et **2** et obtenir leurs analogues directs est présenté en Figure 22.

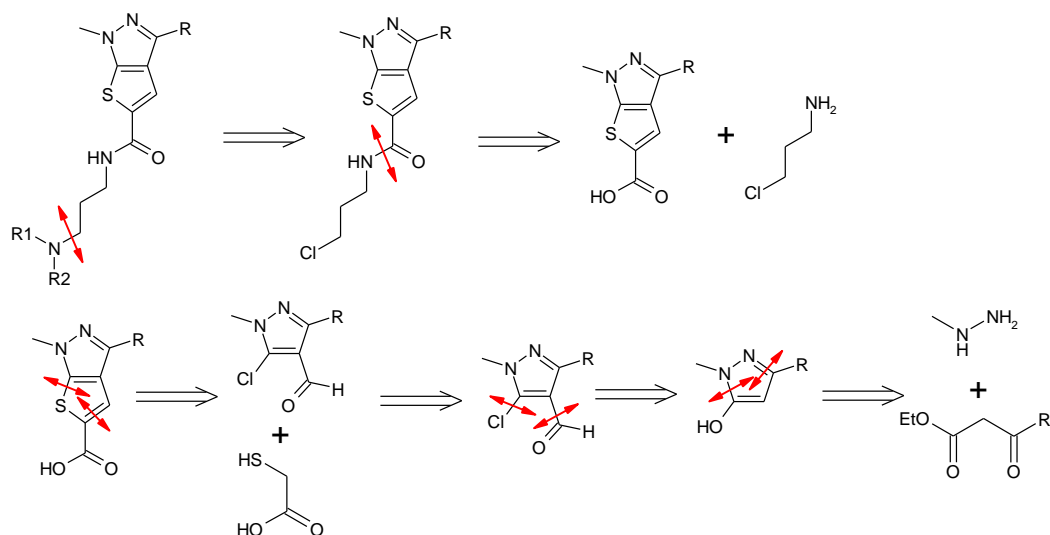


Figure 22 : Arbre de rétro-synthèse global en série thiéno-pyrazole

Cette voie rétro-synthétique est composée de 6 étapes. L'amine tertiaire est introduite par substitution nucléophile sur le dérivé chloré lui-même obtenu par couplage entre l'acide carboxylique branché en position 5 du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole et la chloropropylamine. Ce noyau hétérocyclique peut être obtenu à partir du cycle pyrazole, chloré en position 5 et formylé en position 4, condensé avec l'acide thioglycolique. La chloration et la formylation du cycle pyrazole peuvent s'effectuer sur l'analogue pyrazole hydroxylé en position 5 qui est obtenu par condensation de la méthylhydrazine sur le dérivé β -cétoesters approprié.

Cet arbre rétro-synthétique a permis de synthétiser les deux produits de références **1** et **2** ainsi que leurs analogues modifiés en position 3 du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole.

III.2.2.2. Synthèse des intermédiaires thiéno-pyrazole présentant une fonction acide carboxylique à partir des β -cétoesters commercialement disponibles

Comme nous l'avons vu avec l'arbre de rétro-synthèse, la première étape a consisté à obtenir les intermédiaires 1-méthyle-5-hydroxy-pyrazoles substitués par des groupements différents en positions 3 à partir des β -cétoesters commercialement disponibles et de la méthylhydrazine⁵⁵ selon le schéma de synthèse présenté en Figure 23 :

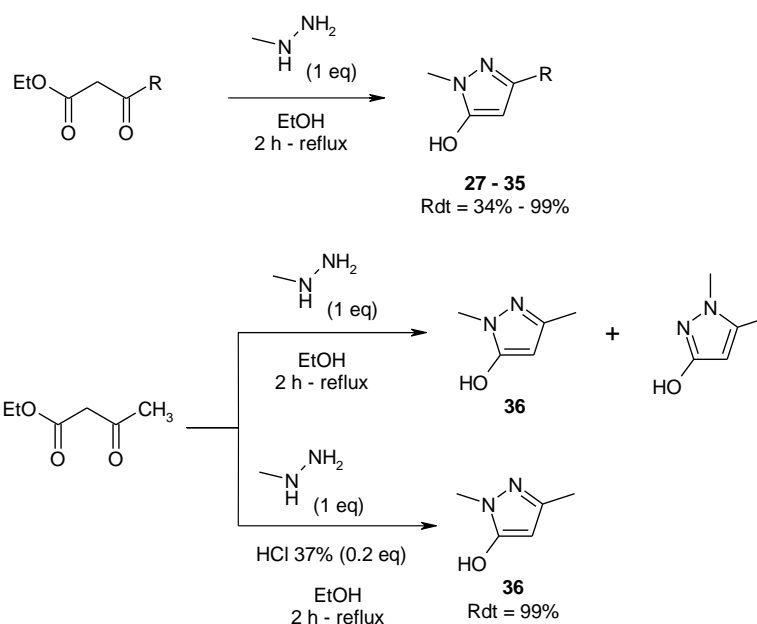


Figure 23 : Schéma de synthèse des composés 27 à 36

Cette première étape correspond à une réaction de couplage entre l'atome d'azote disubstitué de la méthylhydrazine et l'ester éthylique du dérivé β -cétoesters engagé dans la synthèse. Le second atome d'azote attaque ensuite la cétone de façon intramoléculaire pour aboutir après prototropie et élimination d'une molécule d'eau au produit de cyclisation. Enfin cet intermédiaire conduit au pyrazole attendu par tautomérie.

Le mécanisme réactionnel générique pour la formation des différents pyrazoles attendus est proposé en Figure 24.

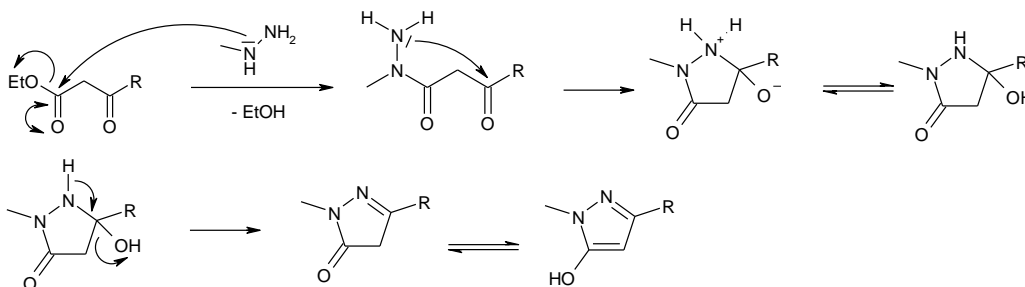


Figure 24 : Mécanisme réactionnel pour la synthèse du pyrazole attendu

A partir des conditions réactionnelles décrites dans la littérature⁵⁵, seul l'isomère désiré a été observé et isolé pour les composés **27** à **35**. En revanche, lorsque ces mêmes conditions ont été appliquées pour obtenir le composé **36**, deux isomères ont été observés dans des proportions identiques (Figure 23). L'ajout de 0.2 équivalent d'une solution d'acide chlorhydrique concentrée à 37% a permis d'observer et d'isoler seulement l'isomère **36** désiré. Sa structure a été confirmée par analyse RMN à 2 dimensions.

Les composés **27** à **36** ont été obtenus après purification avec des rendements allant de 34% à 99% (Tableau 5). Le faible rendement obtenu pour le composé **30** peut être expliqué par l'encombrement stérique plus important lié par la présence de l'atome de chlore en position 2 du cycle aromatique.

β -cétocesters	Structure	Rdt	β -cétocesters	Structure	Rdt
		82%			99%
		82%			99%
		82%			99%
		34%			65%
		98%			99%

Tableau 5 : Rendements de l'étape de formation du pyrazole pour les composés 27 à 36

La formylation des composés **27** à **36** a été réalisée via la formation *in situ* du réactif de Vilsmeier-Haack^{56, 57}. Le trichlorure de phosphoryle (POCl_3) et le DMF ont été mis en réaction dans un premier temps à 0 °C pendant 30 min de manière à former le réactif de Vilsmeier-Haack. Puis chaque pyrazole (**27** à **36**), en solution dans le DMF, a été ajouté séparément à ce mélange en présence de POCl_3 . La solution a alors été agitée pendant 24 h à 115 °C (Figure 25).

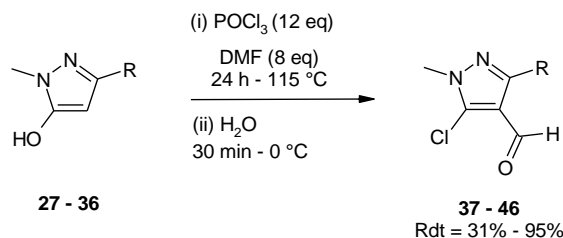


Figure 25 : Schéma de synthèse des composés 37 à 46

Le mécanisme réactionnel pour cette étape est illustré en trois temps (Figure 26, Figure 27, Figure 28). Dans un premier temps, le réactif de Vilsmeier-Haack est formé *in situ* par addition nucléophile du DMF sur POCl_3 (Figure 26).

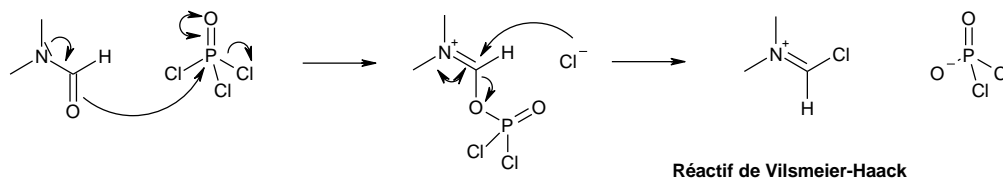


Figure 26 : Mécanisme réactionnel de formation du réactif de Vilsmeier-Haack

L'intermédiaire iminium est ensuite formé par substitution électrophile du réactif de Vilsmeier-Haack en position 4 du noyau pyrazole (Figure 27).

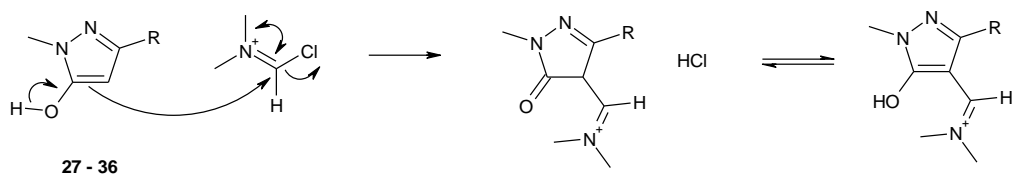


Figure 27 : Mécanisme réactionnel pour la formation de l'intermédiaire iminium

Le groupement hydroxyle réagit ensuite avec POCl_3 pour conduire à la formation du dérivé 5-chloro-pyrazole (Figure 28).

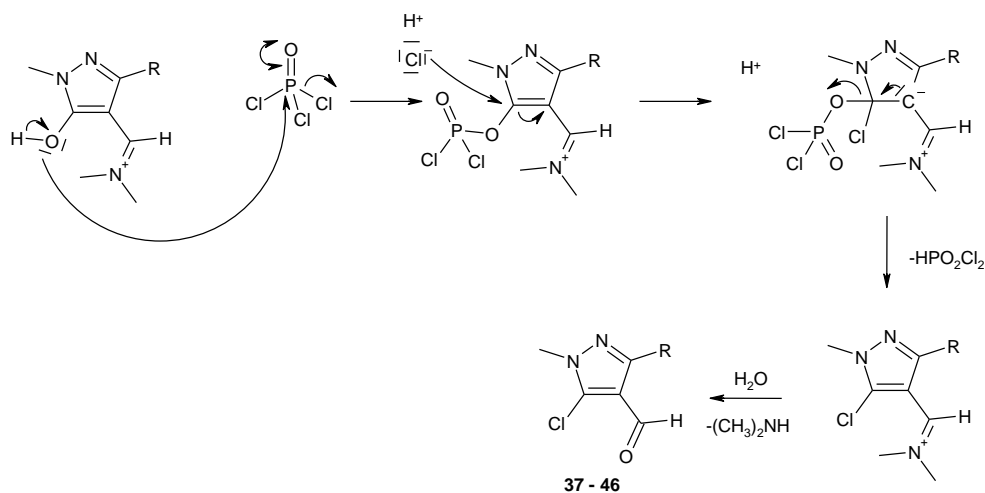


Figure 28 : Mécanisme réactionnel de formation du pyrazole chloré en position 5 et formylé en position 4

La réaction de chloration est réalisée par l'attaque nucléophile de la fonction hydroxyle sur POCl_3 ce qui permet de former le groupement PO_2Cl_2 qui présente une meilleure aptitude nucléofuge que le groupement hydroxyle. Puis, la substitution nucléophile aromatique par l'ion chlorure conduit au produit chloré. Enfin, l'iminium est hydrolysé pour conduire aux composés **37** à **46**.

Une optimisation des conditions réactionnelles a été nécessaire pour pouvoir réaliser dans une même étape la chloration et la formylation du noyau pyrazole. En effet, dans un premier temps, un excès de POCl_3 était utilisé dans le DMF pour former le réactif de Vilsmeier-Haack. L'addition du composé **27**, en solution dans le DMF, au réactif de Vilsmeier-Haack sans rajout de POCl_3 supplémentaire conduisait uniquement à la formylation du pyrazole et non à sa chloration. Pour cette raison, il a été décidé de rajouter une quantité de POCl_3 similaire à celle de DMF, utilisée pour solubiliser le composé **27**, de manière à chlorer le pyrazole. Les différents rendements obtenus pour les produits **37** à **46** sont présentés dans le Tableau 6.

Composé	Structure	Rendement	Composé	Structure	Rendement
37		87%	42		87%
38		31%	43		50%
39		83%	44		95%
40		87%	45		93%
41		92%	46		63%

Tableau 6 : Rendements de l'étape de chloration et formylation pour les composés 37 à 46

Les composés **37** à **46** ont été obtenus après purification avec des rendements allant de 31% à 93%. Le faible rendement obtenu pour le composé **38** (31%) s'explique par la formation d'un produit secondaire. Après purification et caractérisation par RMN et LC/MS, ce produit secondaire a été identifié comme étant le 5-chloro-3-(3-hydroxyphényle)-1-méthyle-4-formyl-pyrazole. Le mécanisme de formation proposé pour la synthèse de ce produit secondaire est présenté en Figure 29.

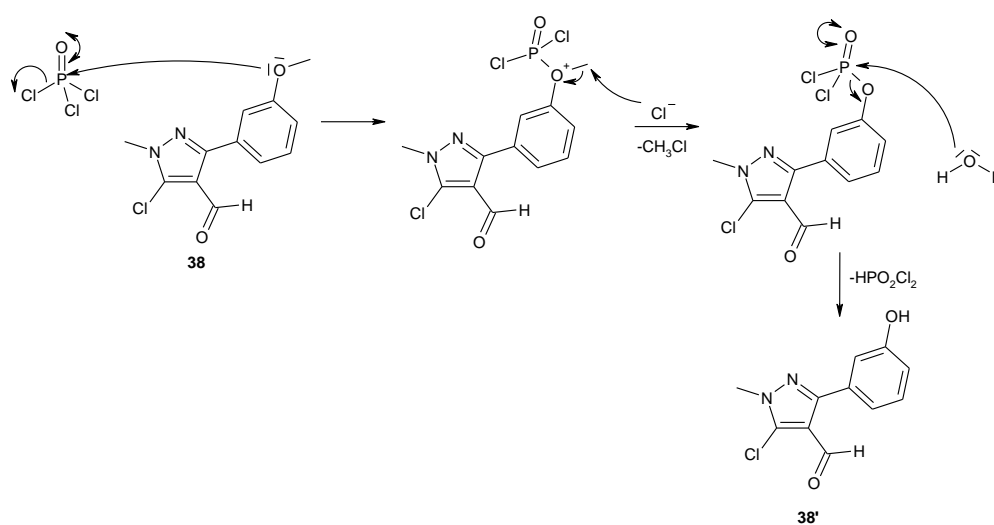


Figure 29 : Mécanisme réactionnel proposé pour la formation du produit secondaire 38'

Le noyau thiényopyrazole a ensuite été formé à partir des composés **37** à **46** obtenus précédemment. Comme cela a été décrit dans la littérature⁵⁸, la formation du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole a été effectuée par réaction des dérivés 5-chloro-1-méthyle-4-formyl-pyrazoles avec l’acide thioglycolique en présence d’hydroxyde de potassium (KOH) dans un mélange méthanol/eau (8/2). La réaction a été menée à 80 °C pendant 24 h. Cependant, après ce délai aucun produit n’a été observé. Il a donc été décidé de réaliser cette réaction au moyen de l’ester thioglycolate d’éthyle et de saponifier l’ester obtenu. La réaction a été réalisée en présence de carbonate de sodium (Na₂CO₃) dans l’éthanol à 80 °C pendant 24 h⁵⁹. L’utilisation de ces conditions réactionnelles a donc permis d’isoler les composés désirés (**47** à **56**). Ces voies réactionnelles sont présentées en Figure 30.

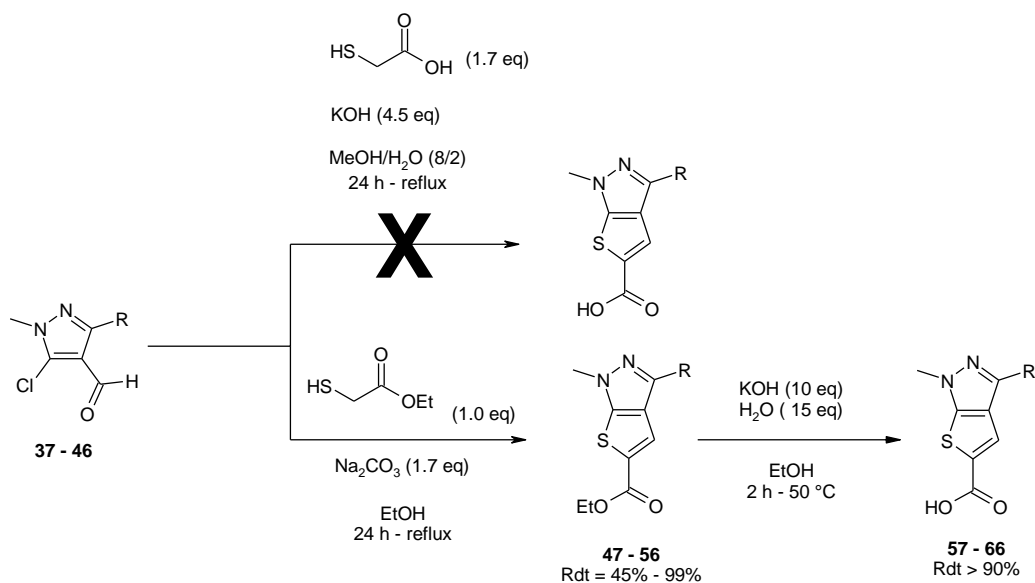


Figure 30 : Schéma de synthèse des composés **47** à **56**

Le mécanisme de formation du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole, en deux étapes, est illustré dans la Figure 31.

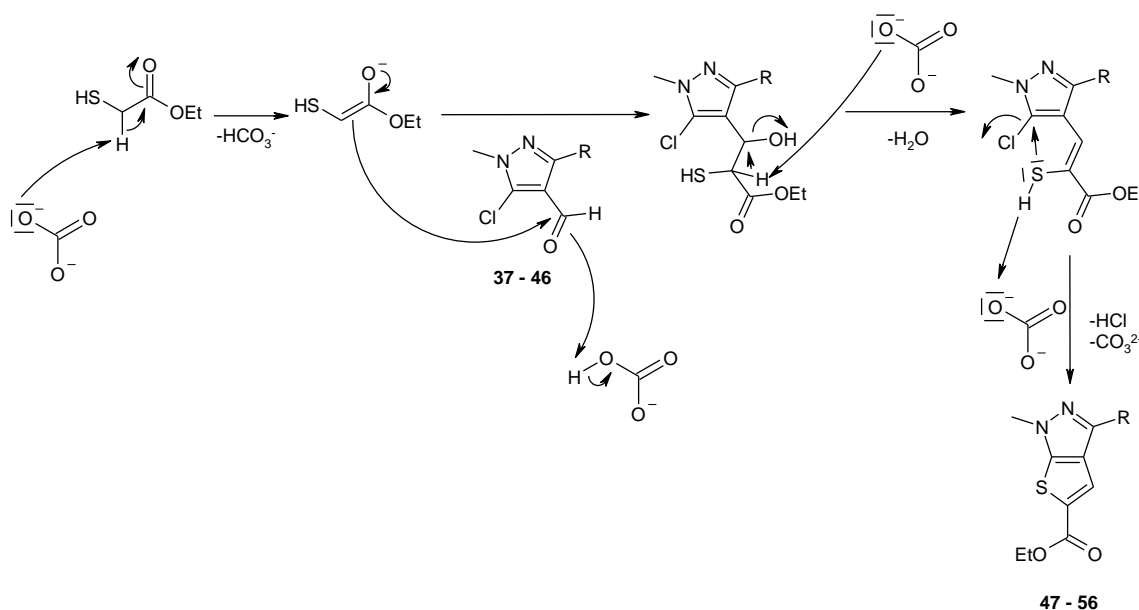


Figure 31 : Mécanisme de formation du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole

La base arrache le proton en α de la fonction carbonyle du thioglycolate d’éthyle puis le carbanion obtenu réagit sur la fonction aldéhyde présente sur le noyau pyrazole. Après élimination d’une molécule d’eau, une substitution nucléophile aromatique intramoléculaire via l’attaque du soufre sur le carbone portant le chlore permet d’aboutir à la formation du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole désiré (composés **47** à **56**). Les différents rendements obtenus pour les produits **47** à **56** sont présentés dans le Tableau 7.

Composé	Structure	Rendement	Composé	Structure	Rendement
47		65%	52		98%
48		98%	53		98%
49		51%	54		87%
50		45%	55		49%
51		56%	56		99%

Tableau 7 : Rendements de l’étape de cyclisation permettant la synthèse des composés **47** à **56**

Les composés **47** à **56** ont été obtenus après purification avec des rendements allant de 45% à 99%.

La saponification en présence d’hydroxyde de potassium (KOH) dans l’éthanol a conduit à la formation des acides carboxyliques correspondants (**57** à **66**) avec des rendements variant de 80% à 95% (Figure 32).

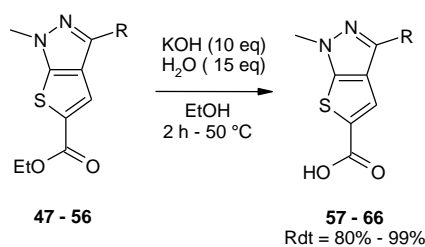


Figure 32 : Schéma de synthèse des composés 57 à 66

III.2.2.3. Formation des dérivés N-[3-(4-benzylpipérazin-1-yl)propyl]-amide et N-[3-(3,5-diméthyl-1-pipéridyl)propyl]-amide à partir des acides carboxyliques 57 à 66

Deux étapes ont été nécessaires pour obtenir les composés **1** et **77** à **85** de la série benzylpipérazine et **2** et **86** à **93** de la série 3,5-diméthylpipéridine. Ces deux étapes, identiques à celles présentées dans la section III.1, ont consisté en un couplage entre les intermédiaires acides carboxyliques **57** à **66** et le chlorhydrate de la 3-chloropropylamine puis en une substitution nucléophile des dérivés chlorés obtenus **67** à **76** par la benzylpipérazine (composés **1** et **77** à **85**) ou par la 3,5-diméthylpipéridine (composés **2** et **86** à **93**).

La réaction de couplage a été mise au point à partir du chlorhydrate de la 3-chloropropylamine et de l'acide carboxylique **59** précédemment synthétisé. Pour cela, deux agents de couplage ont été essayés : l'HBTU associé à l'HOBt et l'anhydride propylphosphonique T3P (Figure 33).

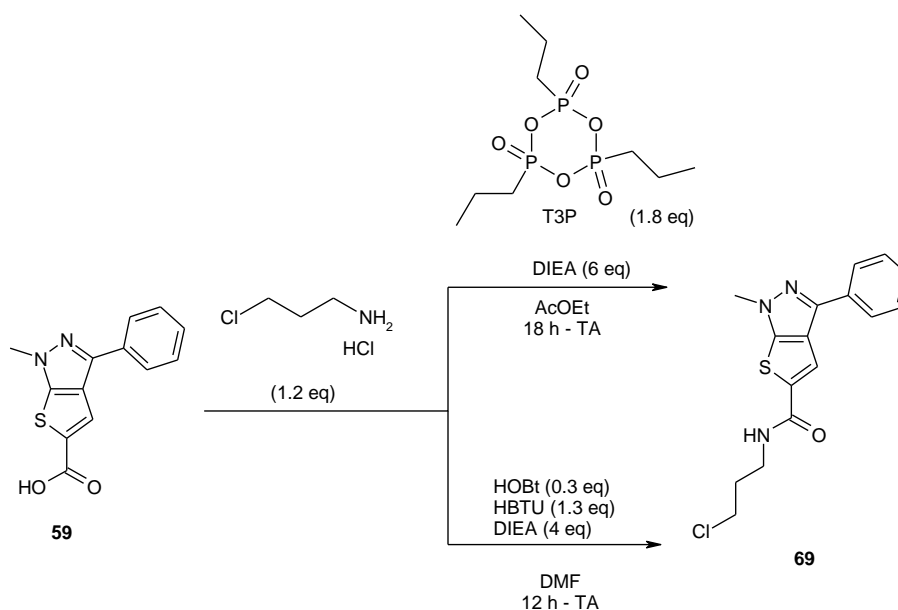


Figure 33 : Essais de couplage entre l'intermédiaire acide carboxylique **59** et le chlorhydrate de la 3-chloropropylamine

Bien qu'une conversion égale à 83% du réactif **59** en produit désiré **69** ait été observée après 18 h de réaction avec l'agent de couplage T3P dans l'AcOEt, ces conditions n'ont pas été retenues puisque l'utilisation d'HBTU en présence d'HOBt dans le DMF a permis d'observer une conversion totale du réactif de départ **59** après 12 h de réaction. C'est donc cette seconde condition qui a été choisie et qui a permis l'obtention des composés **67** à **76** avec des rendements supérieurs à 80%.

Les composés **1**, **77** à **85** et **2**, **86** à **93** ont été obtenus par substitution nucléophile (S_N2) des dérivés chlorés **67** à **76** par la benzylpipérazine ou la 3,5-diméthylpipéridine respectivement. Cette réaction a été effectuée en présence de DIEA dans l'acétonitrile⁵⁴. Le choix de ce solvant pour cette S_N2 se justifie par le fait qu'il s'agit d'un solvant aprotique, permettant de renforcer la réactivité nucléophile de l'amine puisqu'aucune liaison hydrogène ne peut être formée avec le solvant, et polaire afin de dissoudre l'amine (Figure 34).

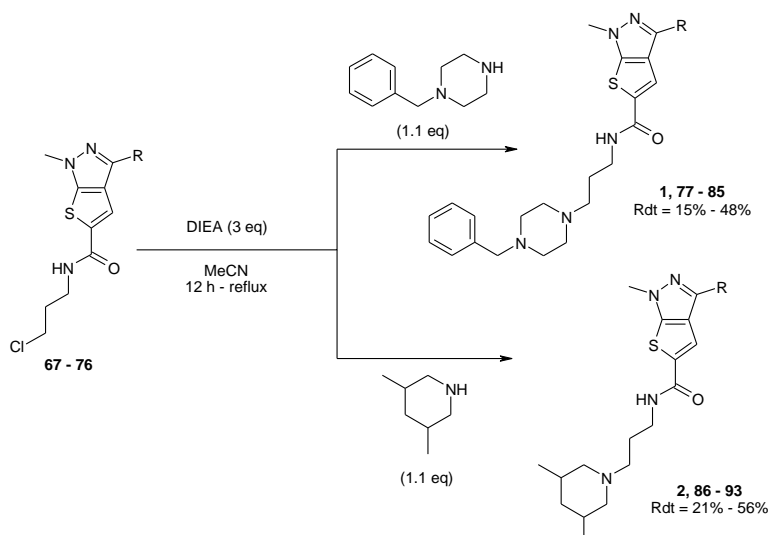


Figure 34 : Schéma de synthèse des composés **1**, **2**, **77** à **85** et **86** à **93**

Les différents rendements obtenus pour les synthèses des produits **1**, **2**, **77** à **93** sont présentés dans le Tableau 8.

Chapitre I – Développement d'inhibiteurs de l'entrée du virus de l'hépatite C : découverte et synthèse de modulateurs de l'interaction CD81/CLDN-1

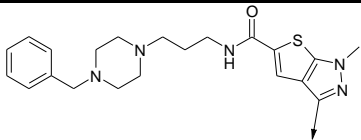
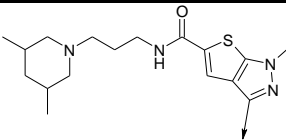
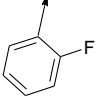
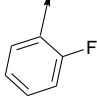
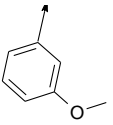
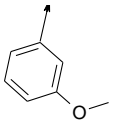


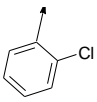
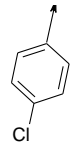
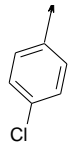
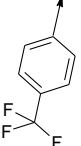
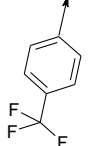
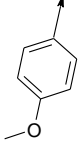
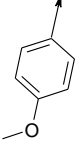
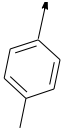
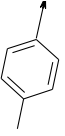
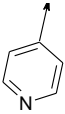
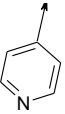


					
Composé	Substituant	Rendement	Composé	Substituant	Rendement
1, référence		34%	86		26%
77		44%	2, référence		52%
78		35%	87		43%
79		41%	88		56%
80		48%	89		31%
81		41%	90		45%
82		36%	91		44%
83		15%	92		23%
84		15%	93		21%
85		24%			

Tableau 8 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés 1, 2, et 77 à 93

Bien que les conversions aient été totales pour ces différentes réactions, les faibles rendements obtenus, allant de 15% à 56%, s'expliquent par la formation d'un même type de produit secondaire cyclique lors de la synthèse de tous les analogues. Une analyse des spectres de masse a permis de

montrer une absence de profil chloré ce qui nous a conduit à envisager une réaction de substitution intramoléculaire. A partir de la réaction s'effectuant avec le produit de départ **67**, le produit secondaire **94** a été isolé et sa structure a été confirmée par RMN. Le mécanisme de formation du produit secondaire **94** est proposé en Figure 35.

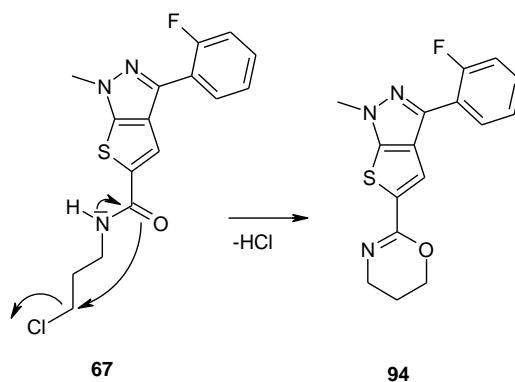


Figure 35 : Mécanisme proposé pour la formation du produit secondaire **94**

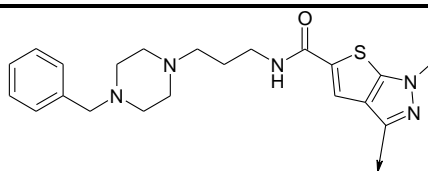
Une délocalisation du doublet non liant de l'azote de l'amide entraîne une substitution nucléophile intramoléculaire de l'oxygène sur l'atome de carbone portant le chlore conduisant au composé **94**. Sa formation est d'autant plus favorisée que la conjugaison avec le noyau aromatique lui confère une certaine stabilité.

Les proportions obtenues pour ce produit ont varié de 7% en série 3,5-diméthylpipéridine à 15% en série benzylpipérazine. La formation de ce produit secondaire dépend de l'amine mise en jeu et de sa nucléophilie. Moins cette amine est nucléophile et plus la réaction de cyclisation est observée.

Tous les composés ainsi synthétisés ont ensuite été testés dans les modèles cellulaires VHCcc et VHCpp afin d'évaluer l'inhibition de l'infection virale et l'inhibition de l'entrée virale respectivement.

III.2.3. Résultats et discussion

Les résultats biologiques concernant la série benzylpipérazine (composé **1**, **77** à **85**) sont présentés dans le Tableau 9.



Composé	Substituant	IC ₅₀ (μM)	Composé	Substituant	IC ₅₀ (μM)
1, référence		2.6 (VHCcc) 2.7 (VHCpp)	81		> 10 (VHCcc)
77		3.4 (VHCcc) 3.0 (VHCpp)	82		> 10 (VHCcc)
78		3.0 (VHCcc) 2.3 (VHCpp)	83		> 10 (VHCcc)
79		2.6 (VHCcc)	84		> 10 (VHCcc)
80		> 10 (VHCcc)	85		> 10 (VHCcc)

Tableau 9 : Résultats biologiques obtenus pour les composés 1, 77 à 85

Par rapport au composé de référence **1** (IC₅₀ = 2.6 μM et 2.7 μM sur VHCcc et VHCpp respectivement) avec un atome de fluor en position 2 du cycle aromatique, l'introduction d'un cycle phényle non substitué (**78**, IC₅₀ = 3.0 μM et 2.3 μM) ne modifie pas l'activité. De plus, une activité du même ordre de grandeur est observée lorsque le cycle phényle est substitué par un groupement méthoxy en position 3 (**77**, IC₅₀ = 3.4 μM et 3.0 μM) ou par un atome de chlore en position 2 (**79**, IC₅₀ = 2.6 μM sur VHCcc). Ces résultats montrent que les positions 2 et 3 du cycle phényle peuvent être substituées.

En revanche, l'introduction en position 4 d'un atome de chlore (**80**), d'un groupement trifluorométhyle (**81**), méthoxy (**82**), ou méthyle (**83**) conduit à des composés inactifs avec des IC₅₀ > 10 μM sur VHCcc suggérant qu'un groupement électrodonneur ou électroattracteur dans cette position n'est pas toléré. Par ailleurs, l'introduction d'un cycle pyridine aboutit également à un composé inactif dans la gamme de concentration testée (**84**, IC₅₀ > 10 μM). Cependant, la présence d'un cycle aromatique semble être importante pour l'activité des composés puisque son remplacement par un groupement méthyle (**85**, IC₅₀ > 10 μM) entraîne une perte d'activité. Ces résultats montrent qu'aucune des modifications envisagées n'a permis d'améliorer l'activité des composés.

Concernant la série 3,5-diméthylpipéridine, les résultats biologiques figurent dans le Tableau 10.

Composé	Substituant	IC ₅₀ (μM)	Composé	Substituant	IC ₅₀ (μM)
2, référence		0.9 (VHCcc) 0.9 (VHCpp)	90		> 10 (VHCcc)
86		0.9 (VHCcc) 1.3 (VHCpp)	91		> 10 (VHCcc)
87		0.9 (VHCcc) 3.3 (VHCpp)	92		0.9 (VHCcc) 3.7 (VHCpp) Non spécifique
88		> 10 (VHCcc)	93		> 10 (VHCcc)
89		> 10 (VHCcc)			

Tableau 10 : Résultats biologiques obtenus pour les composés 2, 86 à 93

Les résultats observés pour la série 3,5-diméthylpipéridine confirment ceux obtenus pour la série benzylpipérazine. En effet, l’introduction d’un cycle aromatique substitué en position 2 par un atome de fluor (**86**, IC₅₀ = 0.9 μM et 1.3 μM respectivement sur VHCcc et VHCpp) ou non substitué (**87**, IC₅₀ = 0.9 μM et 3.3 μM) permet de conserver une activité identique au composé de référence **2** (IC₅₀ = 0.9 μM et 0.9 μM).

Par ailleurs, le remplacement du cycle aromatique par un groupement méthyle (**93**) conduit à une perte d’activité avec une IC₅₀ > 10 μM sur le modèle VHCcc mettant en évidence le caractère important d’un groupement aromatique dans cette position. De plus, les composés possédant un cycle aromatique substitué en position 4 par un atome de chlore (**88**), un groupement trifluorométhyle (**89**), méthoxy (**90**) ou méthyle (**91**) sont inactifs (IC₅₀ > 10 μM sur VHCcc) indiquant que la substitution en position 4 n’est pas tolérée. A l’inverse de ce qui a été observé précédemment, le composé substitué par le groupement pyridine (**92**) est actif sur les modèles cellulaires VHCcc et VHCpp avec des IC₅₀ égales à 0.9 μM et 3.7 μM respectivement mais il est également actif sur le modèle cellulaire RD114pp (IC₅₀ = 4.7 μM) indiquant un manque de spécificité pour le VHC.

III.2.4. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus indique qu'un cycle aromatique en position 3 du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole est important pour l'activité du composé puisque lorsque ce groupement est remplacé par un groupement méthyle aucune activité n'est observée ($IC_{50} > 10 \mu M$ sur VHCcc). La substitution en position 4 du cycle aromatique ne semble pas être tolérée puisque tous les composés synthétisés possédant un cycle aromatique substitué en cette position se sont révélés inactifs dans la gamme de concentration testée. Enfin, un cycle phényle non substitué, substitué en position 2 par un atome de fluor, ou en position 3 par un groupement méthoxy ou non substitué est toléré et a conduit à des composés présentant une activité de l'ordre du micromolaire (Figure 36).

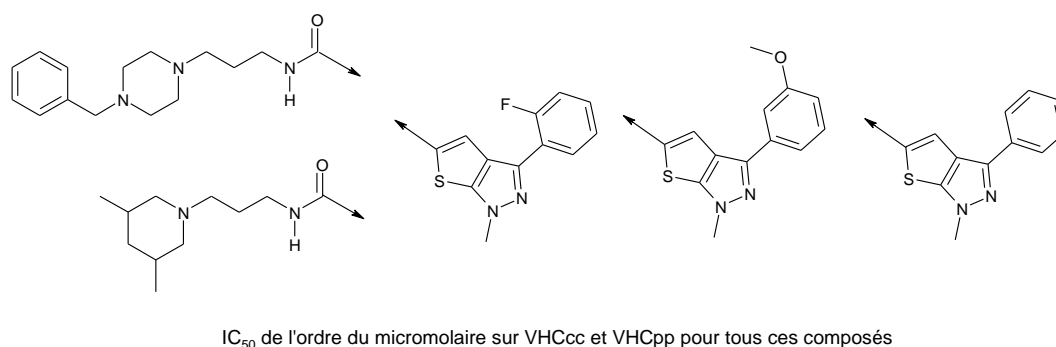


Figure 36 : Groupements 3-phénylthiéno[2,3-c]pyrazole tolérés en série benzylpipérazine et 3,5-diméthylpipéridine

Néanmoins, aucune amélioration de l'activité n'a été observée lors de l'évaluation de ces analogues et d'autres modifications ont donc été envisagées en choisissant le cycle 2-F-phényle comme substituant de référence pour la position 3 du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole.

III.3. Modification du substituant en position 5 du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole

Dans cette dernière partie, la nature du substituant en position 5 du noyau thiéno[2,3-c]pyrazole a été étudiée de plusieurs façons : soit par le remplacement du groupement 1-benzyl-4-propyl-pipérazine par d'autres groupements ; soit en modifiant la chaîne aliphatique carbonée ; et soit en remplaçant la benzylpipérazine par d'autres amines.

III.3.1. Modification du groupement 3-(4-benzylpipérazin-1-yl)propan-1-ylamino du composé 1

III.3.1.1. Analogues envisagés

Afin d'étudier l'influence de la chaîne 1-benzyl-4-propyl-pipérazine sur l'activité du composé, celle-ci a été remplacée par des groupements aliphatiques et aromatiques tout en conservant la fonction amide. Cette fonction amide a également été remplacée par une fonction acide carboxylique et une fonction ester éthylique. Toutes ces modifications envisagées sont présentées en Figure 37.

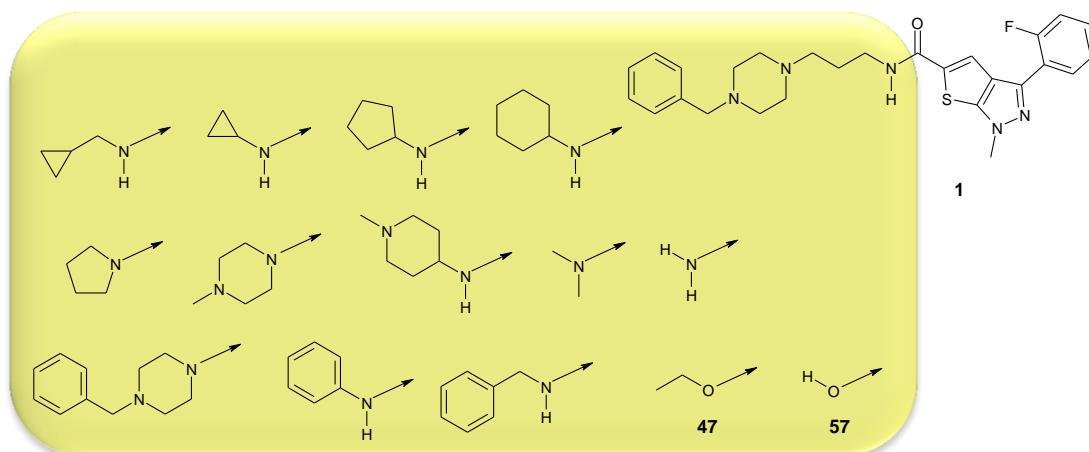


Figure 37 : Analogues du composé **1** obtenu en modifiant la chaîne 3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propan-1-amino

Les analogues possédant la fonction ester éthylique **47** et acide carboxylique **57** sont des intermédiaires issus de la synthèse décrite précédemment (Figure 30, Figure 32). La stratégie de synthèse des analogues amides est présentée en Figure 38.

III.3.1.2. Synthèse des composés **95** à **105**

La synthèse des différents analogues a été réalisée par couplage entre les amines commercialement disponibles et l'intermédiaire acide carboxylique **57** précédemment décrit. Les conditions de couplage, décrites Figure 38, ont été les mêmes que celles utilisées pour la synthèse des analogues **67** à **76**.

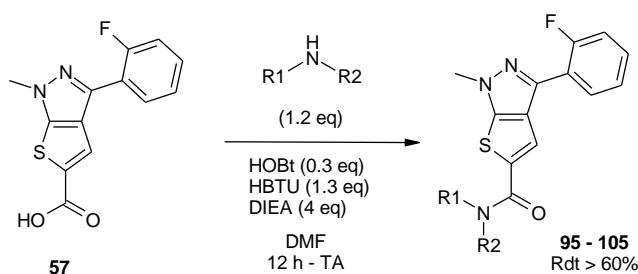


Figure 38 : Schéma de synthèse des analogues **95** à **105**

Les composés **95** à **105** ont été obtenus avec des rendements supérieurs à 60%. La synthèse du carboxamide **106** a été lancée en utilisant les mêmes conditions de couplage avec de l'ammoniac en solution dans le méthanol. Cependant, après 48 h d'agitation à TA aucune réaction n'a été observée. Le remplacement de la solution d'ammoniac dans le méthanol par du chlorure d'ammonium dans les conditions de couplage décrites précédemment a permis d'observer le produit désiré après seulement 2 h de réaction et de l'isoler avec un rendement de 96% (Figure 39).

Chapitre I – Développement d'inhibiteurs de l'entrée du virus de l'hépatite C : découverte et synthèse de modulateurs de l'interaction CD81/CLDN-1

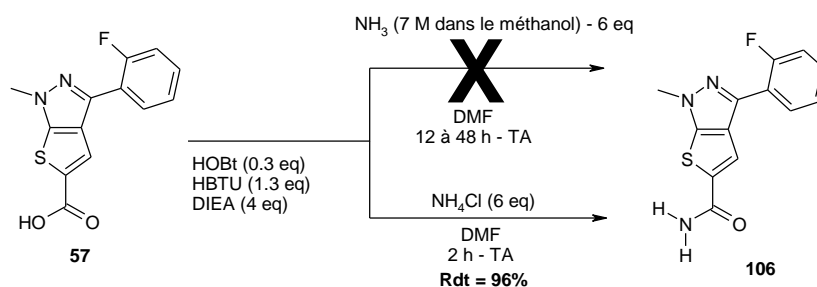
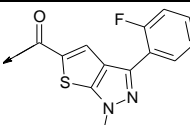


Figure 39 : Schéma de synthèse du composé 106

Tous les composés ont été testés dans le modèle cellulaire VHCcc afin d'évaluer leur capacité à inhiber l'infection virale.

III.3.1.3. Résultats et discussion

Les activités biologiques obtenus pour les composés **1**, **47**, **57**, **95** à **106** sont présentés dans le Tableau 11.



Composé	Substituant	IC ₅₀ (μM) VHCcc	Composé	Substituant	IC ₅₀ (μM) VHCcc
1, référence		2.6 (VHCcc)	100		> 10
47		> 10	101		> 10
57		> 10	102		> 10
95		> 10	103		> 10
96		> 10	104		> 10
97		> 10	105		> 10
98		> 10	106		> 10
99		> 10			

Tableau 11 : Résultats biologiques obtenus pour les composés **1**, **47**, **57**, et **95** à **106**

Le remplacement du groupement 3-(4-benzylpiperazine-1-yl)propan-1-amino (**1**) par une fonction ester éthylique (**47**), acide carboxylique (**57**) ou carboxamide (**106**), par des amines aliphatiques (**95** à **98**, **101** et **102**), des amines secondaires cycliques (**99**, **100** et **103**), l'aniline (**104**) ou la benzylamine (**105**) a conduit à des composés inactifs (IC₅₀ > 10 μM). Ceci est peut être dû à l'absence de la chaîne propyle car le composé **103** qui est l'analogue du composé **1** sans la chaîne aliphatique carbonée est inactif. Pour évaluer plus en détails l'importance de cette chaîne carbonée, il a été décidé de la moduler.

III.3.2. Modulation de la chaîne aliphatique carbonée

III.3.2.1. Stratégie de synthèse

Une réduction d'un chaînon méthylique de la chaîne aliphatique carbonée ou sa rigidification par l'introduction d'un groupement alcyne sont des modifications qui ont été envisagées pour étudier l'importance de cette chaîne aliphatique carbonée. Par ailleurs, l'atome d'azote de la fonction amide a été substitué par un méthyle afin de compléter ces relations structure-activité. Tous ces modifications ont été effectuées dans la série benzylpipérazine avec le noyau thiéno[2,3-c]pyrazole substitué en position 3 par le 2-F-phényle comme l'illustre la Figure 40.

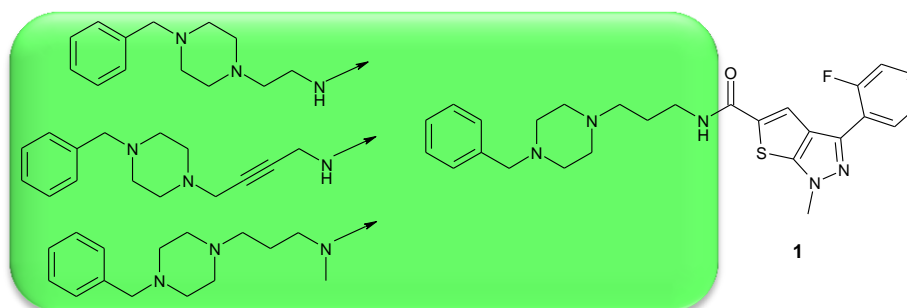


Figure 40 : Analogues du composé 1 obtenus en modifiant la chaîne aliphatique carbonée

La stratégie de synthèse de ces analogues est décrite Figure 41.

III.3.2.2. Synthèse des analogues 110 à 112

Les composés désirés ont été synthétisés en deux étapes. La première étape a consisté à coupler le dérivé chloroamine, possédant la chaîne aliphatique adéquate, avec l'intermédiaire acide carboxylique 57. Les intermédiaires chlorés 107 à 109 ont ensuite été substitués par la benzylpipérazine. Les conditions réactionnelles pour ce processus couplage/substitution nucléophile, décrites en Figure 41, ont été les mêmes que celles utilisées précédemment.

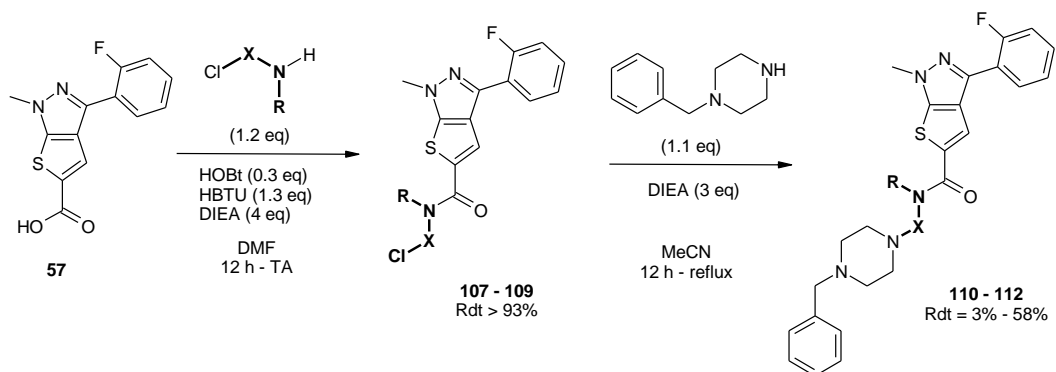
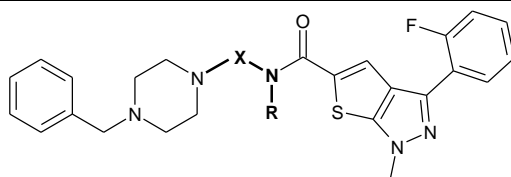


Figure 41 : Schéma de synthèse des composés 107 à 112

Les rendements obtenus à l'issue de l'étape de couplage ont été supérieurs à 93% (composés **107** à **109**), tandis que ceux de l'étape de substitution nucléophile par la benzylpipérazine ont été beaucoup plus faibles (Tableau 12).



Composé	R	X	Rendement
110	H	-(CH ₂) ₂ -	3%
111	H	-CH ₂ -C≡C-CH ₂ -	58%
112	CH ₃	-(CH ₂) ₃ -	25%

Tableau 12 : Rendements obtenus pour les composés **110** à **112**

Les composés **110**, **111** et **112** ont été obtenus après purification avec des rendements allant de 3%, 58% et 25% respectivement. Le très faible rendement observé pour le composé **110** s'explique par la formation d'un produit secondaire **113** (Figure 42) issue d'une réaction secondaire identique à celle observée pour l'obtention du composé **94**.

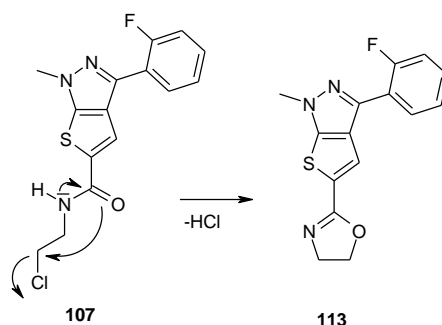


Figure 42 : Mécanisme proposé pour la formation du produit secondaire **113** et structure du produit **94** obtenu précédemment

Pour rappel, la proportion de produit secondaire **94**, présentant un cycle à six sommets, était de 15%. Elle a été de 50% pour le produit secondaire **113**. En plus de la conjugaison avec le noyau aromatique observée pour les deux composés, la stabilité relative d'un cycle à cinq sommets par rapport à un cycle à six peut être une raison de cette proportion plus élevée.

Comme attendu, aucun produit secondaire de ce type n'a été observé lors de la synthèse des composés **111** et **112**. La rigidité de la chaîne alcyne de l'intermédiaire chloré **108** et la présence du groupement méthyle sur l'intermédiaire chloré **109** ont empêché la réaction de cyclisation intramoléculaire. Les rendements faibles à modérés obtenus pour les composés **111** et **112** s'expliquent par la nécessité de faire une purification par HPLC préparative.

Afin d'éviter cette cyclisation intramoléculaire observée avec le dérivé chloré **107**, il a été décidé de modifier l'enchaînement réactionnel en synthétisant dans un premier temps la 2-(4-benzylpipérazin-1-yl)éthanamine via une réaction de substitution nucléophile de la 2-chloroéthylamine par la benzylpipérazine. Dans un second temps, le couplage entre la 2-(4-benzylpipérazin-1-yl)éthanamine et l'intermédiaire acide carboxylique **57** permettrait d'aboutir au composé **110**. Cet enchaînement réactionnel est illustré Figure 43.

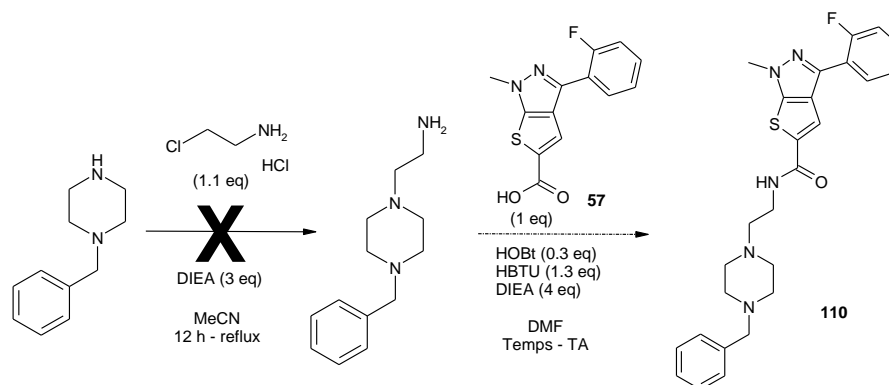


Figure 43 : Enchaînement réactionnel proposé pour la synthèse de l'analogue **110** sans la formation du produit secondaire **113** issue de la cyclisation intramoléculaire

En utilisant les mêmes conditions réactionnelles de substitution nucléophile que celles utilisées précédemment et décrites dans la littérature⁵⁴, l'intermédiaire 2-(4-benzylpipérazin-1-yl)éthanamine n'a jamais été observé et n'a donc pas pu être isolé. Cela pourrait provenir du fait que le réactif 2-chloroéthylamine réagisse sur lui-même pour conduire à la formation d'une aziridine moins réactive. Afin d'éviter ce type de réaction secondaire, la 2-chloroéthylamine a été protégée quantitativement par un groupement Boc pour aboutir au composé désiré **114** (Figure 44).

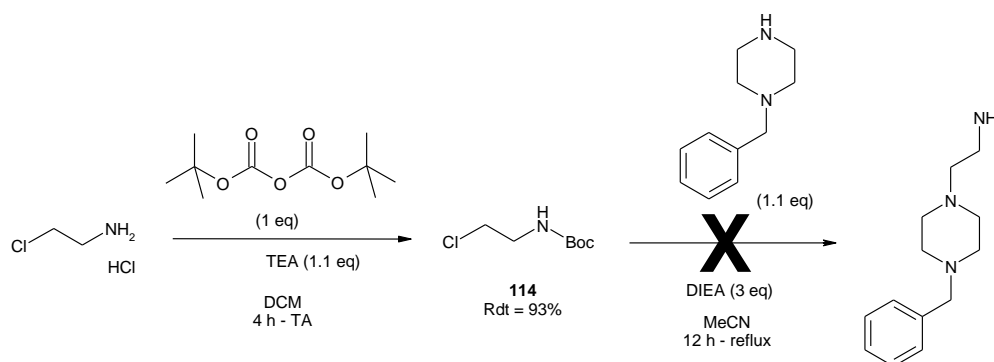


Figure 44 : Enchaînement réactionnel envisagé pour la synthèse de l'intermédiaire 2-(4-benzylpipérazin-1-yl)éthanamine

Une fois protégée, le composé **114** a été engagé dans une réaction de substitution nucléophile avec la benzylpipérazine mais la 2-(4-benzylpipérazin-1-yl)éthanamine n'a jamais été observée pour des raisons que l'on ignore. Il a donc été décidé de continuer en se basant sur la voie réactionnelle utilisée jusqu'à présent.

III.3.2.3. Résultats et discussion

Les résultats biologiques obtenus pour les composés **110** à **112** sont présentés dans le Tableau 13.

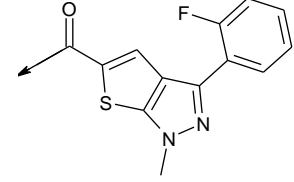
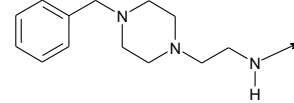
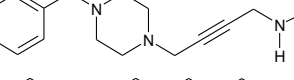
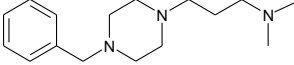
Composé	Groupe	IC ₅₀ (μM)
1, référence		2.6 (VHCcc) 2.7 (VHCpp)
110		Inhibition partielle (VHCcc)
111		> 10 (VHCcc)
112		2.3 (VHCcc) 3.0 (VHCpp)

Tableau 13 : Activités biologiques obtenues pour les composés **1**, et **110** à **112**

La rigidification de la chaîne carbonée au moyen d’un groupement alcyne (**111**) conduit à une perte d’activité (IC₅₀ > 10 μM sur VHCcc). En revanche, un substituant méthyle sur l’atome d’azote de la fonction amide est toléré puisque les activités sur les modèles VHCcc et VHCpp sont conservées (**112**, IC₅₀ = 2.3 μM et 3.0 μM, respectivement). Par ailleurs, une réduction de la longueur de chaîne carbonée d’un chaînon méthylénique (**110**) entraîne une inhibition partielle de l’infection virale.

Afin de corroborer ce résultat d’inhibition partielle, il a été décidé de synthétiser l’analogue du composé **110** en série 3,5-diméthylpipéridine (composé **115**). Ce composé a été obtenu selon le même processus en deux étapes que celui décrit précédemment : couplage de la 2-chloroéthylamine avec l’intermédiaire acide carboxylique **57** puis substitution nucléophile du dérivé chloré par la 3,5-diméthylpipéridine. Les produits ont été obtenus avec des rendements de 93% et 32% respectivement pour ces deux étapes (Figure 45). Le meilleur rendement obtenu pour l’étape de substitution nucléophile est dû à la formation en moins grande quantité du produit secondaire **113** issu de la cyclisation intramoléculaire de **107**. Cela peut s’expliquer par le fait que la 3,5-diméthylpipéridine est plus nucléophile que la benzylpipérazine.

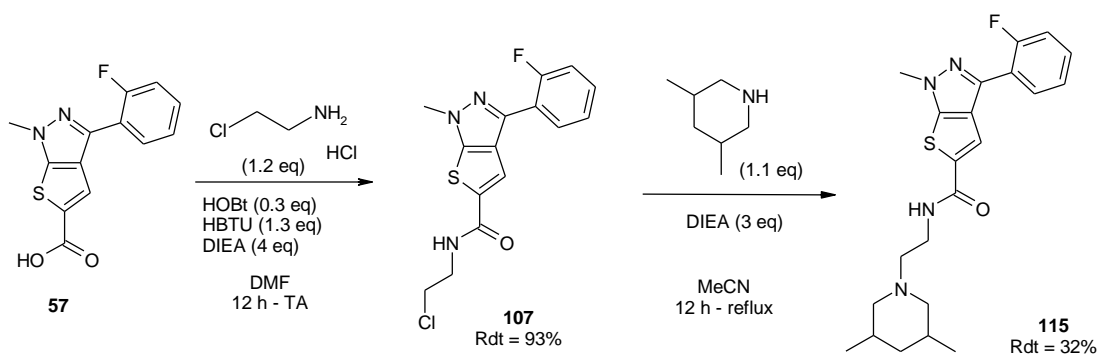
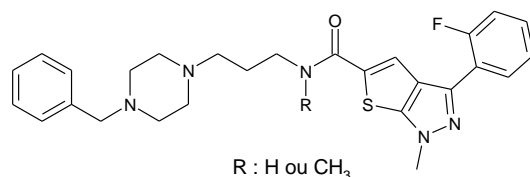


Figure 45 : Schéma de synthèse de l’analogue **115**

Ce composé **115** a été testé dans le modèle cellulaire VHCcc et une inhibition partielle a également été observée.

III.3.3. Conclusion

L'ensemble des résultats concernant les modifications autour de la chaîne propylamide branché en position 5 du noyau 3-(2-F-phényl)-thiéno[2,3-c]pyrazole montre l'importance de celui-ci pour l'activité du composé. En effet, les résultats obtenus suggèrent que trois chaînons méthyléniques entre la fonction amide et l'amine secondaire cyclique sont nécessaires pour l'activité du composé. La substitution de l'atome d'azote de la fonction amide par un méthyle n'améliorant pas l'activité, il a été décidé de continuer les relations structure-activité avec l'atome d'azote non substitué (Figure 46).



IC₅₀ de l'ordre du micromolaire sur VHCcc et VHCpp pour les deux composés

Figure 46 : Structure des composés ayant conservé une activité

III.3.4. Modification autour du groupement benzylpipérazine

III.3.4.1. Analogues envisagés

Plusieurs modifications autour du groupement benzylpipérazine ont été effectuées afin de déterminer l'impact de la basicité, de l'encombrement stérique et du nombre d'atomes d'azote protonables. Par ailleurs, l'introduction d'autres fonctions telles qu'un éther ou une amine aliphatique a permis de compléter ces relations structure-activité.

Toutes ces modifications ont été envisagées avec le noyau thiéno[2,3-c]pyrazole substitué en position 3 par le groupement 2-F-phényle. Elles sont présentées en Figure 47.

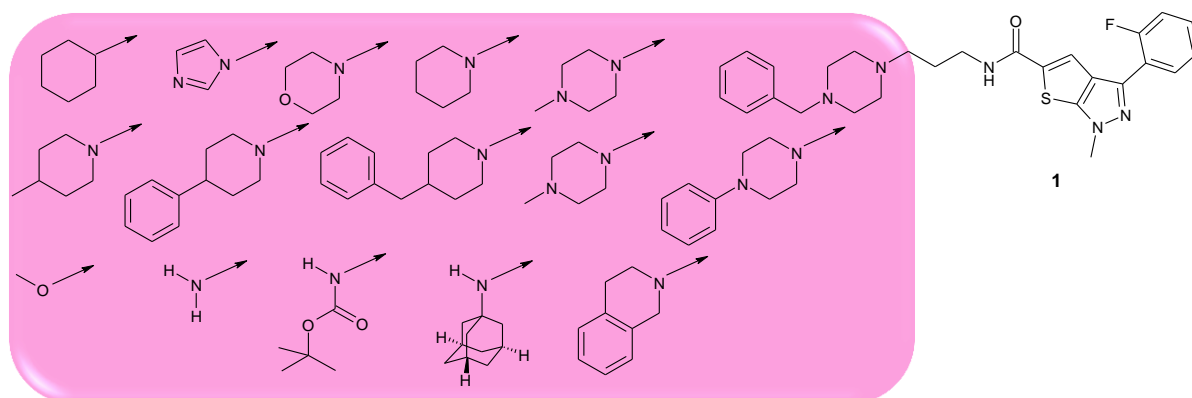


Figure 47 : Analogues du composé 1 obtenus en modifiant le groupement benzylpipérazine

En fonction de la nature de l'analogue à synthétiser deux stratégies de synthèse ont été utilisées.

III.3.4.2. Synthèses des composés **116** à **136**

Afin de pouvoir synthétiser tous ces analogues, une synthèse à l'échelle de 8 grammes de l'intermédiaire acide carboxylique **57** a été effectuée en se basant sur la même voie de synthèse que celle décrite dans la partie III.2. Ainsi, le composé **57** a pu être obtenu avec un rendement global de 45% sur quatre étapes. Il avait été obtenu précédemment avec un rendement de 35% à l'échelle du gramme.

9 analogues ont pu être obtenus par couplage entre l'intermédiaire acide carboxylique **57** et l'amine désirée commercialement disponible. Le schéma de synthèse de ces composés est présenté en Figure 48.

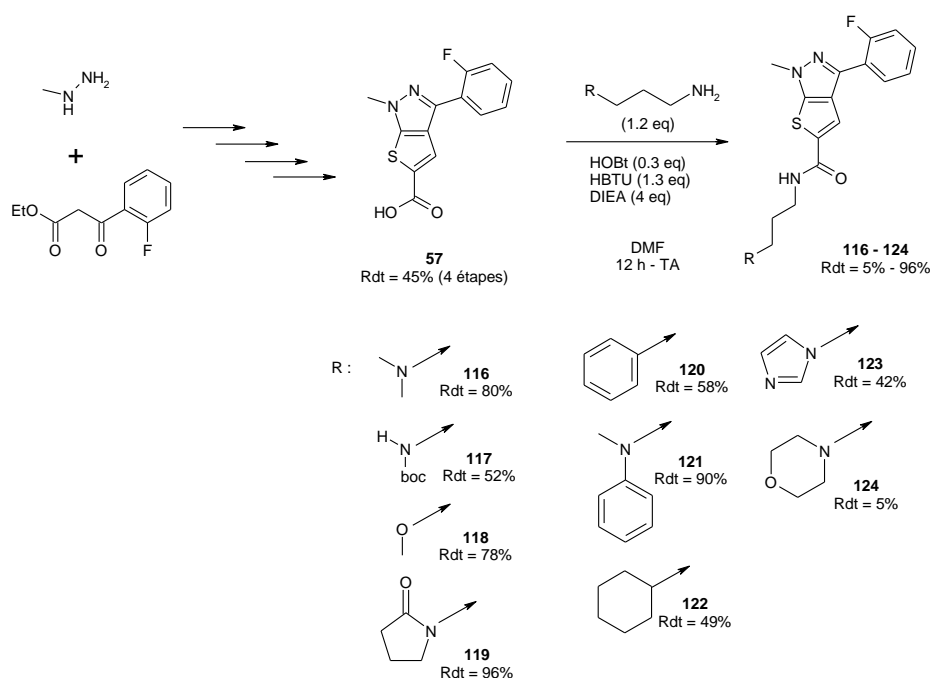


Figure 48 : Schéma de synthèse des analogues **116** à **124**

Les composés **116** à **124** ont été obtenus avec des rendements allant de 5% à 96%. Le faible rendement obtenu pour le composé **124** est dû à un problème survenu lors de la purification par HPLC préparative. L'analogue **117** protégé par un groupement carbamate Boc a pu être déprotégé en condition acide pour conduire au composé **125** avec un rendement de 70% selon le schéma de synthèse décrit en Figure 49.

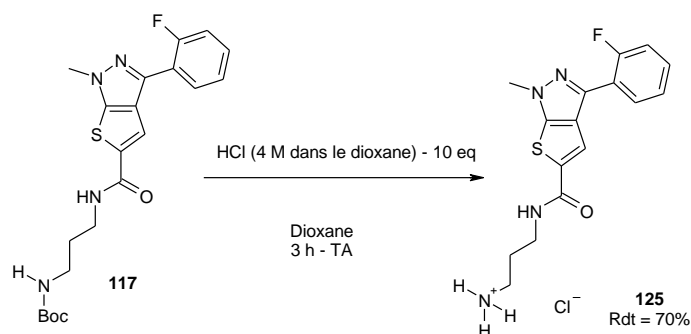


Figure 49 : Déprotection du produit **117** et l'obtention du composé **125**

Afin de synthétiser les autres analogues, l'intermédiaire acide carboxylique **57** a été couplé avec le chlorhydrate de la 3-chloropropylamine afin d'obtenir le dérivé chloré **67** avec un rendement de 95%. Les conditions de couplage utilisés ont été les mêmes que celles décrites pour les couplages précédemment. Le dérivé chloré **67** a ensuite été substitué par les différentes amines commercialement disponibles pour aboutir aux analogues désirés **126** à **136**. Le schéma de synthèse est illustré Figure 50.

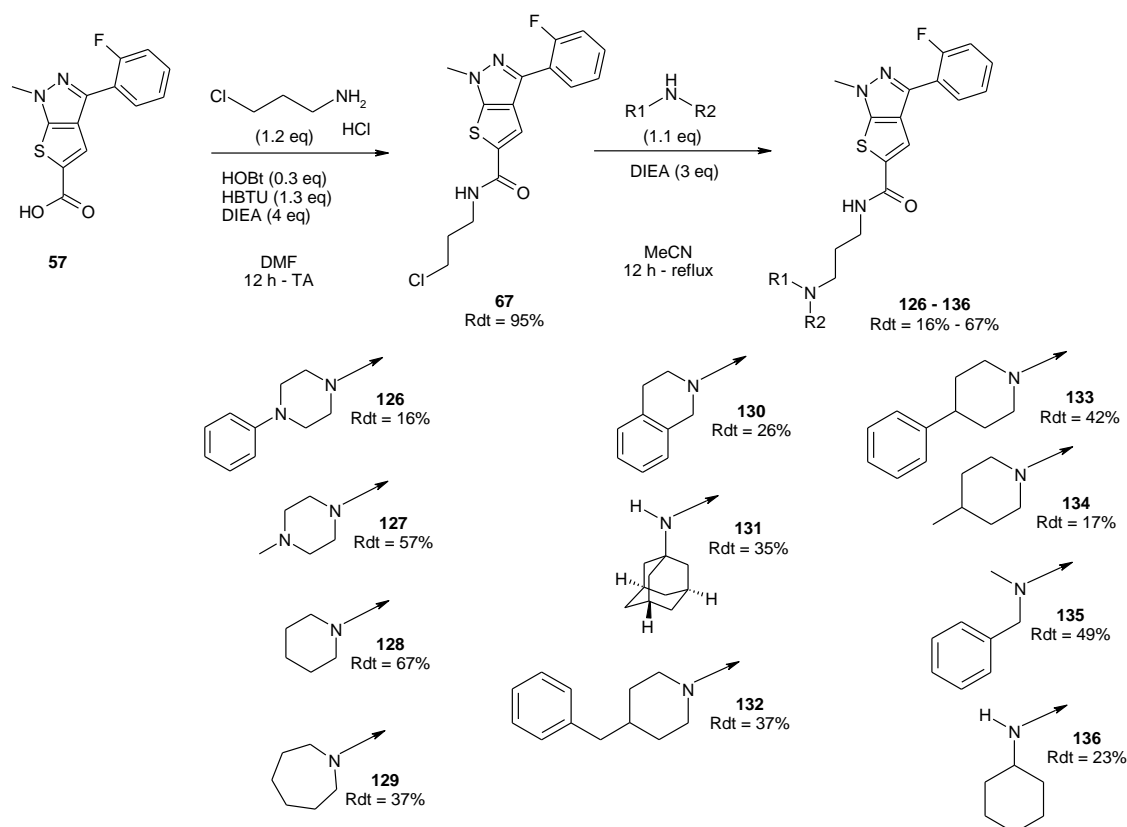
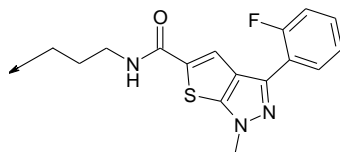


Figure 50 : Schéma de synthèse des composés **126** à **136**

Les composés **126** à **136** ont été obtenus avec des rendements variant de 16% à 67%. Les rendements inférieurs à 30% obtenus pour les composés **126**, **130**, **134** et **136** s'expliquent pas des difficultés de purification par HPLC préparative ou par précipitation dans l'acétonitrile. Les activités biologiques des différents analogues obtenus sont présentées dans le Tableau 14.

III.3.4.3. Résultats et discussion



Composé	Substituant	IC ₅₀ (μM)	Composé	Substituant	IC ₅₀ (μM)
1, référence		2.6 (VHCcc) 2.7 (VHCpp)	127		Inhibition partielle
116		> 10 (VHCcc)	128		Inhibition partielle
117		> 10 (VHCcc)	129		3.2 (VHCcc) - (VHCpp)
118		> 10 (VHCcc)	130		> 10 (VHCcc)
119		> 10 (VHCcc)	131		> 10 (VHCcc)
120		> 10 (VHCcc)	132		0.3 (VHCcc) 0.8 (VHCpp)
121		> 10 (VHCcc)	133		3.2 (VHCcc) 2.3 (VHCpp)
122		> 10 (VHCcc)	134		2.5 (VHCcc) 3.0 (VHCpp)
123		2.6 (VHCcc) 1.2 (VHCpp)	86		0.9 (VHCcc) 1.3 (VHCpp)
124		> 10 (VHCcc)	135		> 10 (VHCcc)
125		> 10 (VHCcc)	136		> 10 (VHCcc)
126		> 10 (VHCcc)			

Tableau 14 : Résultats biologiques obtenus pour les analogues 1, 86, et 116 à 136

Dans un premier temps, l'importance de la benzylpiperazine pour l'activité a été évaluée en la remplaçant par la diméthylamine (**116**), une amine protégée par un groupement Boc (**117**), une fonction éther (**118**), la 2-pyrrolidinone (**119**), la *N*-méthylaniline (**121**), une amine primaire (**125**) l'adamantane (**131**), la *N*-méthylbenzylamine (**135**) ou la cyclohexylamine (**136**). Toutes ces modifications conduisent à une perte d'activité (IC₅₀ > 10 μM) sur le test cellulaire VHCcc.

Le groupement benzyle de la pipérazine a ensuite été remplacé par un groupement phényle (**126**) et un groupement méthyle (**127**). Les résultats obtenus indiquent que la présence d'un groupement benzyle sur le cycle azoté est plus favorable qu'un groupement phényle et qu'un groupement méthyle. En effet, la *N*-benzylpipérazine **1** a une IC_{50} de 2.6 μ M et 2.7 μ M respectivement sur VHCcc et VHCpp alors que l'analogue *N*-phénylpipérazine **126** est inactif et la *N*-méthylpipérazine **127** ne présente qu'une inhibition partielle. Ces mêmes résultats sont observés dans la série pipéridine où la 4-benzylpipéridine **132** a une activité IC_{50} de 0.3 μ M et 0.8 μ M respectivement sur VHCcc et VHCpp alors que la 4-phénylpipéridine **133** et la 4-méthylpipéridine **134** ont des activités de l'ordre du micromolaire.

Par ailleurs, la pipéridine substituée par deux groupements méthyles en position 3 et 5 (**86**) a une meilleure activité (IC_{50} = 0.9 μ M sur VHCcc et 1.3 μ M sur VHCpp) que la pipéridine substituée en position 4 par un groupement méthyle (**134**, IC_{50} = 2.5 μ M sur VHCcc et 3.0 μ M sur VHCpp) ou non substituée (**128**) pour laquelle seule une inhibition partielle sur VHCcc est observée. Ces trois composés sont moins actifs que le composé **132** possédant une pipéridine substituée en position 4 par un groupement benzyle. Ce résultat montre que la substitution du cycle azoté par un groupement hydrophobe est préférable pour l'activité inhibitrice du composé.

Cependant, le caractère hydrophobe ne semble pas être le seul critère nécessaire à l'activité. En effet un atome d'azote apparaît nécessaire puisque les composés phényle (**120**) et cyclohexyle (**122**) sont inactifs (IC_{50} > 10 μ M sur VHCcc) alors que la pipéridine non substituée (**128**) inhibe partiellement l'infection virale sur le test cellulaire VHCcc et l'homopipéridine (**129**) a une IC_{50} de 3.2 μ M sur le modèle cellulaire VHCcc.

Par ailleurs, le remplacement du cycle pipérazine par une pipéridine montre qu'un second atome d'azote protonable diminue légèrement l'activité. En effet, les produits portant un noyau pipéridine sont plus actifs que leurs analogues pipérazines : la 4-benzylpipéridine (**132**, IC_{50} = 0.3 μ M et 0.8 μ M respectivement sur VHCcc et VHCpp) est plus active que la *N*-benzylpipérazine (**1**, IC_{50} = 2.6 μ M et 2.7 μ M) – la 4-phénylpipéridine (**133**, IC_{50} = 3.2 μ M et 2.3 μ M) est plus active que la *N*-phénylpipérazine (**126**, IC_{50} > 10 μ M sur VHCcc) et la 4-méthylpipéridine (**134**, IC_{50} = 2.5 μ M et 3.0 μ M) est également plus active que la *N*-méthylpipérazine (**127**, inhibition partielle sur VHCcc). Le fait que le cycle pipéridine présente une meilleure activité que l'analogue pipérazine quelle que soit sa substitution peut s'expliquer par la basicité plus importante de l'atome d'azote de la pipéridine par rapport à celui de la pipérazine.

Par conséquent, la basicité de l'atome d'azote dans le cycle semble avoir une influence. En effet, comme nous venons de le voir la 4-méthylpipéridine (**134**, IC_{50} = 2.5 μ M et 3.0 μ M respectivement sur VHCcc et VHCpp) est plus active que la *N*-méthylpipérazine (**127**) qui présente une inhibition partielle et qui est elle-même plus active que la morpholine (**124**) qui présente une IC_{50} > 10 μ M sur VHCcc. Or, la pipéridine (pK_a = 11.2) est plus basique que la pipérazine (pK_a = 9.8) elle-même plus basique que la morpholine (pK_a = 8.4) ce qui indique que l'atome d'azote doit être suffisamment basique pour assurer une activité inhibitrice. De façon intéressante le remplacement de la benzylpipérazine par un cycle imidazole (**123**) conduit à un composé de même activité (IC_{50} = 2.6 μ M et 1.2 μ M respectivement sur VHCcc et VHCpp) ce qui montre que le critère de basicité n'est pas le seul paramètre à considérer pour l'activité du composé.

Ces relations structure-activité nous ont permis d'obtenir un composé (**132**) 6 fois plus actif (IC_{50} = 0.3 μ M et 0.8 μ M sur VHCcc et VHCpp) que le composé de référence (**1**, IC_{50} = 2.6 μ M et 2.7 μ M) en remplaçant la benzylpipérazine par une benzylpipéridine. L'analogue du composé **132**

Chapitre I – Développement d'inhibiteurs de l'entrée du virus de l'hépatite C : découverte et synthèse de modulateurs de l'interaction CD81/CLDN-1

pour lequel le groupement 2-fluorophényle a été remplacé par un groupement 3-méthoxyphényle a été synthétisé (Figure 51) et évalué dans les différents modèles cellulaires. Ce composé **137** a montré une $IC_{50} = 0.6 \mu M$ et $0.9 \mu M$ sur VHCcc et VHCpp respectivement. Ces activités sont similaires à celles du composé de référence **2** (Figure 51).

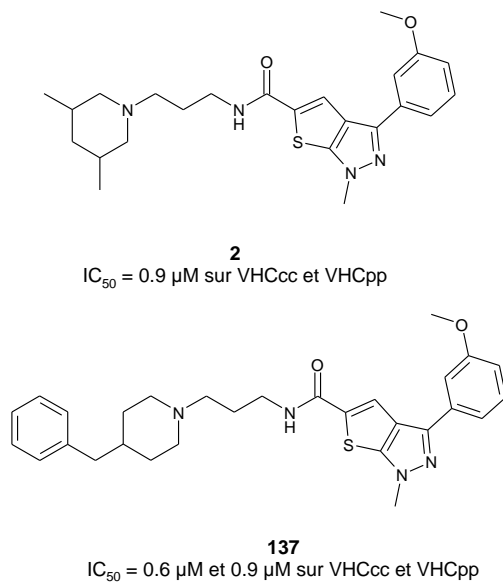


Figure 51 : Composé 136, analogue du composé de référence 2

Conclusion

Le développement du modèle d'étude VHCcc a permis l'identification de plusieurs protéines cellulaires de surface impliquées dans l'entrée du VHC. Les données actuelles mettent en évidence que cette entrée virale est un processus complexe composé de plusieurs étapes. Même si le rôle précis de chacune des protéines restent à déterminer, il a été montré que l'interaction entre les protéines CD81 et CLDN-1 conduisant à la formation d'un complexe à la surface des hépatocytes était indispensable à l'entrée virale.

Un criblage de 14400 molécules a permis d'identifier des modulateurs du complexe CD81/CLDN-1 et notamment une famille de quatre composés possédant un noyau thiéno[2,3-c]pyrazole qui ont montré une activité inhibitrice de l'infection virale de l'ordre du micromolaire. Dans le but d'augmenter l'activité de ces composés, 75 analogues de cette famille ont été synthétisés et évalués dans les différents modèles cellulaires afin de pouvoir établir des relations structure-activité. Diverses modifications structurales ont été introduites en trois points stratégiques de la structure de référence.

Le remplacement de la benzylpipérazine du composé de référence **1** ($IC_{50} = 2.6 \mu M$ et $2.7 \mu M$ respectivement sur VHCcc et VHCpp) par un groupement 4-benzylpipéridine a permis d'améliorer l'activité du composé (**132**, $IC_{50} = 0.3 \mu M$ et $0.8 \mu M$). De plus, l'introduction de ce même groupement 4-benzylpipéridine à la place du groupement 3,5-diméthylpipéridine du composé de référence **2** ($IC_{50} = 0.9 \mu M$ et $0.9 \mu M$) a conduit à un composé **137** ayant la même activité ($IC_{50} = 0.6 \mu M$ et $0.9 \mu M$). Ces composés vont pouvoir être utilisés en tant qu'outils pharmacologiques afin d'une part de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu au sein de l'interaction CD81/CLDN-1 lors de l'entrée du virus, et d'autre part de valider ce complexe protéique comme nouvelle cible thérapeutique pour empêcher l'entrée du virus dans les hépatocytes.

Plusieurs raisons pourraient expliquer la faible augmentation d'activité observée durant l'optimisation des composés de référence **1** et **2**. D'abord les molécules touchées identifiées lors du criblage présentent des masses molaires relativement élevées avec une moyenne à 450 g.mol^{-1} . Le processus d'optimisation de telles molécules doit s'accompagner d'une augmentation de l'activité tout en limitant l'augmentation de la masse molaire, pour conserver des molécules « drug-like », ou respectant les règles de Lipinski et Veber, ce qui constitue un premier facteur limitant. En effet, les tentatives de réduction de la taille des molécules en supprimant, par exemple, le noyau thiéno[2,3-c]pyrazole ou en réduisant la taille de la chaîne aliphatique carbonée ont conduit à des composés inactifs.

Les propriétés physico-chimiques des 75 composés synthétisés ont été déterminées. Une valeur moyenne a été calculée pour chacun de ces paramètres (Tableau 15).

	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Nombre H-Acc	Nombre H-Don	clogP	PSA (Å ²)	NRot
75 molécules synthétisées	450 ± 60	3.3 ± 0.8	1.0 ± 0.4	4.2 ± 1.0	81 ± 8	6 ± 2
Règles de Lipinski et Veber	< 500	< 10	< 5	< 5	< 140	< 10

Tableau 15 : Propriétés physico-chimiques moyennes des 75 molécules synthétisées. Comparaison avec les règles de Lipinski et Veber

Les propriétés physico-chimiques moyennes des 75 molécules synthétisées respectent les règles émises par Lipinski et Veber. Néanmoins, le nombre de liaisons à libre rotation est élevée ce qui confèrerait aux structures une flexibilité qui pourrait nuire à leur activité. De plus, comme cela a été mentionné précédemment, la masse molaire moyenne reste élevée. L’index d’efficacité atomique, Ligand Efficiency en anglais ou LE est un autre outil permettant de mettre en évidence l’activité de chaque atome. Il normalise l’activité du composé par rapport au nombre d’atomes contenus dans la molécule de façon à se rendre compte de la contribution des atomes à l’activité du composé. Durant ce projet, 15 molécules ont montré une activité sur le modèle cellulaire VHCcc de l’ordre du micromolaire. Le nombre moyen d’atome lourds étant de 30, le LE obtenu est de 0.25 ce qui confirme que la part de chaque atome pour l’activité est faible.

Il en ressort que le choix des molécules incorporées dans les chimiothèques de criblage reste un critère important. Une alternative, complémentaire à l’approche HTS, consiste à tester des plus petites molécules, appelées fragments, à partir desquelles il est plus facile de rajouter des éléments de pharmacophore et de permettre une meilleure contribution de chaque atome à l’activité. C’est sur ce type d’approche que j’ai développé mes travaux suivants présentés dans les deux prochains chapitres.

**Chapitre II – Approche par fragments :
synthèse de fragments privilégiés permettant
une plus large exploration de l'espace chimique**

Introduction

Complémentaire du criblage à haut débit, l'approche par fragments est une stratégie qui s'est largement répandue ces dernières années pour concevoir de nouveaux ligands de différentes cibles thérapeutiques. Cette approche est basée sur le criblage de molécules solubles possédant un faible nombre d'atomes et appelées fragments. Les fragments identifiés et sélectionnés lors d'un criblage présentent de faibles activités biologiques mais un mode de liaison efficace où la grande majorité des atomes du fragment participent aux interactions avec la cible. Ces fragments sont ensuite optimisés afin d'améliorer leur activité et d'aboutir à de potentiels candidats médicaments.

Ces fragments sont regroupés dans une chimiothèque afin de pouvoir être criblés sur des cibles thérapeutiques d'intérêts. La conception de cette chimiothèque est une étape cruciale puisqu'elle constitue le point de départ de l'approche par fragments. Cette chimiothèque doit être diversifiée et tous les critères permettant d'accroître cette diversité doivent être pris en compte pour enrichir la chimiothèque avec des structures originales. De nombreuses études ont récemment mis en exergue l'absence de structures 3D dans ces chimiothèques de fragments. Par conséquent, l'un des objectifs de ma thèse a consisté à concevoir et synthétiser des fragments capables d'explorer l'espace tridimensionnel tout en respectant les règles caractérisant le fragment.

I. L'utilisation de fragments pour la découverte de molécules biologiquement actives

La découverte de médicaments repose sur l'identification de molécules capables de moduler une fonction biologique. Cette identification est une étape clé dans le processus de découverte de médicaments. Depuis les années 1960, différentes approches ont permis d'accéder à de nouvelles molécules biologiquement actives telles que l'utilisation de produits naturels connus pour avoir un intérêt thérapeutique, la chimie combinatoire associée au criblage à haut débit (ou approche HTS, *high-throughput screening*) et l'exploitation de méthodes informatiques (*quantitative structure-activity relationships*, QSAR et criblage virtuelle)⁶⁰.

Le début des années 1990 a été marqué par la remise en question de l'approche HTS et de la chimie combinatoire. Bien que ces technologies aient contribué à la découverte de certains médicaments, des candidats ont échoué en phase préclinique, et ce en partie à cause de leurs propriétés physico-chimiques inadaptées au développement d'un médicament. En effet, les molécules identifiées lors d'une approche HTS sont souvent trop volumineuses (masse molaire élevée), trop lipophiles et peu solubles, elles ne constituent donc pas un point de départ idéal pour aboutir facilement et rapidement à un candidat médicament⁶¹. De plus, les chimiothèques de molécules utilisées pour ces approches ne représentent qu'une faible partie de l'espace chimique aboutissant ainsi à une incapacité à augmenter le nombre de nouvelles entités chimiques mises sur le marché⁶². Pour ces raisons, de nouvelles approches ont été développées.

L'une de ces approches est basée sur l'utilisation de composés de faible masse molaire, appelés fragments.

I.1. Principe de l'approche par fragments

I.1.1. Naissance de l'approche par fragments

La notion de fragment est apparue dans les années 1980 avec les travaux de Jencks *et al.* qui ont mis en avant le fait qu'une molécule biologiquement active pouvait être assimilée à plusieurs entités moléculaires de tailles plus petites⁶³. Bien que faiblement actives individuellement, ces entités moléculaires reliées ensemble par un linker, peuvent aboutir à une molécule plus active. Il a en effet été montré que la constante d'affinité d'une molécule avec sa cible biologique est égale au produit des constantes d'affinité de chaque entité moléculaire et de la contribution du linker. Ainsi, en principe, une molécule ayant une affinité biologique de l'ordre du micromolaire pourrait être obtenue en assemblant deux petites molécules identifiées avec des affinités de l'ordre du millimolaire.

Cette notion de petites entités moléculaires, appelées fragments, a d'abord été appliquée à la découverte d'inhibiteurs sélectifs de la triose-phosphate isomérase du trypanosome. A partir d'une étude *in silico*, plusieurs poches voisines de la protéine ont été sélectionnées et des fragments complémentaires ont été conçus dans l'optique d'interagir dans chacune de ces poches. L'assemblage de ces fragments a permis d'aboutir à un inhibiteur sélectif de l'isomérase⁶⁴.

A la fin des années 1990, le concept de l'approche par fragments a été expérimentalement établi en découvrant des inhibiteurs de la protéine FK506, appartenant à la famille des FKBP. Le criblage de petites molécules par RMN sur la protéine marquée à l'azote ¹⁵N a permis d'identifier deux fragments interagissant dans des poches voisines de la protéine. Ces deux fragments ont été individuellement optimisés pour aboutir à des molécules ayant des constantes d'affinité de 2 μM et 100 μM. Ces deux fragments reliés ensemble ont conduit à un composé présentant une constante d'affinité égale à 19 nM⁶⁵. Cette méthode, appelée « SAR by NMR »⁶⁶, est présentée en Figure 52.

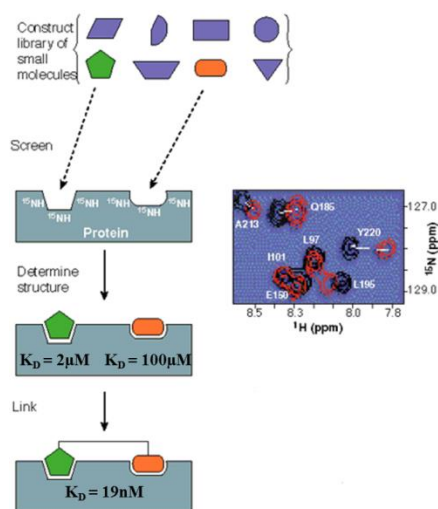


Figure 52 : Principe de la méthode « SAR by NMR »⁶⁶

Depuis, cette méthode a été appliquée notamment pour la découverte d'inhibiteurs de stromélysine (MMP3) et de BCL-2 (BCL-XL)⁶⁷. Elle a constitué le point de départ du concept de l'approche par fragments. Acteur principal de cette approche, le fragment doit présenter des propriétés physico-chimiques bien définies.

1.1.2. Définition d'un fragment

Le fragment peut être défini comme une molécule simple de faible masse molaire, soluble et respectant la « règle des 3 (Ro3) ». Cette règle, émise par Congreve *et al.*⁶⁸, est basée sur les mêmes paramètres que ceux utilisés par Lipinski⁵¹ et Veber⁵² pour prédire la biodisponibilité d'une molécule organique. Elle a été fondée sur l'analyse des hits issus du criblage d'une base de fragments de la société Astex sur différentes cibles thérapeutiques. Les critères de cette « règle des 3 » sont présentés dans le Tableau 16. Les règles de Lipinski et Veber, habituellement utilisées pour concevoir une chimiothèque de molécules pour l'approche HTS, y sont également rappelées.

	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Nombre H-Acc	Nombre H-Don	clogP	PSA (Å ²)	NRot
Règle de 3	< 300	< 3	< 3	< 3	< 60	< 3
Règles de Lipinski et Veber	< 500	< 10	< 5	< 5	< 140	< 10

Tableau 16 : Définition d'un fragment selon la règle de 3 (Ro3) et comparaison avec les règles de Lipinski et Veber

L'indice de taille a d'abord été défini selon la masse molaire. Cependant, dès lors qu'un atome de brome ou d'iode est présent sur le fragment, cet indice est beaucoup moins relevant. Pour cette raison, la taille d'un fragment peut être évaluée selon son nombre d'atomes lourds (tout atome différent de l'atome d'hydrogène). La valeur limite proposée pour considérer une molécule en tant que fragment est de 17 atomes lourds⁶⁹.

Un fragment est donc une molécule moins complexe que les molécules utilisées pour l'approche HTS. Cette première différence n'est pas la seule puisque l'approche par fragments offre d'autres avantages comparés à l'approche HTS.

1.1.3. Approche par fragments vs approche HTS

Les principales caractéristiques de ces deux approches sont présentées dans le Tableau 17.



Caractéristiques	Approche HTS	Approche par fragments
Nombre de molécules criblées	10^5 à 10^7	10^2 à 10^4
Concentration de criblage	10 μ M	1 mM
Critère de sélection	Activité	Efficacité
Mode de liaison à la cible thérapeutique	 <p>Représentation d'un hit HTS avec la protéine</p>	 <p>Représentation d'un hit fragment avec la protéine</p>
Gamme d'activité des hits	10 nM à 10 μ M	100 μ M à 1 mM
Processus d'optimisation	Nécessite de synthétiser un grand nombre d'analogues du hit	Phase d'optimisation plus directe

Tableau 17 : Différences entre l'approche HTS et l'approche par fragments

Comme l'illustre le Tableau 17 plusieurs différences existent entre l'approche HTS et l'approche par fragments. Ces différences résident dans l'utilisation de molécules de taille différente.

D'une part, l'utilisation de fragments offre la possibilité d'explorer une plus grande part de l'espace chimique en criblant moins de molécules. En effet, le nombre de molécules différentes augmente exponentiellement lorsque la masse molaire augmente⁷⁰. Il a été estimé que le nombre de molécules⁷¹ contenant jusqu'à 30 atomes lourds est supérieur à 10^{60} alors que celui⁷² contenant jusqu'à 13 atomes lourds est de 10^9 . Ce modèle suggère que le criblage d'une collection de 1000 fragments respectant la règle des 3 permet d'explorer l'espace chimique potentiel plus efficacement que le criblage de 1 000 000 de molécules de tailles plus importantes, habituellement utilisées lors des campagnes HTS. D'autre part, il a été proposé une relation de proportionnalité inverse entre la complexité d'une molécule et sa complémentarité avec la cible thérapeutique⁷³. Ainsi, cribler des molécules moins complexes permet d'aboutir à de meilleurs *hits rates*.

Du fait de leur faible masse molaire, les fragments doivent être criblés à des concentrations de l'ordre du millimolaire (contre 10 μ M pour les molécules utilisées en HTS). Ceci implique que les fragments doivent avoir une solubilité aqueuse dans la gamme de concentration utilisée durant le criblage.

A l'issue du criblage, les critères de sélection des hits entre ces deux approches ne sont pas les mêmes. En effet, comme l'indique la représentation schématique d'un hit HTS dans la poche de la protéine, le nombre d'interactions avec ce type de molécules est plus important qu'avec un hit fragment. Ainsi dans le cas de l'approche HTS, la sélection sera basée sur le critère d'activité et les hits HTS identifiés posséderont une activité allant de 10 nM à 10 μ M. A l'inverse, du fait de leur plus faible nombre d'atomes, les fragments ne sont pas capables d'établir, avec la protéine, autant d'interactions que les molécules HTS. En revanche, leur faible complexité augmente la probabilité de se lier de manière optimale à la protéine si bien qu'un fragment peut être défini comme un « ligand efficace »⁷⁴ où la grande majorité de ses atomes participe aux interactions avec la cible thérapeutique.

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Ainsi, dans le cadre de l'approche par fragments, le mode de sélection sera basé sur l'efficacité et les hits fragments identifiés auront des activités allant de 100 μM à 1 mM. Le paramètre « efficacité » est calculé à partir de l'outil LE (*ligand efficiency*) qui correspond au rapport de l'activité du fragment sur son nombre d'atomes lourds⁷⁵. Cet outil permet ainsi de normaliser l'affinité du fragment en fonction de sa taille.

Enfin, les processus d'optimisation des hits HTS et fragments sont différents. Cette différence est illustrée avec la Figure 53.

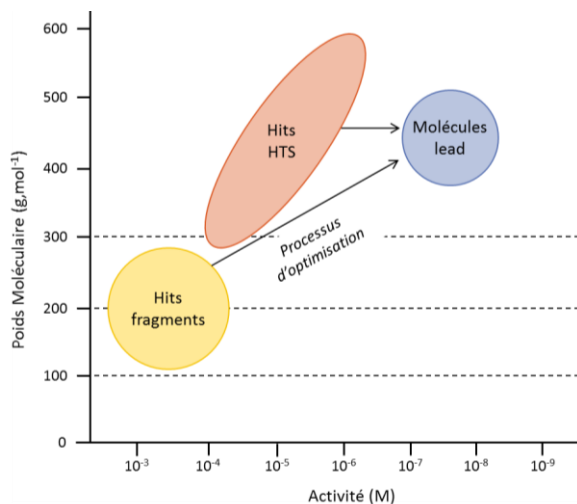


Figure 53 : Différence entre les processus d'optimisation d'un hit HTS et d'un hit fragment en un composé lead

Comme cela a été présenté en conclusion du Chapitre I, le processus d'optimisation d'un hit HTS en un composé lead est moins direct puisqu'une augmentation de l'activité doit être obtenue sans pour autant augmenter la masse molaire. Ceci implique de synthétiser un grand nombre d'analogues du hit HTS afin d'aboutir à un composé lead et donc une phase d'optimisation assez longue. En revanche, le hit fragment, possédant une masse molaire plus faible (aux alentours de 300 g.mol^{-1}), sa phase d'optimisation en une molécule lead est plus directe et plus rapide, nécessitant la synthèse d'un nombre moins conséquent de molécules.

Bien que différentes sur certains aspects, ces deux approches ont pour objectif commun d'aboutir à un candidat médicament selon le même enchaînement : constitution d'une chimiothèque de molécules ou de fragments, criblage sur une cible thérapeutique d'intérêt, identification de hits HTS ou fragments et optimisation en une molécule lead.

I.1.3. Les grandes étapes d'une approche par fragments

L'approche par fragments, appelée FBDD (*fragment-based drug design* ou *discovery*) peut être schématiquement divisée en trois étapes^{76, 77} qui sont illustrées dans la Figure 54.

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

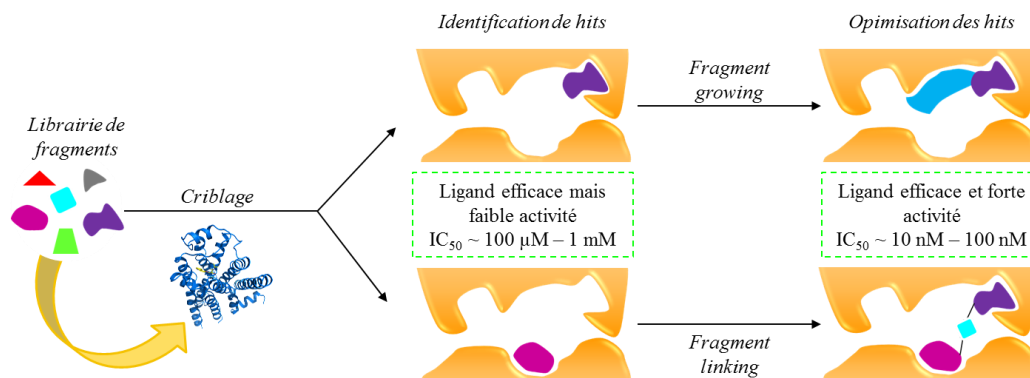


Figure 54 : Les 3 grandes étapes de l'approche par fragments

Ces trois étapes correspondent : (i) à la conception d'une chimiothèque de fragments, (ii) au criblage sur une cible thérapeutique et à la sélection de hits, et (iii) à l'optimisation des fragments hits en molécules lead.

Les outils de criblage dédiés à l'approche par fragments doivent être suffisamment sensibles pour détecter des activités allant de $100 \mu M$ à $1 mM$. Parmi ces outils, on peut citer le Thermal Shift Assay (TSA) et la résonance plasmonique de surface (SPR). D'autres techniques biophysiques capables de fournir des informations sur le domaine de liaison peuvent être utilisées telles que la diffraction des rayons X et la RMN⁷⁸. Parmi toutes ces techniques biophysiques présentant chacune des forces et des faiblesses aucune n'est universelle. En revanche, elles sont complémentaires les unes des autres et en fonction de la cible thérapeutique étudiée, il conviendra d'utiliser plusieurs de ces techniques lors de la validation des hits identifiés.

Les hits identifiés et sélectionnés sont ensuite optimisés selon différentes stratégies^{76, 77}. Parmi elles, le *fragment-growing* est la stratégie la plus utilisée. Elle consiste à ajouter des groupements fonctionnels sur le hit identifié afin d'accroître son activité. L'autre stratégie, très répandue, est la stratégie de *fragment-linking* qui a pour but de relier par un linker deux hits identifiés dans des poches voisines de la protéine.

Depuis la fin des années 1990 et jusqu'à aujourd'hui, l'approche par fragments est en plein essor. Issue de cette approche et de la stratégie de *fragment-growing*, le Vemurafenib est la première molécule à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché en 2011 pour le traitement de mélanomes de stades avancés⁷⁹. Le fragment de départ ainsi que la structure du Vemurafenib sont représentés en Figure 55.

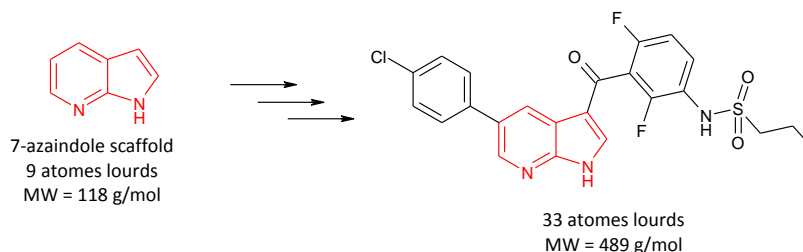


Figure 55 : Stratégie de *fragment-growing* et structure du Vemurafenib : première molécule issue de l'approche par fragments à avoir eu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement de mélanomes

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Très récemment (Avril 2016), la FDA a approuvé la mise sur le marché de la seconde molécule obtenue à partir de l'approche par fragments, le Venetoclax. Indiqué pour certains patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, il est issu de la stratégie *fragment-linking* (Figure 56)⁸⁰.

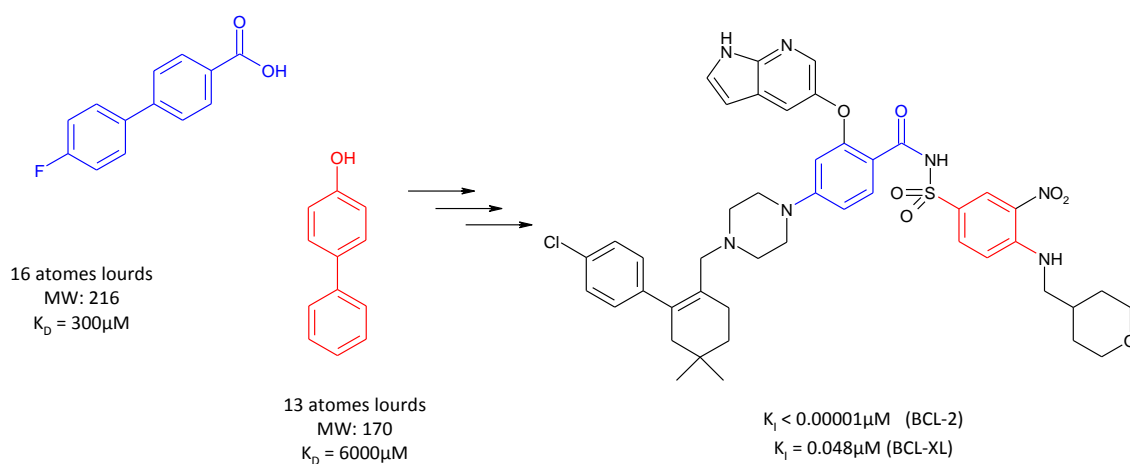


Figure 56 : Stratégie *fragment-linking* et structure du Venetoclax

Plus largement, l'utilisation de cette approche a permis à une dizaine de molécules d'être actuellement en phases II et III des études cliniques⁸¹.

Cependant, le succès de cette approche dépend de la qualité du (des) hit(s) identifié(s) à l'issue du criblage et donc de la conception de la chimiothèque de fragments.

1.2. Principes pour concevoir une chimiothèque de fragments

L'acquisition de banques de fragments commercialement disponibles constitue une première piste pour concevoir une chimiothèque. Cette chimiothèque est ensuite enrichie par la synthèse d'autres fragments. La conception de ces fragments peut être effectuée en s'inspirant de la structure de médicaments déjà présents sur le marché ou de la structure de molécules connues pour avoir un intérêt thérapeutique⁸². Dans ce sens, l'approche « déconstruction-construction »⁸³ est une stratégie qui consiste à déconstruire des structures, dont l'intérêt biologique a été prouvé, afin d'aboutir à de plus petites molécules pouvant être définies comme des fragments et donc incluses dans une chimiothèque. L'enrichissement d'une chimiothèque peut également être réalisé en concevant de nouveaux squelettes moléculaires⁸².

1.2.1. Critères de sélection d'un fragment pour la conception d'une chimiothèque

Comme cela a été mentionné précédemment (partie I.1.2), le fragment doit présenter des propriétés physico-chimiques qui suivent au mieux la règle des 3 (Tableau 16). Cependant, cette règle s'est avérée être trop restrictive. En effet, à l'issue d'un criblage sur le modèle protéique de l'endothiapepsine, Köster *et al.* ont montré que parmi les 11 hits identifiés, seuls 4 respectaient la règle de 3. Les 7 autres hits possédaient un nombre d'atomes donneurs et/ou accepteurs de liaisons hydrogène supérieur à 3⁸⁴. Plusieurs équipes académiques et industrielles ont donc défini leurs propres règles pour définir le fragment^{85, 86}. Dix ans après l'apparition de la règle des 3, un consortium, appelé

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

3D-Frag⁸⁷, a proposé une version plus flexible de cette règle en augmentant le nombre limite d'accepteurs de liaisons hydrogène à 6, le nombre de donneurs à 4 et la surface polaire à 100Å². Associé à ces considérations, un critère concernant la solubilité aqueuse a été ajouté (Tableau 18)⁸⁷.

	Nombre d'atomes lourds	Nombre H-Acc	Nombre H-Don	clogP	PSA (Å ²)	NRot	-clogS
Règle des 3 initiale	< 17	< 3	< 3	< 3	< 60	< 3	
Règle des 3 élargie	< 17	< 6	< 4	< 3	< 100	< 3	< 3

Tableau 18 : Comparaison entre la règle des 3 initiale et celle établie par le consortium 3D-Frag

Plusieurs raisons justifient le fait d'introduire des groupements polaires, à travers des donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène, dans la structure du fragment : (i) ils permettent d'augmenter la solubilité, facteur important pour que le fragment puisse être testé, (ii) ces groupements polaires vont permettre d'accroître la possibilité d'établir des interactions spécifiques et fortes avec la cible thérapeutique et (iii) la présence de tels groupements permet de rendre la structure fonctionnalisable et facilite donc le processus d'optimisation⁸².

Par ailleurs, et comme cela a été présenté (I.1.3), la complexité d'un fragment et sa complémentarité avec une protéine étant inversement proportionnelles⁷³, il est primordial de concevoir des fragments simples. Cependant, l'utilisation d'un fragment trop simple, avec un nombre d'atome lourd compris entre 5 et 10, pourrait limiter la détection de son activité trop faible ou pourrait conduire à un mode de liaison non spécifique lors d'une campagne de criblage. Il convient donc de trouver un bon équilibre entre simplicité et complexité⁸⁸.

En plus de ces propriétés structurales, la considération synthétique lors de la conception de fragments doit être prise en compte. En effet, la voie de synthèse du fragment doit être rapide, quantitative et ne pas changer en fonction du réactif de départ afin de pouvoir être adaptée à la synthèse rapide d'analogues structuraux.

Quelle que soit la cible thérapeutique étudiée, l'objectif est de partir d'une chimiothèque qui soit la plus diversifiée possible^{89, 90}. Cette diversité peut être évaluée sur la base des propriétés physico-chimiques, des structures moléculaires et des formes géométriques de chacun des fragments.

I.2.2. Analyse des chimiothèques commerciales et de la chimiothèque de notre laboratoire

I.2.2.1. Analyses des chimiothèques commerciales

Une analyse faite sur 23 chimiothèques de fragments commercialement disponibles révèle que la très grande majorité des fragments inclus dans ces chimiothèques obéit à la règle des 3 modifiée avec un nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène inférieur à 6 et un nombre de donneurs de liaisons hydrogène inférieur à 4⁹¹. De plus, ces chimiothèques sont diversifiées puisqu'une très large

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

distribution est observée pour chaque propriété physico-chimique⁹¹. Ceci est illustré avec la chimiothèque de fragments commercialisée par Chembridge présentée en Figure 57.

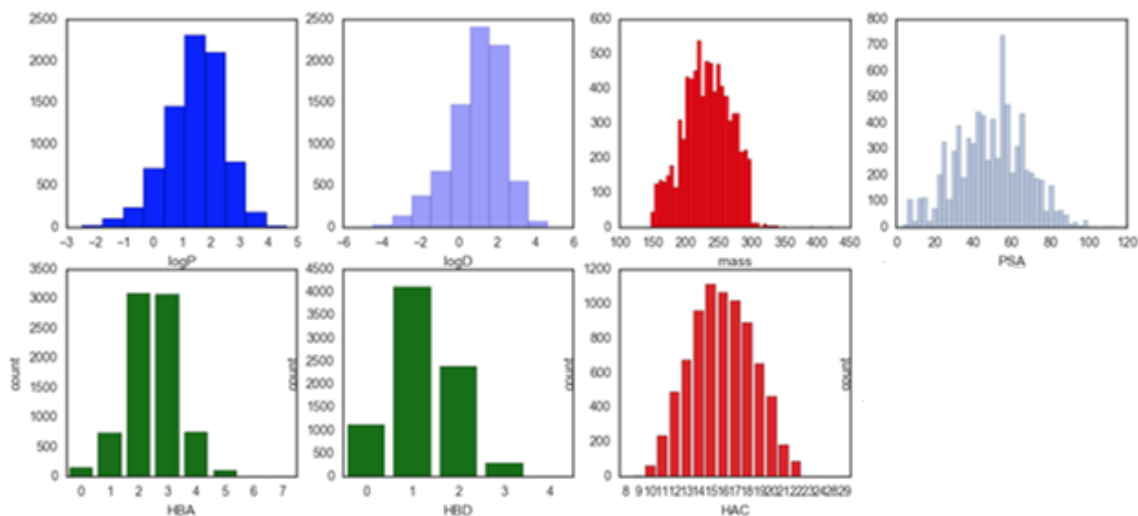


Figure 57 : Propriétés physico-chimiques de la chimiothèque de fragments commercialisée par Chembridge (dernière mise à jour fin mars 2016)⁹¹

Cependant, de nombreuses études ont récemment révélées^{87, 92, 93} que ces chimiothèques commerciales étaient principalement composées de fragments linéaires et/ou plans enrichis en carbone sp^2 . Cette planéité pourrait expliquer l'absence de hits identifiés pour certaines classes thérapeutiques comme les interactions protéine-protéine. Par ailleurs, certaines études ont suggéré que des composés non aromatiques pourraient conduire à des candidats médicaments de meilleure qualité, en termes de biodisponibilité et de propriétés ADME, permettant ainsi d'éviter de potentiels échecs lors du développement clinique⁹⁴⁻⁹⁷. Cette absence de tridimensionnalité constitue une des limites des chimiothèques actuelles.

Afin de confirmer cette observation, une étude a été menée au sein de notre laboratoire en se basant sur 95267 fragments issus de 6 chimiothèques commerciales (Key Organics, Enamine, Maybridge, Chembridge, Vitas M. Labs et Life Chemicals). Cette étude a consisté à analyser le nombre de fragments possédant au moins un carbone sp^3 tétrasubstitué ou spiranique (autre qu'une fonction acétale). Cette analyse est présentée en Figure 58.

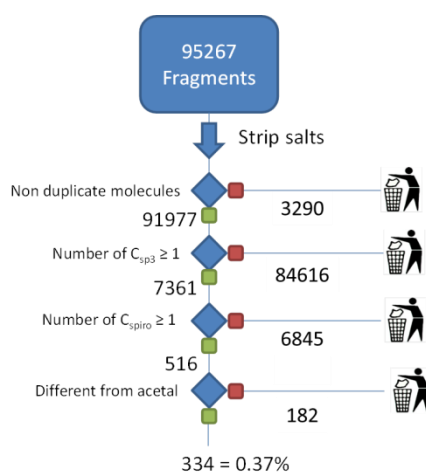


Figure 58 : Analyse de la proportion d'atomes de carbone sp^3 tétrasubstitués et spiraniques présents dans les fragments issus des chimiothèques commerciales

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Comme l'indique cette analyse, seulement 8% de la totalité des fragments étudiés possèdent au moins un atome de carbone sp^3 tétrasubstitué et parmi ces composés seulement 0.37% ont un carbone spiranique. Ces observations, en relation avec d'autres études^{87, 98}, indiquent que les chimiothèques commerciales présentent un manque de diversité géométrique. Cette absence de diversité pourrait être un frein à la découverte de nouveaux candidats médicaments pour des cibles thérapeutiques plus difficiles à moduler, telles que les interactions protéine-protéine.

I.2.2.3. Analyse de la chimiothèque de fragments de notre laboratoire

La conception de notre chimiothèque de fragments a été dans un premier temps réalisée en achetant 1000 fragments issus des fournisseurs commerciaux Enamine et Chembridge. Cette chimiothèque a été complétée par 40 produits issus des synthèses du laboratoire. Les propriétés physico-chimiques de ces 1040 fragments sont présentées en Figure 59.

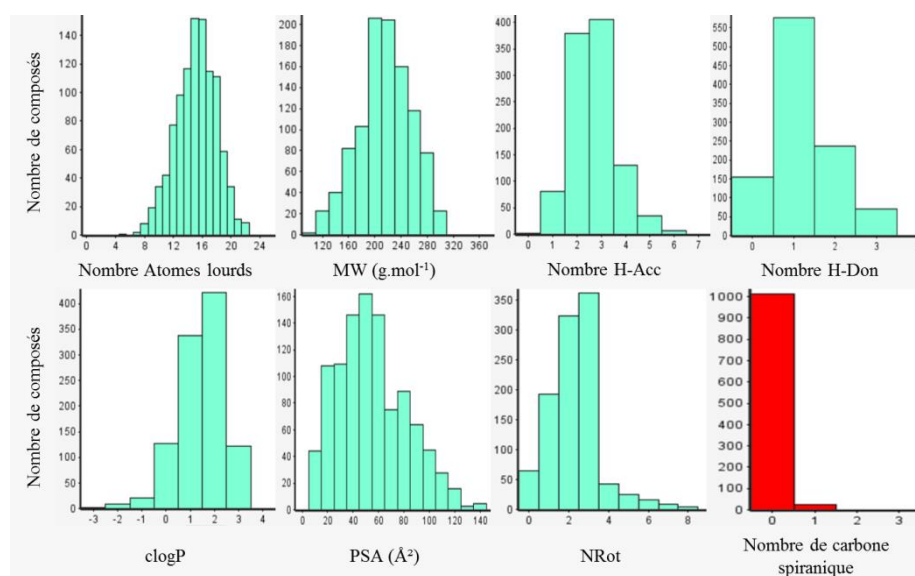


Figure 59 : Analyse des propriétés physico-chimiques de la chimiothèque de fragments de notre laboratoire

L'analyse des propriétés physico-chimiques des 1040 fragments de notre chimiothèque montre que la très grande majorité des composés respecte la règle des 3. De plus, pour chaque paramètre, une large distribution est observée indiquant que cette chimiothèque possède une bonne diversité en termes de propriétés physico-chimiques.

Néanmoins, comme attendu, notre chimiothèque est composée majoritairement de fragments aromatiques enrichis en carbone sp^2 . Le nombre de fragments possédant un carbone spiranique est extrêmement faible suggérant une absence de diversité en termes de forme moléculaire. Pour le vérifier, la géométrie de ces 1040 fragments a été examinée.

L'analyse des formes géométriques des fragments a été réalisée en utilisant les trois principaux moments d'inertie⁹⁹ (PMI, *principal moment of inertia*) notés I_1 , I_2 et I_3 . Ces trois valeurs sont calculées pour chaque fragment à partir de la conformation de plus bas niveau d'énergie. Les deux plus petits PMIs sont divisés par le plus grand afin d'aboutir aux deux moments d'inertie normalisés,

notés NPR1 et NPR2. La détermination de la conformation la plus stable de chaque fragment ainsi que le calcul des valeurs NPR1 et NPR2 ont été réalisés à partir du logiciel MOE® (Figure 60).

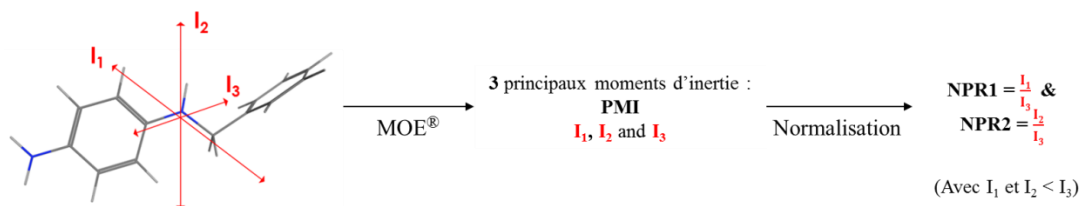


Figure 60 : Détermination des deux valeurs NPR1 et NPR2, sur la conformation de plus basse énergie, nécessaires à l'analyse des formes géométriques d'une structure

Ces deux valeurs sont ensuite reportées sur un graphique en abscisse et en ordonnée pour obtenir la carte triangulaire des formes géométriques. Chaque coin du triangle est caractéristique d'une géométrie précise : le coin en haut à gauche représente les molécules linéaires, le coin en bas représente les molécules planes et le coin en haut à droite représente les molécules sphériques (Figure 61).

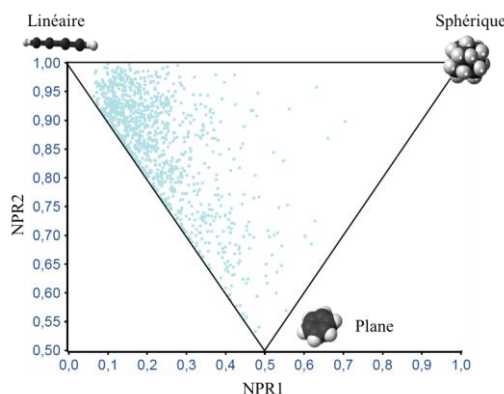


Figure 61 : Représentation 3D des fragments de notre chimiothèque – chaque carré bleu correspond à un fragment de notre chimiothèque

Comme l'indique la représentation triangulaire (Figure 61), les fragments de notre chimiothèque sont répartis vers la zone correspondant aux conformations linéaires ou planes dans l'espace 3-D, alors que la région sphérique est très peu peuplée. Ce manque de diversité géométrique peut limiter la découverte de composés actifs sur certaines cibles thérapeutiques. De plus, l'exploration tridimensionnelle de la poche d'une protéine est plus difficile à partir d'un hit fragment plan ou linéaire. Enfin, il a été montré que l'introduction de carbone sp^3 à une structure permet d'accroître sa solubilité⁹⁵, critère fondamental dans la conception d'un fragment. Pour pallier l'absence de diversité géométrique des chimiothèques, des fragments 3D enrichis en carbone sp^3 tétrasubstitués ou spiraniques ont été introduits.

De tels fragments peuvent provenir d'horizons différents. En effet, comme cela a été dit en introduction de cette partie, les produits naturels biologiquement actifs constituent une source d'inspiration indéniable dans la conception de nouvelles molécules^{100, 101}. Ces produits naturels tendent à avoir des structures tridimensionnelles plus marquées que les molécules synthétiques^{102, 103}. Ainsi, la déconstruction de produits naturels pourrait permettre de concevoir des fragments enrichis en carbones sp^3 . Récemment, une chimiothèque de fragments a été conçue en se basant sur l'analyse de produits naturels¹⁰⁴. La démarche mise en œuvre pour générer cette chimiothèque est présentée en Figure 62.

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

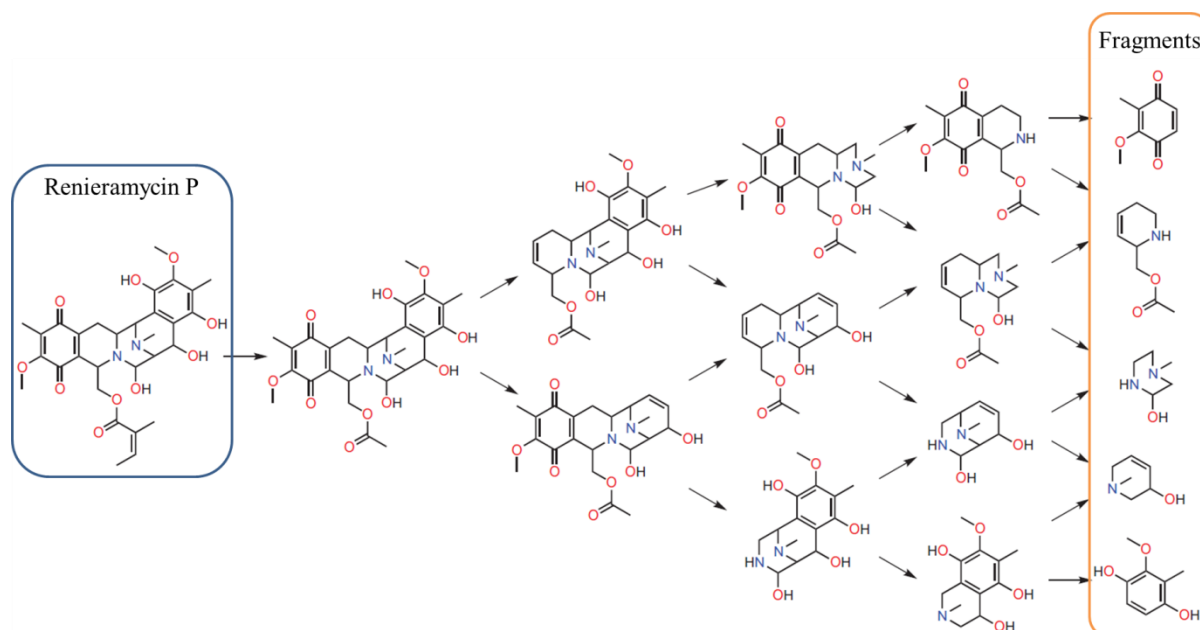


Figure 62 : Démarche entreprise pour générer une chimiothèque de fragments dérivés du produit naturel de Renieramycin P¹⁰⁴

A l'issue de la conception de cette chimiothèque de fragments dérivés de produits naturels, un criblage sur la kinase p38 a été réalisé. Un fragment atypique car non aromatique, capable de se lier dans la poche allostérique de p38, a été identifié confirmant l'intérêt de synthétiser des fragments non plans¹⁰⁴. Basée sur cette stratégie de fragments dérivés de produits naturels, d'autres études ont été réalisées^{105, 106}. Par ailleurs, la société Analyticon Discovery propose une chimiothèque de fragments, inspirés de produits naturels, nommée FRGx¹⁰⁷. Ces fragments, qui couvrent une cinquantaine de chémotypes différents, ont tous une masse molaire inférieure à 300 g.mol⁻¹. Ils sont enrichis en atome d'halogène et possèdent plusieurs sites de fonctionnalisation afin de pouvoir être optimisés de différentes manières (Figure 63).

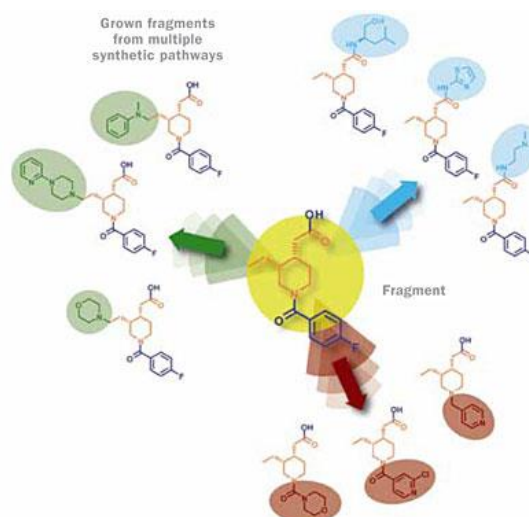


Figure 63 : Type de fragments inclus dans la chimiothèque FRGx d'Analyticon Discovery

Des fragments enrichis en carbones tétrasubstitués peuvent également être obtenus à partir de la synthèse de nouveaux squelettes moléculaires. Par exemple, Hung *et al.* ont appliqué le concept de *diversity-oriented synthesis* ou DOS afin de synthétiser une famille de fragments structurellement

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

proches et enrichis en carbone sp^3 . A partir de ce concept plusieurs composés bi-cycliques avec soit des carbones sp^3 soit des carbones spiraniques ont été obtenus⁹³. Ce concept est présenté en Figure 64.

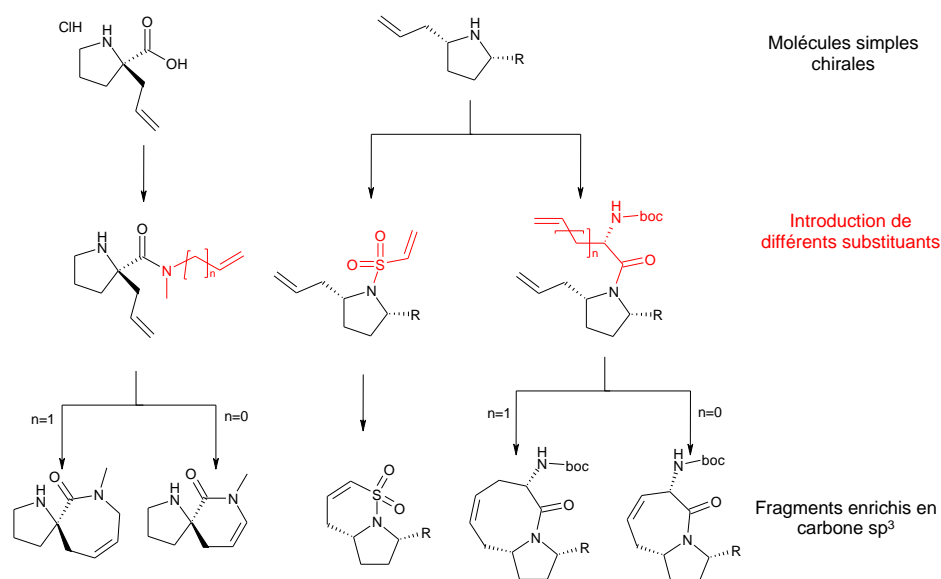


Figure 64 : Stratégie DOS pour concevoir des fragments 3D enrichis en carbones tétrasubstitués

Le concept DOS, appliqué à la synthèse de fragments 3D, consiste à introduire différents substituants sur une molécule de départ simple et chirale. Les intermédiaires obtenus pourront ensuite conduire, par des réactions intramoléculaires, à différents fragments enrichis en carbone sp^3 ou spiranique.

Récemment, d'autres équipes ont développé des squelettes moléculaires originaux possédant des carbones sp^3 ou spiraniques afin d'aboutir à des fragments 3D. Morgan *et al.* se sont ainsi intéressés à la synthèse de composés présentant le noyau 2-(aryl-sulfonyl)oxétanes¹⁰⁸ tandis que Tran *et al.* ont optimisé une voie de synthèse pour conduire au noyau 2-isoxazoline différemment fonctionnalisé¹⁰⁹ et ainsi générer une nouvelle famille de fragments 3D. Stotani *et al.* ont récemment conçu une chimiothèque de composés présentant deux carbones spiraniques en développant des voies de synthèse pour conduire aux noyaux bis-spiro-imidazolinone et bis-spiro-oxazolidine (Figure 65)¹¹⁰. Ces deux noyaux moléculaires, enrichis en carbone sp^3 , possèdent l'avantage de pouvoir être diversifiés en différentes positions (groupements R1, R2 et R3 sur la Figure 65).

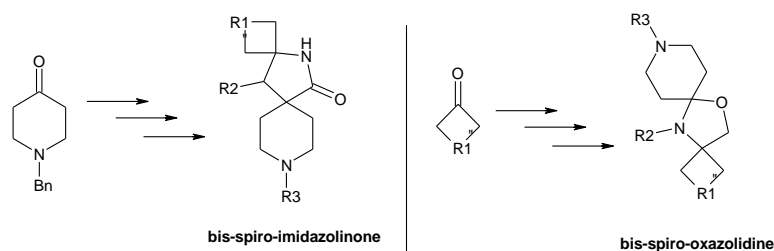


Figure 65 : Noyaux moléculaires bis-spiro-imidazolinone et bis-spiro-oxazolidine¹¹⁰

Cependant, la conception de fragments 3D ne doit pas conduire à des structures trop complexes qui feraient perdre l'un des avantages de l'approche par fragments. De plus, la voie réactionnelle conduisant à ces nouveaux fragments 3D doit rester simple et rapide afin de pouvoir enrichir efficacement la chimiothèque.

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Comme nous l'avons vu dans la partie I.1.2, le critère de sélection d'un fragment au cours d'une campagne de criblage est basé sur son efficacité. En conséquence, l'objectif n'est pas d'avoir des fragments totalement sphériques pour lesquels une faible efficacité peut être attendue. En effet, les atomes au centre de la sphère ne participeront pas aux interactions avec la cible. Autrement dit, il y aura d'avantages d'atomes « inutiles » qui ne prendront pas part aux phénomènes d'interaction mais qui en revanche contribueront à l'augmentation de la masse molaire du composé. L'objectif est donc d'utiliser des fragments, judicieusement conçus, comme instrument pour explorer les trois directions de l'espace suite à des fonctionnalisations avec de petits groupements. C'est donc dans ce sens que nous avons introduit le concept de fragments privilégiés.

1.3. Concept de fragments privilégiés

Le terme de structure privilégiée a été introduit pour la première fois en 1988¹¹¹. Ce terme désigne une sous-structure moléculaire commune à plusieurs composés ayant montré un intérêt thérapeutique pour des cibles différentes. Ce concept a depuis été très largement utilisé pour concevoir des chimiothèques et y inclure ce type de structures¹¹². Il a récemment été proposé une définition plus spécifique du terme de structure privilégiée : une petite entité moléculaire, non plane, possédant des propriétés physico-chimiques appropriées au développement d'un médicament, accessible par une voie de synthèse rapide et adoptant une conformation rigide capable d'être fonctionnalisée dans les trois directions de l'espace¹¹³. Cette notion pourrait ainsi être appliquée à la conception de fragments 3D et aboutir au concept de fragments privilégiés.

1.3.1. Cahier des charges du fragment privilégié

Un fragment privilégié est une structure respectant la règle de 3, soluble, accessible par une voie de synthèse rapide, reproductible et non substrat dépendante, présentant plusieurs points de fonctionnalisations (notés FS), adoptant une conformation rigide et présentant un caractère tridimensionnel. Ainsi, de part ce caractère tridimensionnel et la présence de plusieurs points d'ancrage, le fragment privilégié pourra être fonctionnalisé dans les trois directions de l'espace et permettra d'explorer plus efficacement l'espace chimique. La structure de ce fragment pourra être conçue à partir de squelettes moléculaires connus pour avoir un intérêt thérapeutique. De plus, la présence d'accepteurs et de donneurs de liaisons hydrogène sur cette structure associée à un caractère rigide permettra d'accroître la probabilité d'aboutir à des interactions favorables avec la cible thérapeutique étudiée. Afin d'illustrer cette définition, le Tableau 19 présente le cahier des charges du fragment privilégié¹¹⁴ :

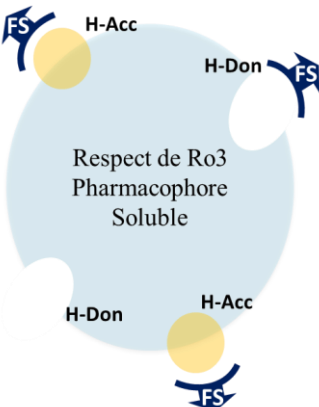
Structure	Propriétés	Recommandations
	Physico-chimiques	Règle de 3 Solubilité aqueuse > 0.1mM
	Structure moléculaire	Pharmacophore donneur & accepteur liaison hydrogène rigide & originale
	Forme géométrique	Diversité tridimensionnelle
	Fonctionnalisation	Plusieurs sites de fonctionnalisation (FS)
	Accessibilité synthétique	Rapide, non substrat dépendante

Tableau 19 : Cahier des charges du fragment privilégié

En prenant en compte les critères précédemment énoncés, nous nous sommes intéressés à deux séries chimiques, l'une comportant un noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et l'autre un noyau 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione.

1.3.2. Intérêts des noyaux 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione

Les noyaux 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione (Figure 66) respectent le cahier des charges présenté précédemment (Tableau 19).

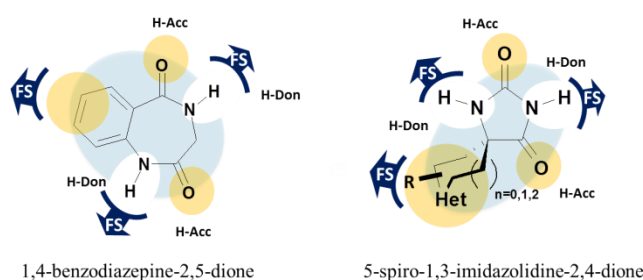


Figure 66 : Structures des noyaux 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione

Ces deux noyaux moléculaires respectent la règle des 3 avec une masse molaire bien inférieure à 300 g.mol⁻¹. Le noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione est présent dans de nombreux composés possédant une activité biologique¹¹⁵. Ces composés sont majoritairement connus pour leurs propriétés anxiolytiques et hypnotiques¹¹⁶ en agissant comme agoniste du récepteur GABA_A. L'hétérocycle 1,3-imidazolidine-2,4-dione, aussi appelé hydantoïne, est également retrouvé dans de nombreux composés biologiquement actifs. Par exemple, la phénytoïne (5,5-diphénylhydantoïne) est un médicament utilisé comme antiépileptique¹¹⁷ (Figure 67). D'autres structures contenant cet hétérocycle ont montré des

propriétés agoniste¹¹⁸ ou antagoniste¹¹⁹ des récepteurs nucléaires comme le nilutamide ou inhibitrice de l'enzyme TACE¹²⁰. L'introduction d'un carbone spiranique en position 5 de cet hétérocycle conduit à des structures spirohydantoïnes qui ont également montré un intérêt thérapeutique. Certains composés ont présenté des propriétés anti-tumorales¹²¹, d'autres se sont révélés inhibiteurs de la glycogène phosphorylase¹²² ou encore inhibiteurs de l'aldose réductase comme le Sorbinil¹²³⁻¹²⁵.

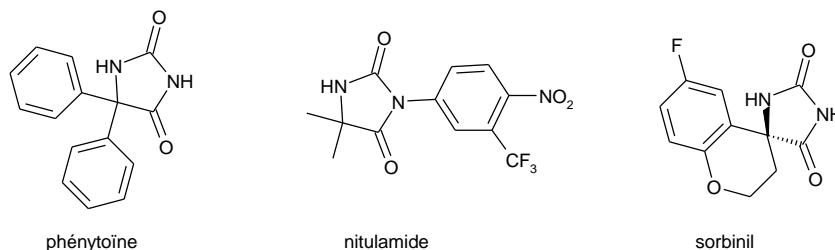


Figure 67 : Structures de composés biologiquement actifs contenant un noyau hydantoïne

Les noyaux 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et 1,3-imidazolidine-2,4-dione peuvent porter un atome de carbone spiranique en position 3 et 5 respectivement. La présence d'un atome de carbone spiranique est très intéressante puisqu'elle permet d'ajouter de l'originalité et de la rigidité aux noyaux mais aussi un caractère tridimensionnel aux structures¹²⁶. En outre, les atomes d'azote de ces deux structures ainsi que le cycle aromatique de la 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et le cycle aliphatique du 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione peuvent être fonctionnalisés. Ces différents sites de fonctionnalisation devraient permettre d'utiliser ces noyaux comme instrument pour explorer les trois directions de l'espace.

II. Conception de chimiothèques focalisées autour des noyaux 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione

Les synthèses développées autour de ces deux noyaux ont été optimisées pour qu'elles soient adaptées à la conception de chimiothèques. Ainsi, le temps de réaction, la facilité de traitement, le rendement et l'accessibilité synthétique ont été les principaux critères étudiés au cours de ce travail.

II.1. Voies d'accès au noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et caractérisation de la chimiothèque focalisée

Précurseur de l'hétérocycle benzodiazépine^{127, 128}, le noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione a été très largement étudié. Différentes voies d'accès ont ainsi été décrites dans la littérature.

II.1.1. Voies d'accès existantes du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione

La synthèse du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione est généralement effectuée par réaction entre l'anhydride isatoïque et un α -aminoacide ou un α -aminoester. Différents solvants, temps de réaction et températures réactionnelles ont été décrits dans la littérature. Par exemple, Bakavoli *et al.*

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

ont réalisé la synthèse de différents noyaux 1,4-benzodiazépine-2,5-dione en deux temps (condition 1, Tableau 20)¹²⁹. Une première étape a consisté à obtenir l'intermédiaire issu de la condensation de l' α -aminoacide désiré sur l'anhydride isatoïque dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium. Dans un second temps, l'intermédiaire a été cyclisé dans un excès de trichlorure de phosphore pour aboutir aux différents composés désirés. Malgré les rendements satisfaisants obtenus pour les étapes A (69% à 89%) et B (61% à 78%) les temps de réaction à appliquer (18 h – étape A et 5 h – étape B) sont trop longs pour que ces conditions soient adaptées à la synthèse d'une chimiothèque de composés. En reprenant ce même enchaînement réactionnel, Barlind *et al.* ont eu recours à un chauffage par micro-ondes en utilisant le DMSO puis l'AcOH comme solvants de réaction respectivement pour la première puis la seconde étape (condition 2, Tableau 20)¹³⁰. Le recours à une irradiation micro-ondes a permis de réduire les temps de réactions pour l'étape de condensation de l' α -aminoacide sur l'anhydride isatoïque (3 h) ainsi que pour l'étape de cyclisation (30 à 50 min). Même si ces conditions de chauffage par micro-ondes ont conduit à deux noyaux 1,4-benzodiazépine-2,5-dione avec un carbone spiranique en position 3, les rendements associés ont été moins bons que ceux obtenus par chauffage thermique (condition 2 vs 1).

Anhydride isatoïque (1 eq) + Acide aminé (1 eq) $\xrightarrow{\text{Etape A}}$ Intermédiaire $\xrightarrow{\text{Etape B}}$ Noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione

Condition	Acide Aminé	Etape A			Etape B		
		Solvant	Temps Température	Rdt (%)	Solvant	Temps Température	Rdt (%)
1 ¹²⁹	L-Ala	NaOH (1.25 eq)	18 h	89	POCl ₃	5 h	78
	L-Phe			85			Reflux
	L-Val	H ₂ O	TA	71		64	
	L-Leu		69	61			
2 ¹³⁰	 n = 0, 1	DMSO	μ W 2.5 h 150 °C	42	AcOH	μ W 30 à 50 min 200 °C	45

Tableau 20 : Conditions réactionnelles décrites dans la littérature pour la synthèse du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione en deux étapes^{129, 130}

D'autres voies de synthèse non séquentielles ont été développées en faisant réagir un α -aminoacide avec l'anhydride isatoïque. Les solvants les plus couramment utilisés pour conduire au noyau désiré en une seule étape sont le DMSO^{131, 132}, l'eau basique/l'acide acétique¹³³⁻¹³⁵ et le liquide ionique [bmim]Br¹³⁶. Les différents schémas réactionnels sont présentés dans le Tableau 22.

Condition	Acide Aminé	Solvant	Conditions en Chauffage thermique	Rdt (%)	Conditions en Chauffage μ W	Rdt (%)
1 ¹³¹	Gly	DMSO	1.5 à 3 h Reflux	92	3 à 5 min 600 W	20
	L-Ala			90		25
	L-Leu			95		18
	L-Phe			90		15
	L-Val			85		20
	L-HomoPro			98		98
2 ¹³³⁻¹³⁵	L-Phe	(i) H ₂ O – TEA (2eq) (ii) AcOH	(i) 24 à 48 h TA	78	-	-
	L-Glu		(ii) 5 à 48 h Reflux	48		
3 ¹³⁶	Sar	[bmim]Br	20 à 95 min 70 °C	91	-	-
	L-Pro			95		
	L-HomoPro			88		

Tableau 21 : Conditions réactionnelles décrites pour la synthèse du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione à partir d'acides aminés¹³¹⁻¹³⁶

L'utilisation de DMSO comme solvant réactionnel a conduit aux 6 composés issus de la condensation de la Gly, L-Ala, L-Leu, L-Phe, L-Val ou de la L-HomoPro sur l'anhydride isatoïque avec des rendements variant de 85% à 98% après 1.5 h à 3 h de chauffage thermique. Grâce à l'utilisation d'un chauffage par micro-ondes, ces 6 mêmes composés ont pu être synthétisés avec des temps de réaction réduits puisque seulement 3 à 5 min de chauffage par micro-ondes ont été nécessaires. Cependant, hormis pour la L-HomoPro où un chauffage thermique et par micro-ondes ont abouti au même rendement, pour la Gly, L-Ala, L-Leu, L-Phe et L-Val les rendements obtenus par chauffage par micro-ondes ont été nettement plus faibles que ceux obtenus par chauffage thermique¹³¹.

En condition eau basique/AcOH, la condensation de la L-Phe ou de la L-Glu sur l'anhydride isatoïque permet d'obtenir les produits correspondants avec des rendements de 78% et 48% respectivement^{133, 135}. Cependant, les temps de réaction sont trop longs (de 29 h à 64 h pour les deux étapes cumulées) pour que ce protocole réactionnel soit applicable à la synthèse d'une chimiothèque de composés.

L'utilisation du liquide ionique [bmim]Br comme solvant de réaction a permis d'obtenir les 3 produits issus de la condensation de la sarcosine (Sar), de la L-Pro ou de la L-HomoPro sur l'anhydride isatoïque avec des rendements de 91%, 95% et 88% respectivement¹³⁶. Du fait des temps de réaction relativement courts (de 20 min à 95 min), cette stratégie est appropriée à la synthèse d'une chimiothèque de composés.

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

D'autre part, la synthèse du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione peut être également réalisée en faisant réagir l'anhydride isatoïque avec un α -aminoester éthylique dans la pyridine anhydre. Les principales conditions décrites dans la littérature^{132, 137, 138} sont présentées en Figure 68.

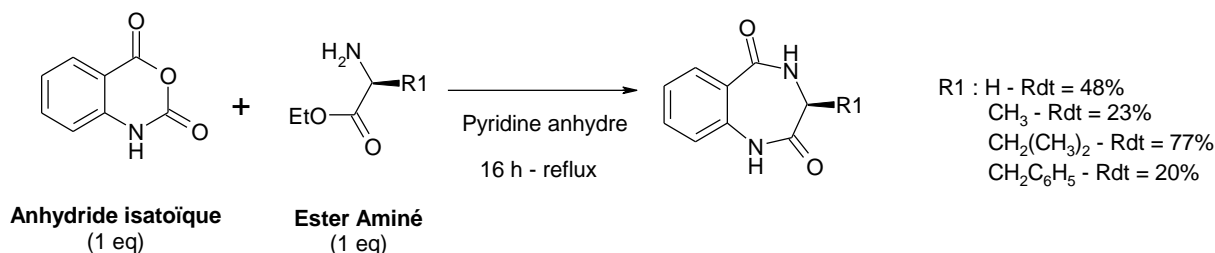


Figure 68 : Conditions réactionnelles utilisées pour la synthèse du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione dans la pyridine anhydre à partir d' α -aminoesters éthyliques¹³²

Ces conditions réactionnelles à partir d'un α -aminoester éthylique constituent une autre piste à envisager. Les temps de réaction longs en chauffage thermique (16 h) pourraient être réduits par l'utilisation du chauffage par micro-ondes.

Le mécanisme pour l'obtention de ce noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione à partir de l'anhydride isatoïque et de l' α -aminoester est proposé en Figure 69.

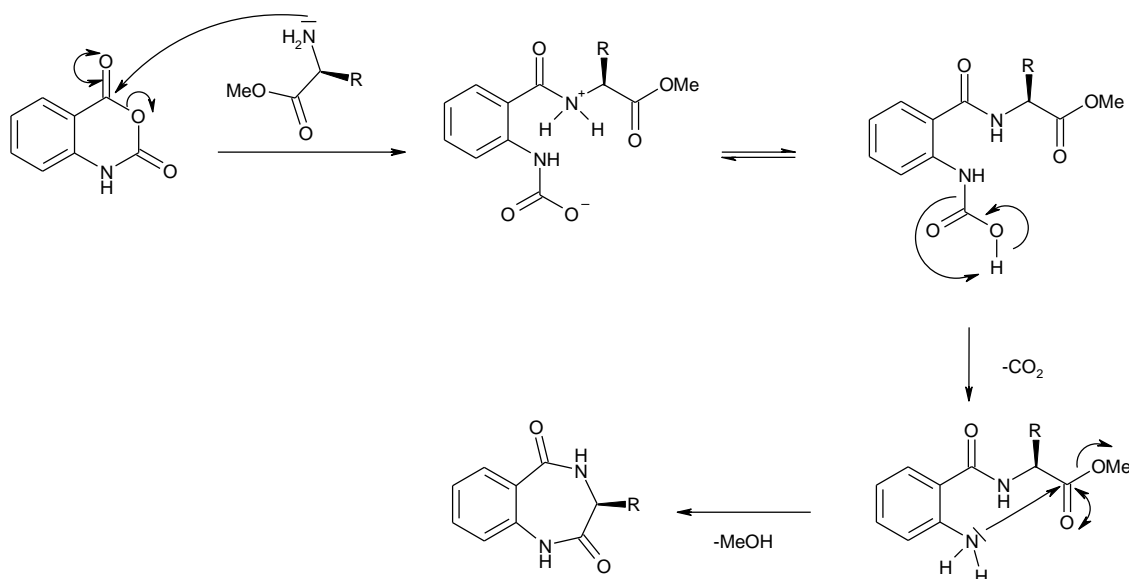


Figure 69 : Mécanisme de formation du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione

La première étape consiste en un processus d'addition/élimination de l'atome d'azote de l' α -aminoester sur le centre le plus électrophile de l'anhydride isatoïque. Ce centre électrophile type ester est plus électrophile que celui type carbamate puisqu'il ne présente pas en alpha l'atome d'azote dont le doublet peut se délocaliser sur la fonction carbonyle. Après un équilibre prototropique et une étape de décarboxylation, un nouveau processus d'addition/élimination de l'atome d'azote de l'aniline sur la fonction ester méthylique permet d'aboutir à la formation du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et d'une molécule de méthanol.

Sur la base de ce qui a été décrit dans la littérature, nous avons essayé d'optimiser les conditions utilisant le liquide ionique et la pyridine anhydre comme solvants de réaction en remplaçant le chauffage thermique par un chauffage micro-ondes.

II.1.2. Synthèses développées pour conduire au noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione

II.1.2.1. Synthèse du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione dans le liquide ionique [bmim]BF₄

II.1.2.1.1. Influence d'une irradiation micro-ondes par rapport à un chauffage thermique

A partir des travaux réalisés par Jadidi *et al.*¹³⁶ différentes conditions ont été essayées pour évaluer l'influence d'une irradiation micro-ondes (μ W) par rapport à un chauffage thermique. La réaction test a été effectuée à partir de l'anhydride isatoïque et de la L-proline. Le [bmim]BF₄ a été utilisé comme liquide ionique pour cette réaction afin d'aboutir au composé désiré **138**.

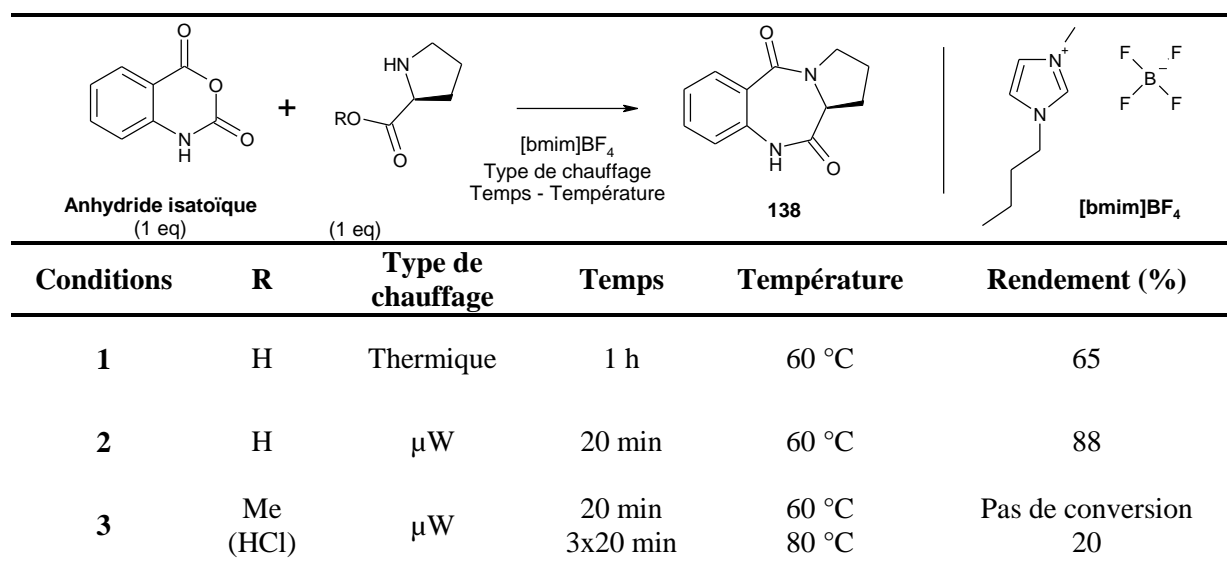


Tableau 22 : Résultats obtenus pour la synthèse du produit **137** dans le liquide ionique [bmim]BF₄

Dans ces conditions, un chauffage thermique d'1 h à 60 °C a été nécessaire pour aboutir au composé **138** avec un rendement de 65% (condition 1). A cette même température, sous irradiation micro-ondes, 20 min ont été suffisantes pour conduire au composé attendu avec un rendement de 88% (condition 2). En revanche, lorsque ces mêmes conditions micro-ondes sont appliquées sur l'anhydride isatoïque et la L-Pro-OMe, aucune conversion n'est observée. Trois irradiations successives de 20 min à 80 °C ont néanmoins permis de conduire au produit **138** désiré mais avec un rendement plus faible de 20%. L'ensemble de ces résultats montre que les meilleures conditions pour obtenir le noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione dans le liquide ionique [bmim]BF₄ sont celles qui consiste à faire réagir l'anhydride isatoïque et la L-Pro sous irradiation micro-ondes pendant 20 min à 60 °C. Ces conditions réactionnelles ont donc été appliquées à d'autres α -aminoacides.

II.1.2.1.2. Produits obtenus et rendements associés à partir de cette voie de synthèse dans le liquide ionique [bmim]BF₄ par irradiation micro-ondes

Les structures obtenues et les rendements associés sont présentés dans le Tableau 23.

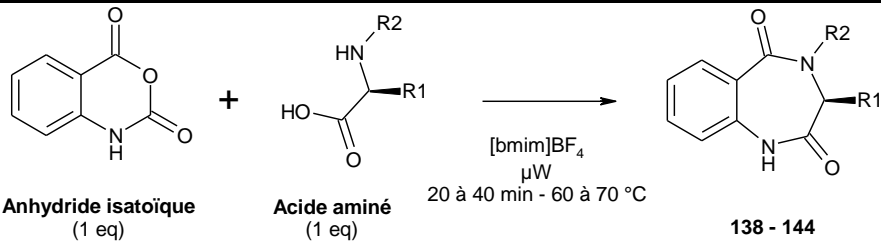
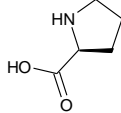
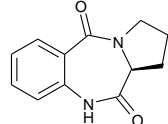
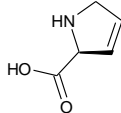
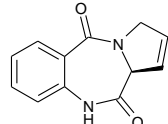
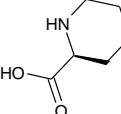
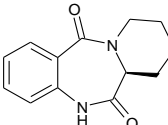
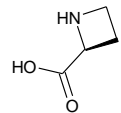
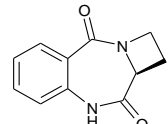
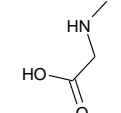
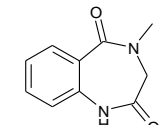
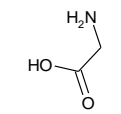
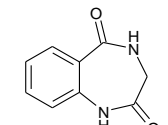
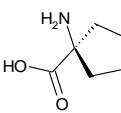
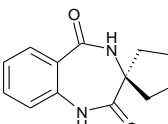
				
Composé	Acide aminé	Temps Température	Produit	Rendement (%)
138		20 min - 60 °C		88
139		30 min - 70 °C		72
140		30 min - 70 °C		57
141		40 min - 70 °C		44
142		40 min - 70 °C		50
143		20 min - 70 °C 30 min - 80 °C		Produit non observé
144		20 min - 60°C 20 min - 70°C 20 min - 100°C		Produit observé à l'état de traces

Tableau 23 : Structures et rendements obtenus à partir des conditions réactionnelles s'effectuant dans le liquide ionique [bmim]BF₄ par irradiation micro-ondes (μW)

Les composés **138** à **142** ont été obtenus avec des rendements allant de 44% à 88%. En fonction de la nature de l' α -aminoacide de départ, les temps de réaction ont varié de 20 min à 40 min tandis que la température maximale appliquée a été de 70 °C. La di-substitution de l'atome d'azote de l' α -aminoacide semble être importante puisque l'irradiation micro-ondes appliquée à la sarcosine (*N*-méthylglycine) a permis d'aboutir au composé désiré **142** avec un rendement de 50%. En revanche, une irradiation micro-ondes de 20 min à 70 °C appliquée à la glycine n'a pas conduit au produit **143**. L'irradiation micro-ondes supplémentaire de 30 min à 80 °C a entraîné de la dégradation et le produit **143** n'a pas été observé. De la même manière, des irradiations micro-ondes à différentes températures, 60 °C, 70 °C et 100 °C appliquées successivement à la cycloleucine n'ont pas permis d'aboutir au composé **144** désiré. Ces résultats suggèrent que seuls des α -aminoacides portant une amine secondaire réagissent dans ces conditions réactionnelles.

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Comme nous l'avons vu dans la partie I.3.2., l'introduction d'un carbone spiranique en position 3 du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione permet d'aboutir à des molécules respectant le cahier des charges du fragment privilégié. Afin d'obtenir des composés 3-spiro-1,4-benzodiazépine-2,5-dione à partir de cette stratégie réactionnelle utilisant le liquide ionique [bmim]BF₄ comme solvant réactionnel, nous avons décidé de synthétiser des α -aminoacides cycliques *N*-monométhylés.

II.1.2.1.3. N-monométhylation d' α -aminoacides cycliques

La synthèse des α -aminoacides cycliques *N*-monométhylés a été réalisée à partir d'une séquence réactionnelle de protection, méthylation et déprotection^{139, 140}. La stratégie de synthèse appliquée est présentée en Figure 70.

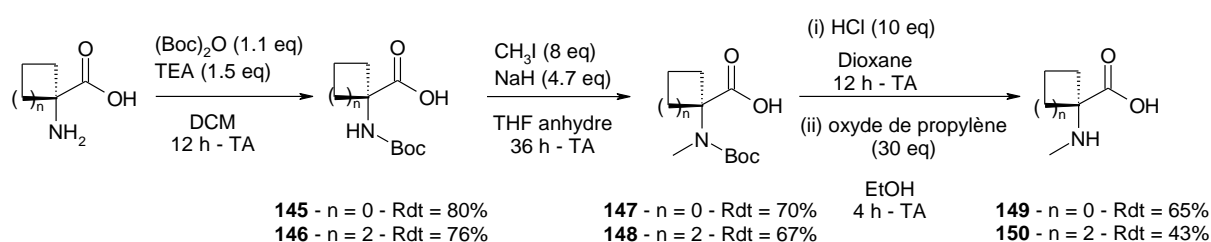


Figure 70 : Stratégie réalisée pour N-monométyler deux α -aminoacides cycliques : l'acide 1-aminocyclopropanoïque (n = 0) et la cycloleucine (n = 2)

L'acide 1-aminocyclopropanoïque (n = 0) et la cycloleucine (n = 2) ont d'abord été protégés par un groupement Boc afin d'obtenir les composés **145** et **146** avec des rendements respectifs de 80% et 76%. Ces produits protégés **145** et **146** ont ensuite été *N*-monométhylés en présence d'iodométhane en utilisant l'hydruide de sodium comme base dans le THF anhydre pour aboutir aux composés **147** et **148** avec des rendements de 70% et 67% respectivement. Les produits **147** et **148** ont ensuite été déprotégés avec une solution d'HCl dans le dioxane pour conduire aux composés **149** et **150**, isolés sous forme libre, avec des rendements de 65% et 43%.

Les deux α -aminoacides cycliques **149** et **150** ont été engagés dans les conditions réactionnelles optimisées précédemment. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 24.

Composé	Acide aminé	Temps Température	Produit	Rendement (%)
151		20 min - 60 °C		Pas de conversion
		20 min - 80 °C		Produit observé à l'état de traces
		30 min - 100 °C		Produit observé à l'état de traces
152		20 min - 60 °C		Pas de conversion
		20 min - 80 °C		Pas de conversion et dégradation
		30 min - 100 °C		Dégradation

Tableau 24 : Conditions appliquées pour la synthèse des composés **151** et **152** à partir des α -aminoacide cycliques *N*-monométhylés **149** et **150**

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Dans les deux cas, à l'issue d'irradiations micro-ondes successives à des températures croissantes (60 °C, 80 °C et 100 °C), le produit désiré n'a pas été observé (**151**) ou uniquement à l'état de traces (**152**). De plus, à partir de 80 °C, le milieu réactionnel se dégrade.

Comme l'indique les résultats du Tableau 24, ces conditions réactionnelles ne peuvent pas être étendues aux α -aminoacides cycliques. Or, l'intérêt est justement d'introduire en position 3 un carbone spiranique afin d'ajouter de l'originalité, de la rigidité et d'apporter un caractère tridimensionnel au noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione. Etant donné que ces conditions utilisant le liquide ionique [bmim]BF₄ comme solvant de réaction n'ont pas permis d'obtenir ce type de structure, une autre stratégie a été développée.

II.1.2.2. Synthèse du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione dans la pyridine anhydre

II.1.2.2.1. Influence du solvant dans des conditions d'irradiation micro-ondes

A l'issue de travaux précédemment réalisés au sein de notre laboratoire, il avait été constaté que la synthèse de benzodiazépine pouvait être réalisée par chauffage thermique d'une solution d'anhydride isatoïque et d'un α -aminoacide sous forme d'ester méthylique dans la pyridine anhydre.

Nous avons donc cherché à examiner si, par irradiation micro-ondes dans ces mêmes conditions on pouvait obtenir les produits désirés dans un temps de réaction plus court. Nous avons également comparé l'influence du solvant sur cette réaction en comparant la pyridine avec le DMSO et l'AcOH. La réaction test a été effectuée en partant de l'anhydride isatoïque et de la glycine sous forme d'ester méthylique (Gly-OMe). La température a été fixée à 130 °C et le temps de réaction à 30 min (Figure 71). Ces différentes expériences ont été comparées en évaluant la conversion par LC/MS.

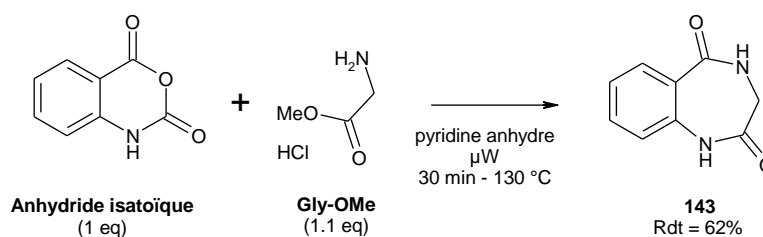


Figure 71 : Conditions réactionnelles optimisées pour la synthèse du composé **143**

Une irradiation micro-ondes de 30 min à 130 °C dans la pyridine anhydre a permis d'aboutir au composé désiré **143** avec un rendement de 62%. Dans ces mêmes conditions de chauffage, mais en utilisant soit le DMSO, soit l'AcOH, le produit désiré **143** n'a jamais été observé et le milieu réactionnel s'est dégradé. Par conséquent, la pyridine anhydre a été conservée comme solvant et le temps et la température d'irradiation micro-ondes ont ensuite été optimisés.

II.1.2.2.2. Influence du temps et de la température

Les paramètres temps et température dans les conditions d'une irradiation micro-ondes ont été examinés dans le cadre de la réaction entre l'anhydride isatoïque et la Gly-OMe dans la pyridine

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

anhydre. De plus, nous avons de nouveau comparé les résultats obtenus par chauffage par micro-ondes et par chauffage thermique. Pour chacune des conditions, la conversion en produit désiré **143**, déterminée par LC/MS, ainsi que le rendement, obtenu après purification, sont présentées dans le Tableau 25 où figure également les conditions décrites dans la littérature¹³².

Anhydride isatoïque (1 eq) + Gly-OR (1.1 eq) $\xrightarrow[\text{Pyridine anhydre, } \mu\text{W ou chauffage thermique, Temps/Température}]{}$ **143**

Condition	R	Type de chauffage	Temps/Température	Conversion (%)	Rdt (%)
1	Me	μW	30 min - 130 °C	100	62
2	Me	μW	30 min - 120 °C	100	45
3	Me	μW	30 min - 110 °C 30 min - 110 °C	80 100	34
4	Me	μW	10 min - 150 °C	100	76
5	Me	Thermique	19 h - 120 °C	100	70
6 ¹³²	Et	Thermique	16 h - 120 °C	-	48

Tableau 25 : Résultats concernant l'influence des paramètres temps et température de l'irradiation micro-ondes et intérêt de l'irradiation (μW) par rapport à un chauffage thermique pour la synthèse du composé **143**

Pour une durée d'irradiation identique de 30 min, le paramètre température a une influence sur la réaction puisqu'à 110 °C une conversion de seulement 80% a été observée (condition 3) alors qu'à 120 °C (condition 2) et 130 °C (condition 1) la conversion était totale. Pour obtenir une conversion totale à 110 °C il a fallu 60 min, soit deux fois plus de temps (condition 3). Finalement, une diminution du temps d'irradiation à 10 min accompagnée d'une augmentation de température à 150°C, a permis d'obtenir une conversion totale et un rendement de 76% (condition 4).

En parallèle, un chauffage thermique de 19 h à 120 °C a conduit à une conversion totale et le produit **143** a été isolé avec un rendement de 70%. Le temps réactionnel est proche de celui décrit dans la littérature (condition 5 vs condition 6). Ce résultat confirme l'intérêt de l'utilisation d'une irradiation micro-ondes par rapport au chauffage thermique qui a permis de réduire considérablement le temps de réaction tout en conservant une conversion totale en produit désiré **143** (condition 4 vs condition 5). Ainsi, ces conditions réactionnelles d'irradiation micro-ondes de 10 min à 150 °C ont été appliquées à différents α -aminoesters méthyliques.

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

II.1.2.2.3. Produits obtenus et rendements associés à partir de cette voie de synthèse dans la pyridine

Les différents produits obtenus ainsi que les rendements associés sont présentés dans le Tableau 26.

Ester aminé	Temps	Composé	Structure	Rendement (%)
	10 min	143		76
	10 min	153		42
	30 min	154		43
	50 min	155		35
	30 min	156		28
		156'		
	10 min	144		Plus de produit de départ Produit non observé Mélange réactionnel très complexe

Tableau 26 : Structures obtenues et rendements associés à partir des conditions réactionnelles s'effectuant dans la pyridine anhydre par irradiation micro-ondes (μW) à 150°C

Les structures **143** et **153** à **156** ont été obtenues avec des rendements variant de 28% à 76%. En fonction de l' α -aminoester méthylique de départ, les temps réactionnels varient de 10 min à 50 min pour une température fixée à 150 °C. Lors de la caractérisation par RMN du composé **156** deux populations de carbone ont été observées. Une expérience RMN à haute température (80 °C) a permis de confirmer qu'il ne s'agissait pas de conformères. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une épimérisation de l'atome de carbone en alpha de la fonction carbonyle pouvait avoir lieu ce qui conduit à l'obtention d'un mélange des deux diastéréoisomères **156** et **156'**. Afin de vérifier si les

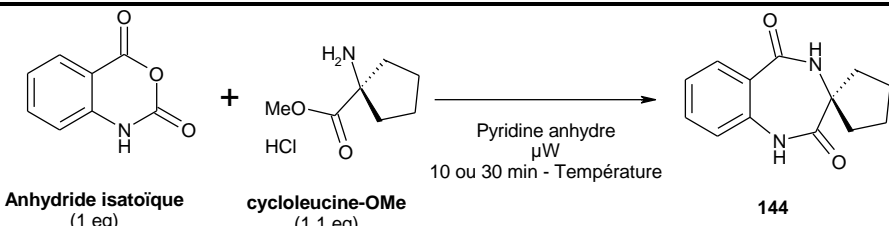
Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

composés **153** à **155** sont sous forme de mélange racémique, une mesure du pouvoir rotatoire va être effectuée.

Une irradiation micro-ondes de 10 min à 150 °C appliquée à la cycloleucine sous forme d'ester méthylique n'a pas permis d'aboutir au composé désiré **144**. A l'issue de cette irradiation, bien que l'anhydride isatoïque ait été totalement consommé, un mélange très complexe a été obtenu et le produit **144** n'a pas été observé. Il a donc été décidé d'optimiser ces conditions d'irradiation à partir de la cycloleucine sous forme d'ester méthylique afin de pouvoir obtenir le composé **144**.

II.1.2.2.4. Optimisation de conditions réactionnelles pour la synthèse du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione possédant un carbone spiranique en position 3

Différentes irradiations micro-ondes ont été appliquées en faisant varier la température (de 180 °C à 250 °C) et le temps (de 10 min à 30 min). Pour chacune de ces expériences, la conversion en produit désiré **144** a été déterminée par LC/MS et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 27.



Anhydride isatoïque (1 eq) + cycloleucine-OMe (1.1 eq) $\xrightarrow[\text{10 ou 30 min - Température}]{\text{Pyridine anhydre } \mu\text{W}}$ **144**

Condition	Temps (min)	Température (°C)	Conversion (%)
1	10	180	20
2	10	200	40
3	10	230	55
4	10	250	65
5	30	180	25
6	30	200	45
7	30	230	75
8	30	250	75

Tableau 27 : Résultats obtenus en faisant varier la température et le temps pour la synthèse du composé **144** sous irradiation micro-ondes

Ces résultats indiquent que l'augmentation de température permet d'aboutir à une conversion plus élevée en produit désiré **144**. A une même température d'irradiation, un temps de 30 min permet d'augmenter la conversion par rapport à un temps de 10 min. Les meilleures conversions ont été obtenues après une irradiation de 30 min à 230 °C et 250 °C. La condition 7 (30 min, 230 °C) a permis d'isoler le composé **144** avec un rendement de 65%.

De façon à exemplifier cette voie de synthèse, il a été décidé de synthétiser d'autres α -aminoesters méthyliques non naturels possédant un carbone spiranique.

II.1.2.2.5. Synthèse d' α -aminoesters cycliques

La stratégie de synthèse envisagée pour l'obtention d' α -aminoesters cycliques sous forme méthyliques est présentée en Figure 72.

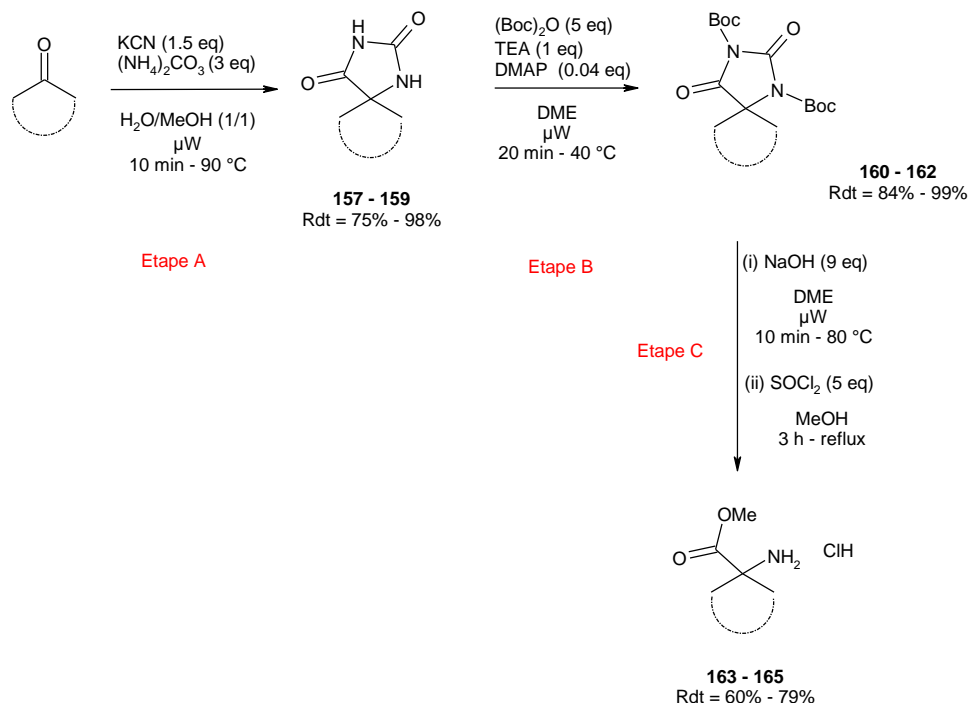


Figure 72 : Stratégie réactionnelle de synthèse des α -aminoesters cycliques **163** à **165** à partir de cétones cycliques

Cette stratégie de synthèse, basée sur des travaux décrits dans la littérature¹⁴¹⁻¹⁴³, a permis d'aboutir en quatre étapes aux différents α -aminoesters désirés **163** à **165** à partir des cétones cycliques correspondantes. Ainsi, trois cétones cycliques ont été engagées dans cette stratégie de synthèse : la 4-méthylpipéridone, la 4-propylpipéridone et la 4-oxanone. La première étape a consisté à obtenir les noyaux spirohydantoïnes **157** à **159** à partir des trois cétones cycliques. Les hétérocycles hydantoïnes ont ensuite été activés en substituant les deux atomes d'azote par des groupements Boc afin de pouvoir les hydrolyser pour aboutir aux α -aminoacides qui ont été directement estérifiés pour obtenir les α -aminoesters cycliques **163** à **165**. Les rendements obtenus pour ces différentes étapes sont présentés dans le Tableau 28.

Composé	Structure	Rendement (%) Etape A	Rendement (%) Etape B	Rendement (%) Etape C
163		98	99	60
164		75	85	79
165		97	84	72

Tableau 28 : Rendements obtenus pour les trois étapes de synthèse des composés **163** à **165**

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Ces trois étapes ont été optimisées par rapport à celles décrites dans la littérature :

Etape A : les optimisations faites sur cette première étape seront présentées dans la partie II.2. puisque le cycle spirohydantoïne constitue le second noyau étudié pendant ces travaux de recherche.

Etape B : les premières réactions d'activation du noyau hydantoïne ont été faites à température ambiante. Les temps de réaction, conformes à ceux décrits dans la littérature^{141, 143}, ont varié de 4 h à 16 h et les rendements allaient de 81% à 99%. Cette synthèse a ensuite été réalisée avec une irradiation micro-ondes afin de réduire les temps de réaction. Les nombres d'équivalents de (Boc)₂O, de TEA et DMAP étaient identiques à ceux utilisés à température ambiante. Dans ces conditions, une irradiation de 20 min à 40 °C a conduit aux différents composés **160** à **162** avec des rendements variant de 84% à 99%. L'utilisation d'une irradiation micro-ondes a donc permis de réduire significativement les temps de réaction tout en conservant des rendements similaires à ceux obtenus à température ambiante.

Etape C : l'étape d'hydrolyse du noyau hydantoïne a d'abord été réalisée par voie thermique. Les composés **160** à **162** ont réagi avec de l'hydroxyde de sodium comme base dans le DME pendant 6 h à 24 h à reflux. Les différents α -aminoacides ont été isolés avec des rendements allant de 60% à 75%. De la même manière que pour l'étape B, dans le but de diminuer ce temps de réaction, cette hydrolyse a été réalisée avec une irradiation micro-ondes. En utilisant le même nombre d'équivalents d'hydroxyde de sodium, une irradiation de 20 min à 80 °C a permis d'aboutir aux différents α -aminoacides qui ont directement été estérifiés avec le chlorure de thionyle dans le méthanol. Les produits désirés **163** à **165** ont été obtenus après 3 h d'agitation à reflux. Les rendements de l'étape d'hydrolyse et d'estérification ont variés de 60% à 79%.

Les trois α -aminoesters cycliques **163** et **165** ont ensuite réagi avec l'anhydride isoïque pour former le noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 29.

Ester aminé	Composé	Structure	Rendement (%)
	166		12
	167		7
	168		16

Tableau 29 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés 144, et 166 à 168 par irradiation micro-ondes

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Les trois noyaux 1,4-benzodiazépine-2,5-dione (**166** à **168**) possédant un carbone spiranique en position 3 ont été obtenus avec des rendements allant de 7% à 16%. Après une première irradiation de 30 min à 230 °C le produit désiré n'a pas été observé donc une deuxième irradiation de 30 min à 250 °C a été appliquée. Les très faibles rendements obtenus pour les composés **166** à **168** s'expliquent par la nécessité d'effectuer deux purifications consécutives pour chaque produit à cause de la présence de nombreux produits secondaires dans le milieu réactionnel.

Aux vues des difficultés rencontrées pour synthétiser le noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione possédant un carbone spiranique en position 3 il a été décidé de ne pas poursuivre les travaux liés à la synthèse de ces dérivés.

II.1.2.3. Conclusion sur les stratégies développées pour synthétiser le noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione

Au cours de cette étude trois voies de synthèse ont été optimisées. Ces trois voies ont reposé sur l'utilisation d'un chauffage par micro-ondes. Ces différentes stratégies ainsi que les produits obtenus sont résumées en Figure 73.

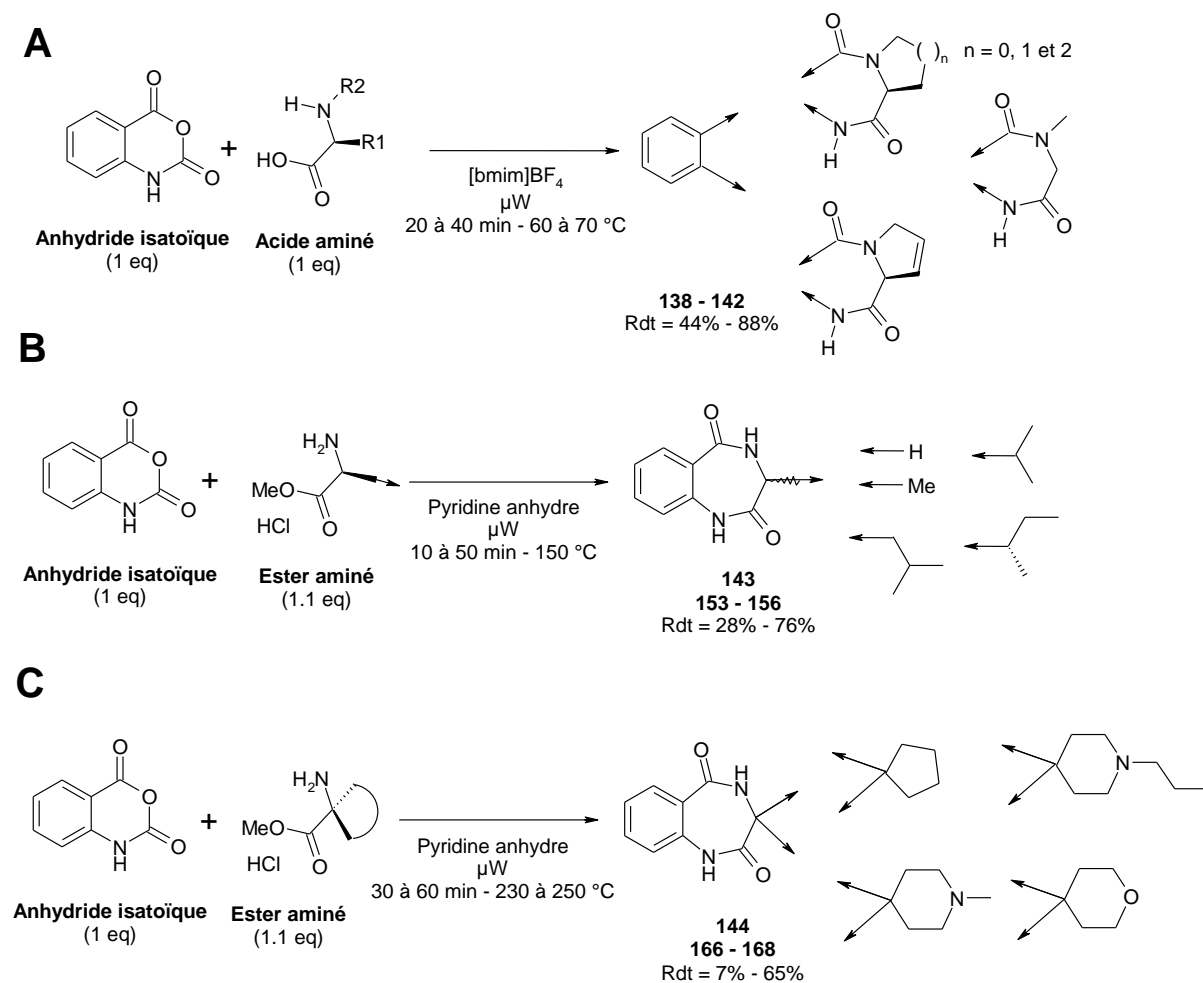


Figure 73 : Stratégies développées pour la synthèse du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

La première stratégie, notée A, a consisté en la réaction d'un α -aminoacide portant une amine secondaire sur l'anhydride isatoïque dans le liquide ionique [bmim]BF₄ utilisé comme solvant de réaction. Une irradiation micro-ondes de 20 à 40 min appliquée à 60 °C ou à 70 °C a permis d'obtenir 5 composés avec des rendements allant de 44% à 88%. Bien que cette stratégie ait été directe, elle n'a pas pu être étendue à d'autres α -aminoacides cycliques, c'est pourquoi une nouvelle voie de synthèse a été développée.

La seconde stratégie mise au point, notée B, a consisté à faire réagir un α -aminoester méthylique avec l'anhydride isatoïque dans la pyridine anhydre. Un chauffage par micro-ondes de 10 à 50 min à une température de 150 °C a conduit à l'obtention de 5 composés avec des rendements variant de 28% à 76%. Afin d'obtenir des produits avec un carbone spiranique en position 3 du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione, d'autres conditions ont été développées.

Cette troisième stratégie, notée C, a consisté à faire réagir l'anhydride isatoïque avec des α -aminoesters cycliques qui ont été préalablement synthétisés. Une irradiation micro-ondes de 30 à 60 min à une température de 230 °C puis 250 °C a permis d'obtenir 4 composés présentant un carbone spiranique en position 3 du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione. Les rendements associés à ces composés ont varié de 7% à 65%.

Selon ces trois stratégies de synthèse, 14 composés avec un noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione ont été isolés. Les propriétés physico-chimiques ainsi que les formes géométriques de ces composés ont été analysées.

II.1.3. Caractérisation de la chimiothèque focalisée autour du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione

II.1.3.1 Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des 14 composés obtenus sont représentées en Figure 74.

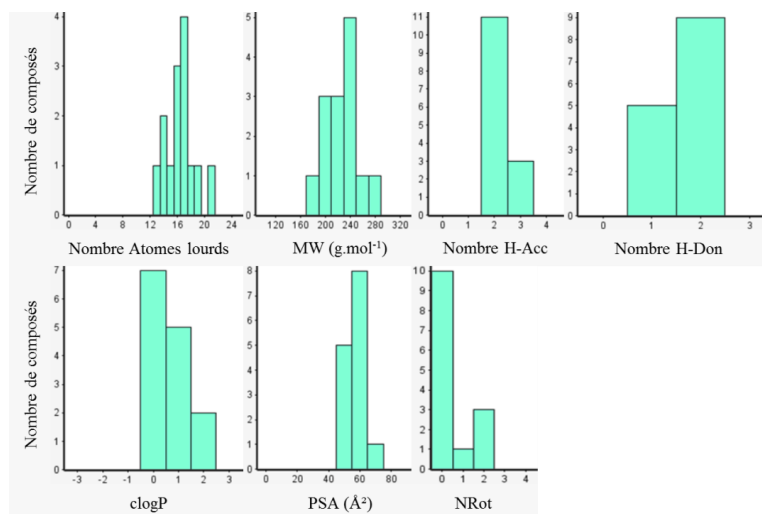


Figure 74 : Propriétés physico-chimiques des 14 composés synthétisés avec un noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione

Comme attendu, ces résultats montrent que la règle des 3 est respectée pour l'ensemble des 14 composés synthétisés présentant le noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione. Parmi ces 14 composés, 10

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

présentent un nombre de liaison à libre rotation égale à 0, ce qui atteste de la rigidité des structures, caractère important du fragment privilégié.

Les structures tridimensionnelles de ces 14 composés ont été analysées *in silico*. Le graphique illustrant les formes géométriques des 14 composés à partir de leurs trois principaux moments d'inertie est présenté en Figure 75.

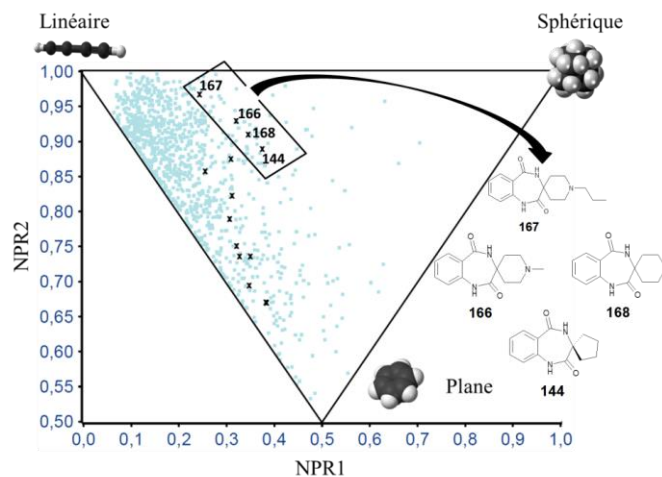


Figure 75 : Représentation 3D des 14 composés synthétisés présentant le noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione (croix noires) – les carrés bleus correspondent aux fragments de notre chimiothèque

Ce graphique révèle que les 14 composés de cette chimiothèque focalisée autour du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione (croix noires) adoptent des formes géométriques différentes. De plus, ils tendent à être moins linéaires et moins plans que la très grande majorité des fragments de notre chimiothèque (représentés par des carrés bleus). Comme attendu, les composés possédant un carbone spiranique présentent un caractère 3D plus marqué par rapport aux autres composés.

Comme nous venons de le voir, l'introduction d'un carbone spiranique en position 3 de l'hétérocycle 1,4-benzodiazépine-2,5-dione permet d'aboutir à des fragments (**144**, **166** à **168**) qui respectent le cahier des charges du fragment privilégié. Cependant, la voie de synthèse de ces composés n'est pas adaptée à la conception d'une chimiothèque large. En effet, bien que les temps de réaction aient été optimisés, les rendements ont été trop faibles. Nous nous sommes donc intéressés à une autre structure chimique pour concevoir une chimiothèque focalisée. Au cours de la synthèse des α -aminoacides cycliques à partir des cétones correspondantes (Figure 72), le noyau 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione a été obtenu. Ce noyau respecte lui aussi les critères du fragment privilégié c'est pourquoi nous avons décidé de développer une voie de synthèse pour accéder rapidement à des analogues comportant ce squelette.

II.2. Voies d'accès au noyau spirohydantoïne et caractérisation de la chimiothèque focalisée¹⁴⁴

II.2.1. Voies d'accès existantes du noyau spirohydantoïne

La première synthèse du noyau 1,3-imidazolidine-2,4-dione, aussi appelé hydantoïne, a été développée par Bergs en 1929. Cette synthèse consistait à traiter un dérivé carbonyle (aldéhyde ou cétone) avec le cyanure de potassium (KCN), le carbonate d'ammonium ((NH₄)₂CO₃) et le dioxyde de carbone sous pression et à 80 °C¹⁴⁵. En 1934, Bucherer a rapporté que l'utilisation de dioxyde de carbone sous pression n'était pas nécessaire et que la réaction pouvait s'effectuer dans l'eau ou le benzène à une température ne dépassant pas 70 °C¹⁴⁵. Dans la même année, cette procédure a été modifiée par Bucherer et Lieb qui ont remarqué qu'un mélange hydro-alcoolique à 50% était un bon solvant et permettait d'obtenir de bons rendements à la fois avec les aldéhydes et les cétones¹⁴⁶. Ces travaux ont constitué le point de départ de l'étude du noyau hydantoïne.

Le mécanisme réactionnel de formation du noyau hydantoïne à partir d'une cétone¹⁴⁷ est proposé en Figure 76.

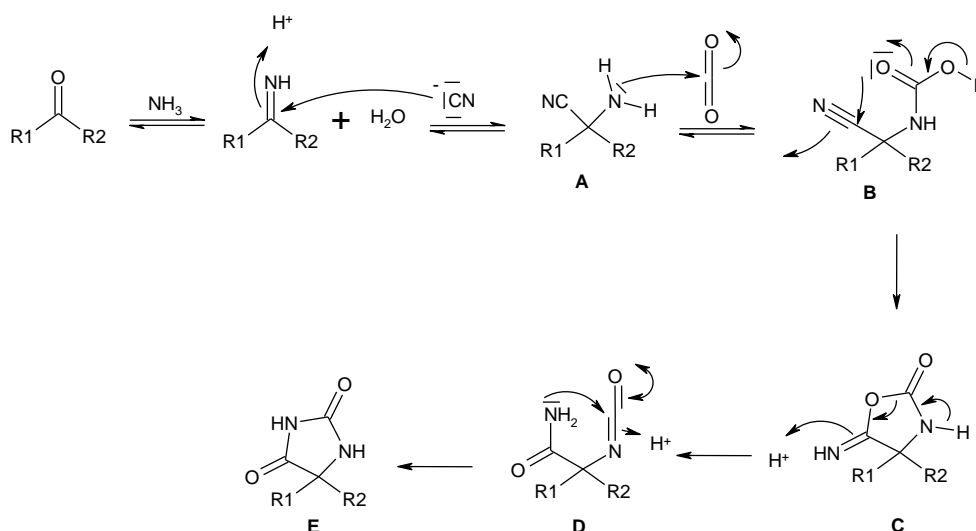


Figure 76 : Mécanisme réactionnel de formation du noyau hydantoïne à partir d'une cétone¹⁴⁷

La première étape consiste à obtenir l'imine par addition nucléophile de l'ammoniac sur la cétone. L'anion CN⁻ va ensuite s'additionner sur l'imine pour former l'intermédiaire noté **A**. L'intermédiaire **A** va ensuite réagir avec le dioxyde de carbone pour aboutir après prototropie au composé **B**. Par réaction intramoléculaire, le composé **B** va conduire au composé cyclique **C** qui se réarrange pour donner le produit **D** porteur d'une fonction isocyanate. L'attaque nucléophile de l'atome d'azote de l'amide sur le carbone électrophile de l'isocyanate permet d'aboutir, après une dernière prototropie, au noyau hydantoïne **E**.

Les premières synthèses du noyau spirohydantoïne ont été basées sur ces conditions réactionnelles. La cyclopentanone est traitée avec un excès de KCN et de (NH₄)₂CO₃ dans un mélange eau/éthanol¹⁴⁸ ou eau/méthanol¹⁴⁹ (1/1) à reflux pendant 6 h à 8 h (Figure 77). La synthèse réalisée dans un mélange eau/éthanol conduit à la spirohydantoïne désirée (1,3-diazaspiro[4.4]nonane-2,4-

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

dione) avec un rendement de 73% alors que dans un mélange eau/méthanol, le rendement a été de 85%.

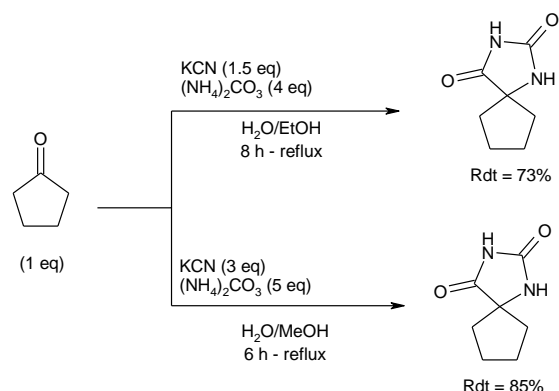


Figure 77 : Conditions de la littérature pour la synthèse du noyau spirohydantoïne par la réaction de Bucherer-Bergs^{148, 149}

Afin de réduire les temps de réaction, ces conditions réactionnelles ont été adaptées à la synthèse sous micro-ondes^{150, 151}. Deux études ont été publiées ; la première étude a consisté à appliquer une irradiation micro-ondes durant 3 à 13 min à 100 W dans un mélange eau/éthanol (1/1). Parmi les 10 exemples décrits dans ces travaux, seules deux hydantoïnes possèdent un carbone spiranique. Ces deux exemples ainsi que les conditions utilisées sont présentées en Figure 78.

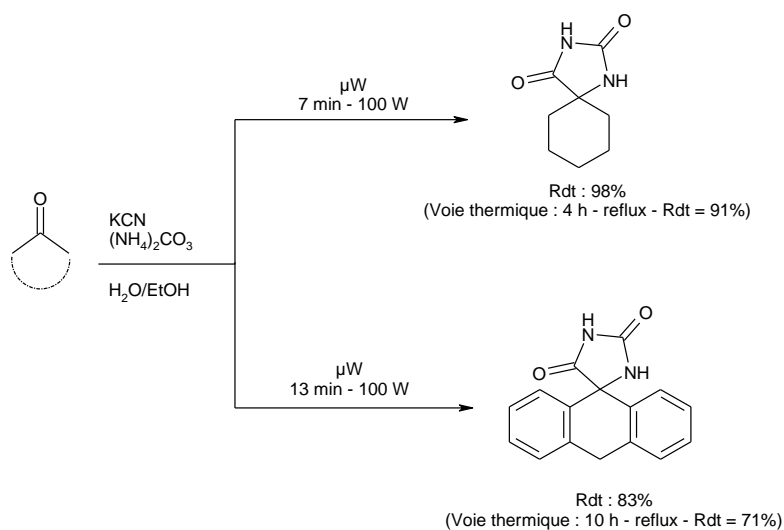


Figure 78 : Conditions d'irradiation micro-ondes appliquées pour la synthèse de deux composés possédant un noyau spirohydantoïne dans un mélange eau/éthanol (1/1)¹⁵⁰

Dans les conditions utilisées, l'irradiation micro-ondes de la cyclohexanone à 100 W pendant 7 min a permis d'aboutir au 1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione désiré avec un rendement de 98% alors que par voie thermique il a fallu 4h de reflux pour obtenir 91% de produit. De la même manière, l'irradiation de l'anthrone à 100 W pendant 13 min a conduit au produit attendu avec un rendement de 83% alors que 10 h de chauffage thermique ont été nécessaires pour isoler le même produit avec un rendement de 71%.

Une seconde étude¹⁵¹ a consisté à évaluer l'influence du temps et de la température de l'irradiation micro-ondes sur la réaction test présentée en Figure 79.

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

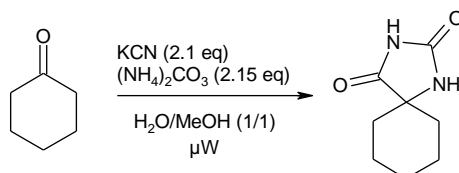
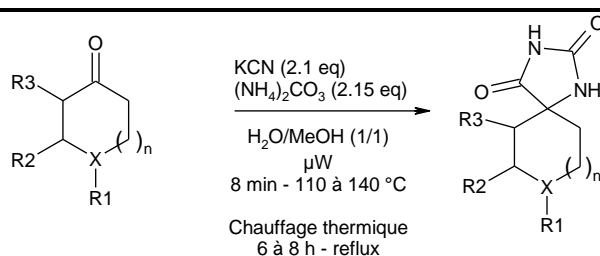


Figure 79 : Réaction test envisagée pour évaluer l'influence des paramètres temps et température¹⁵¹

Cette réaction test a été effectuée dans un mélange eau/méthanol (1/1). Différents temps (de 2 à 10 min) et températures (de 100 à 170 °C) ont été appliqués et les meilleurs rendements en spirohydantoin ont été obtenus au bout de 8 min d'irradiation à des températures de 110 °C à 130 °C.

Les auteurs ont ensuite appliqué ces conditions d'irradiation (8 min – 120 à 140 °C) à plusieurs cétones cycliques et ils ont comparé les rendements obtenus par chauffage thermique (6 à 8 h – reflux) et par irradiation micro-ondes. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 30.



N°	X	n	R1	R2	R3	Température μW (°C)	Rendement μW (%)	Rendement thermique (%)
1	C	0	H	H	H	140	80	20
2	C	1	H	H	H	120	94	59
3	C	1	H	H	Me	120	77	16
4	C	1	H	Me	H	140	97	25
5	C	2	H	H	H	140	50	87
6	C	3	H	H	H	140	85	100
7	N	1	H	H	H	120	46	57
8	N	1	Me	H	H	140	35	26
9	N	1	CH ₂ C ₆ H ₅	H	H	130	99	61

Tableau 30 : Structures isolées et rendements obtenus par irradiation micro-ondes et par chauffage thermique¹⁵¹

En série cycloalcanone (N°1 à 6), une irradiation de 8 min à des températures comprises entre 120 et 140 °C a permis d'obtenir les différents composés désirés avec des rendements allant de 50% à 97%. Hormis pour la cycloheptanone (N°5) et la cyclooctanone (N°6) où les rendements obtenus par irradiation micro-ondes ont été moins élevés que ceux obtenus par chauffage thermique, dans les autres cas (N°1 à 4) l'irradiation micro-ondes a permis d'accroître le rendement tout en diminuant significativement les temps de réaction (de 6 h par chauffage thermique à 8min par irradiation micro-ondes).

Dans la série pipéridone (N°7 à 9), l'irradiation de 8 min à des températures comprises entre 120 et 140 °C a conduit aux produits désirés avec des rendements variant de 35% à 99%. Cette irradiation micro-ondes a permis d'améliorer le rendement pour la *N*-méthylpipéridone (N°8) et pour la *N*-benzylpipéridone (N°9) alors que pour la pipéridone (N°7) le chauffage thermique a conduit à un meilleur rendement.

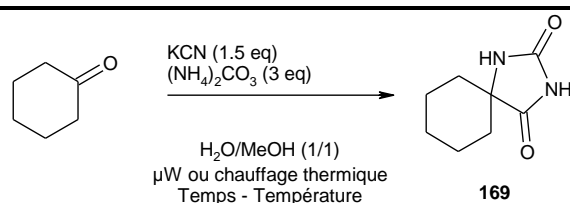
Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Nous nous sommes donc appuyés sur ces travaux pour envisager la synthèse de nouvelles spirohydantoïnes sous irradiation micro-ondes.

II.2.2. Synthèses développées pour conduire au noyau 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione

II.2.2.1. Influence de l'irradiation micro-ondes par rapport au chauffage thermique pour la synthèse du noyau 5-spiro-1,3-imidazolidine-2,4-dione

L'intérêt de l'irradiation micro-ondes a été examiné en faisant réagir la cyclohexanone avec un excès de KCN et de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ dans un mélange eau/méthanol (1/1) soit par irradiation micro-ondes soit par chauffage thermique. Pour ces deux expériences, le rendement a été déterminé et les résultats sont présentés dans le Tableau 31 où figurent également les rendements décrits dans la littérature.



Condition	Type de chauffage	Temps/Température	Rendement (%)
1 (littérature ¹⁵¹)	Thermique	6 h - reflux	59
2	Thermique	4 h - 90 °C	63
3	μW	10 min - 90 °C	98
4 (littérature ¹⁵¹)	μW	8 min - 120 °C	94

Tableau 31 : Rendements obtenus pour la synthèse du produit **169** selon une irradiation micro-ondes ou un chauffage thermique

Par chauffage thermique, le produit **169** a pu être obtenu après 4 h de réaction à 90 °C avec un rendement de 63% (condition 2). Ce résultat est similaire à celui décrit dans la littérature (condition 1)¹⁵¹. A partir de la même procédure réactionnelle, une irradiation micro-ondes de 10 min à 90 °C a permis d'aboutir au produit **169** avec un meilleur rendement de 98% (condition 3). Ce rendement est similaire à celui obtenu dans la littérature après une irradiation de 8 min à 120 °C. Bien que notre procédure soit plus longue de 2 min, la température appliquée est moins importante ce qui pourrait éviter de potentielles dégradations. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence du solvant dans ces conditions d'irradiation micro-ondes.

II.2.2.2. Influence du solvant dans des conditions d'irradiation micro-ondes

L'influence du solvant a été évaluée en utilisant le même protocole que celui décrit précédemment (irradiation de 10 min à 90 °C dans un excès de KCN et de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$). Un mélange eau/éthanol (1/1) ou eau/méthanol (1/1) a été utilisé pour obtenir les composés **169** et **170** à partir de la

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

cyclohexanone et de la pipéridone. Les rendements obtenus pour ces deux composés sont présentés dans le Tableau 32.

N°	X	Solvants (1/1)	Rendement (%)
1	CH ₂	eau/méthanol	98
2	CH ₂	eau/éthanol	83
3	NH	eau/méthanol	76
4	NH	eau/éthanol	70

Tableau 32 : Rendements obtenus pour les produits 169 et 170 selon la procédure d'irradiation micro-ondes dans un mélange eau/méthanol (1/1) ou eau/éthanol (1/1)

L'irradiation de 10 min à 90 °C de la cyclohexanone dans un mélange eau/éthanol (1/1) a conduit au produit **169** avec un rendement de 83% (N°2). Ce rendement est légèrement moins bon que celui obtenu (98%) en appliquant la même procédure réactionnelle dans un mélange eau/méthanol (1/1) (N°1 vs 2). Ce constat est confirmé avec les résultats obtenus suite à l'irradiation de la pipéridone conduisant au produit **170**. En effet, dans le solvant eau/méthanol (1/1), le rendement obtenu a été de 76% alors qu'il a été de 70% dans l'eau/éthanol (1/1) (N°3 vs 4). Enfin, le rendement obtenu pour la synthèse du composé **170** selon notre approche (76% - N°3) est meilleur que celui décrit dans la littérature qui était de 46% (Tableau 30 - N°7).

Ces conditions d'irradiation de 10 min à 90 °C, ont donc été sélectionnées et appliquées à différentes cétones cycliques substituées ou non¹⁴⁴.

II.2.2.3. Spirohydantoïnes synthétisées par irradiation micro-ondes

Les différentes structures ainsi que les rendements associés obtenus après purification sont présentés dans le Tableau 33.

Cétone	Composé	Structure	Rdt (%)	Cétone	Composé	Structure	Rdt (%)
	171		60		175		100
	172		91		158		75
	173		50		176		75
	169		98		177		80
	174		71		178		100
	159		95		179		58
	170		76		180		55
	157		98		181		97

Tableau 33 : Structures obtenues et rendements associés pour la synthèse de spirohydantoïnes 157 à 159 et 169 à 181

Selon notre procédure réactionnelle, 16 produits ont été isolés avec des rendements allant de 58% à 100%. Des groupements protecteurs tels que benzyle (**173**), acétyle (**177**) et Boc (**178**, **180** et **181**) ont été tolérés dans ces conditions réactionnelles. Différentes cétones hétérocycliques ont pu être engagées dans la réaction telles qu'une 4-oxanone (**159**), une 4-pipéridone avec un atome d'azote libre (**170**) ou substituée par diverses chaînes aliphatiques (**157**, **158**, **175** et **176**), une 3-pipéridone substituée par un groupement éthyle (**179**) et une azépine protégée par un groupement Boc (**181**). L'utilisation d'un atome d'azote tertiaire dans la cétone cyclique est tolérée (**157**). A substituants identiques, la série 4-pipéridone a conduit à de meilleurs rendements que la série 3-pipéridone (**175** – 100% vs **179** – 58% et **178** – 100% vs **180** – 55%). Les composés **173**, **179**, **180** et **181** ont été obtenus en mélange racémique.

Ces conditions d'irradiation micro-ondes ont également été appliquées à des cétones cycliques non symétriques ce qui a conduit à l'obtention de stéréoisomères. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 34.

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Cétone	Composé	Structure	Ratio (%)	Rdt (%)
	182	<p>trans</p>	28	22
	182'	<p>cis</p>	72	49
	183	<p>cis</p>	74	50
	183'	<p>trans</p>	26	16
	184	<p>trans</p>	25	10
	184'	<p>cis</p>	75	61
	185		> 98	93
	186		> 98	76
	187		> 98	3
	188		100	40
	189		100	60

Tableau 34 : Structures obtenues et rendements associés pour la synthèse de spirohydantoïnes non symétriques **182** à **189**

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Les ratios cis/trans obtenus avec les 11 produits synthétisés (**182** à **189**) ont été déterminés par analyse LC/MS et les rendements des produits isolés après purification ont variés de 3% à 93%. Le couple de stéréoisomères **182** et **182'** a été obtenu en deux étapes. Une première étape au cours de laquelle le noyau spirohydantoïne a été isolé à partir de l'acide 3-oxo-cyclobutanoïque. Comme les stéréoisomères sous forme d'acide carboxylique n'ont pas pu être séparés, il a été décidé de les estérifier par action de SOCl_2 et d'éthanol pour aboutir aux composés **182** et **182'** qui ont été séparés par HPLC préparative. Cette stratégie est présentée en Figure 80.

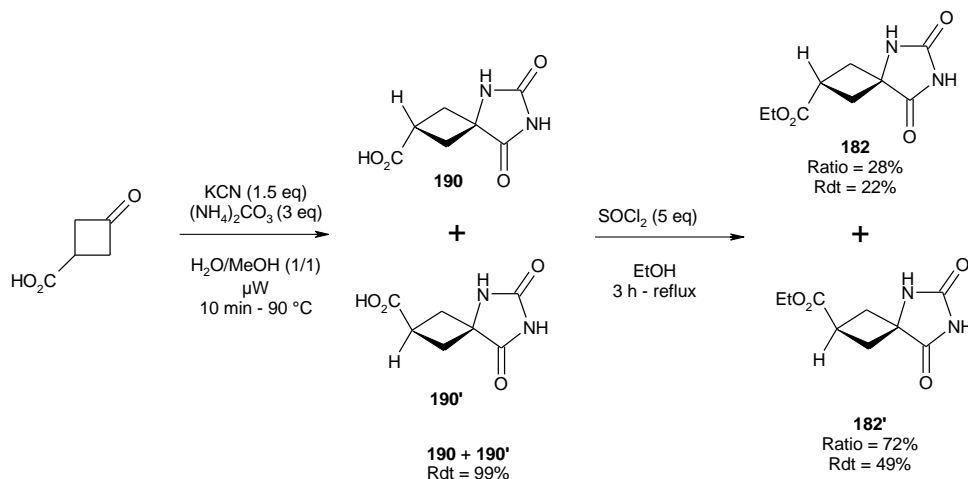


Figure 80 : Stratégie développée pour la synthèse des composés **182** et **182'**

Bien que les stéréoisomères **190** et **190'** n'aient pas pu être séparés, il est intéressant de constater qu'une fonction acide carboxylique a été tolérée dans le processus de synthèse du noyau hydantoïne par irradiation micro-ondes.

Les diastéréoisomères **183** et **183'** ont été séparés par HPLC préparative et chaque diastéréoisomère est obtenu en mélange racémique. Les stéréoisomères **184** et **184'** ont été séparés par recristallisation dans le méthanol. Les structures des composés **182** à **184** ont été attribuées par diffraction aux rayons X. Un stéréoisomère de chaque couple a été recristallisé dans le méthanol ou l'éthanol et les cristaux obtenus ont été diffractés par notre collaborateur, le Dr. Pascal Roussel. Les structures RX sont présentées en Figure 81.

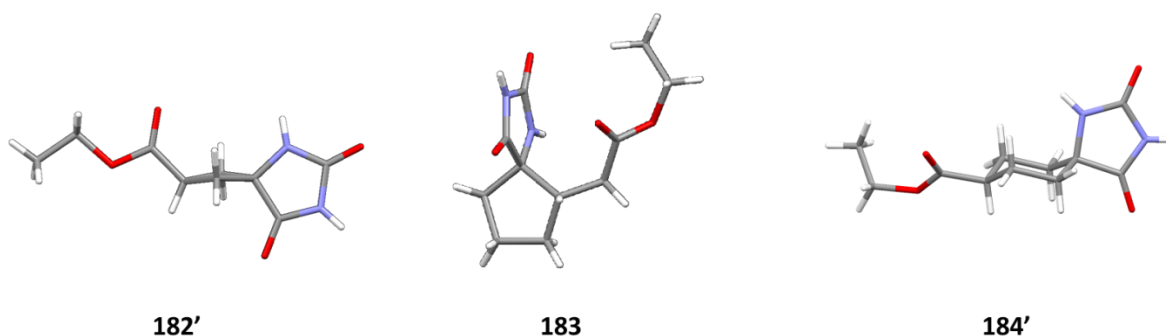


Figure 81 : Structures RX des composés **182'**, **183** et **184'**

Ces trois structures RX montrent une diversité de formes géométriques puisque les composés **182** et **184'** sont linéaires alors que le composé **183** a un caractère 3D plus marqué.

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Il a été décidé ensuite d'examiner si des conditions de chauffage thermique pouvaient permettre d'améliorer la diastéréosélectivité observée précédemment pour les composés **183**, **183'**, **184** et **184'**. Les résultats sont présentés dans le Tableau 35.

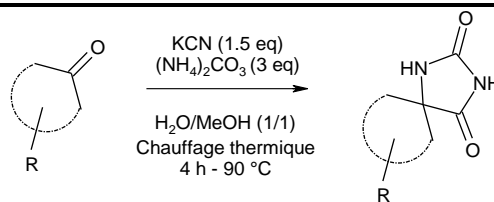
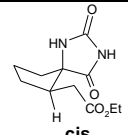
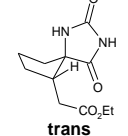
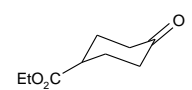
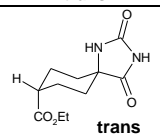
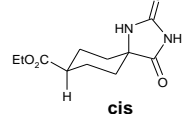
Cétone	Temps (h)	Composé	Structure	Ratio
	4 h	183	 cis	64
		183'	 trans	36
	4 h	184	 trans	0
		184'	 cis	100

Tableau 35 : Ratio de stéréoisomères obtenus pour la synthèse des composés **183** et **184** par chauffage thermique

Par chauffage thermique, le ratio des stéréoisomères **183** et **183'** est proche de celui obtenu par voie micro-onde (64/36 – chauffage thermique vs 74/26 – irradiation micro-ondes). En revanche, la synthèse à partir de l'éthyl-4-oxocyclohexanecarboxylate est diastéréosélective puisque seul le stéréoisomère **184'** a été observé. Ce premier constat permet de mettre en avant l'intérêt de l'approche par irradiation micro-ondes puisque celle-ci aboutit à de nouveaux composés inaccessibles dans des conditions de chauffage thermique. De plus, lors de la réaction sous chauffage thermique, une conversion de seulement 70% en produit désiré **184** a été obtenue. L'analyse LC/MS a montré que les 30% restants correspondaient au produit attendu sous forme d'ester méthylique issue d'une transestérification. Ce phénomène de transestérification peut s'expliquer par les temps plus longs à appliquer par chauffage thermique pour avoir une conversion totale de la cétone de départ. Ce second constat permet de renforcer l'intérêt d'une irradiation micro-ondes pour éviter ce problème de transestérification.

Les substituants, présents sur les trois cétones de départ qui ont conduit aux composés **182** à **184**, sont assez éloignés du centre réactif carbonyle. C'est sans doute pour cette raison que des stéréoisomères ont pu être observés et isolés. En revanche, les synthèses des composés **185** à **187** ont été diastéréosélectives à hauteur de 98% tandis qu'une totale diastéréosélectivité a été observée pour la synthèse des produits **188** et **189**. Ce résultat peut s'expliquer par l'attaque de l'ion cyanure qui doit probablement s'effectuer sur la face la moins encombrée de l'imine (Figure 82).

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

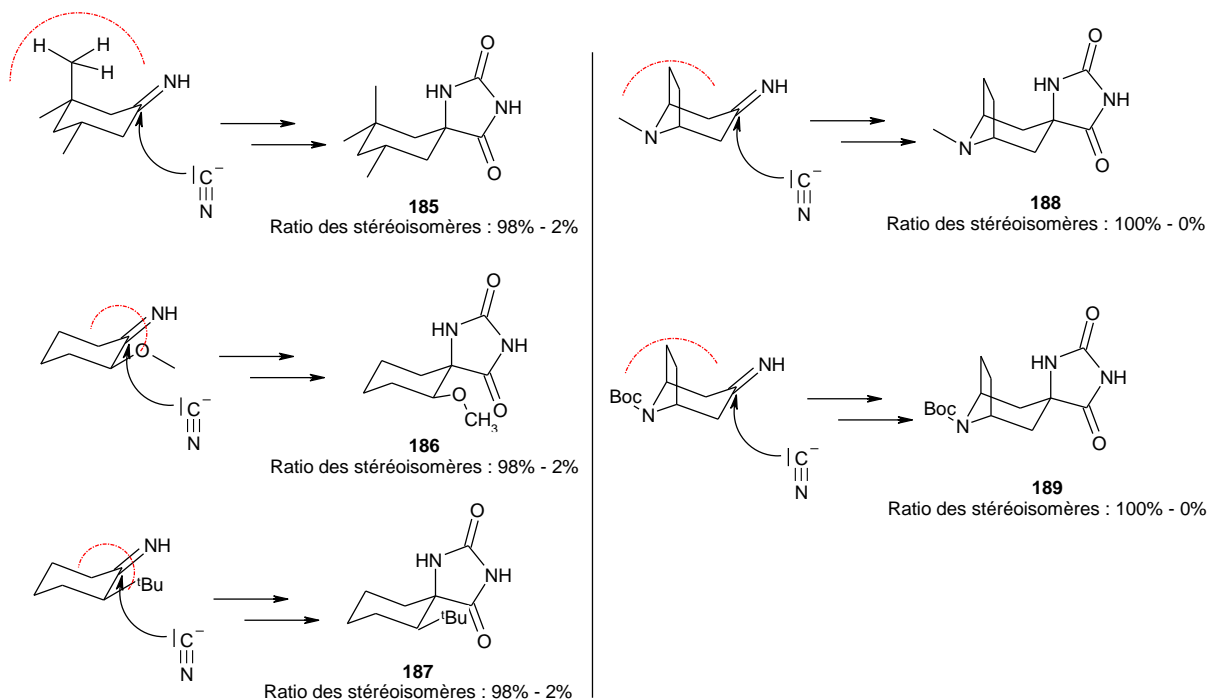


Figure 82 : Hypothèses mécanistiques qui pourrait justifier la diastéréosélectivité observée lors de la synthèse des composés **185** à **189**

Afin d'accroître la diversité structurale de cette chimiothèque focalisée autour du noyau spirohydantoïne, ces conditions réactionnelles ont été appliquées à la 3-méthyl-2-cyclopenténone (Figure 83).

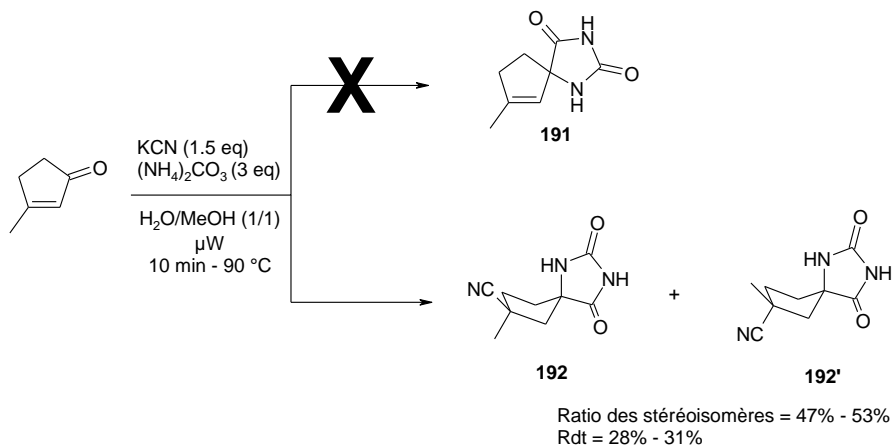


Figure 83 : Structures des diastéréoisomères formés et isolés lors de la réaction de la 3-méthyl-2-cyclopenténone

Lors de la réaction, le produit attendu **191** n'a pas été observé. En revanche, deux produits avec des masses molaires similaires mais des temps de rétention différents ont été observés par LC/MS, suggérant la possibilité d'avoir formé des diastéréoisomères. Ces deux diastéréoisomères ont été séparés par HPLC préparative et caractérisés par RMN. Ces analyses montrent que les composés obtenus sont des produits issus de l'addition 1,4 de l'ion cyanure sur la 3-méthyl-2-cyclopenténone qui se comporte comme un accepteur de Michael. L'attribution des structures des composés **192** et **192'** n'a pas été réalisée.

Cette voie de synthèse développée pour l'obtention du noyau spirohydantoïne est adaptée à la conception d'une chimiothèque de fragments. En effet, elle est rapide puisqu'une irradiation de 10 min

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

à 90 °C permet d'obtenir le produit attendu avec une conversion totale. De plus, les 29 composés, présentés dans le Tableau 33 et le Tableau 34, ont été obtenus avec des rendements modérés à très bons. Enfin, différents groupements ont été tolérés suivant cette approche synthétique tels qu'un groupement benzyle (**173**), un groupement acétyle (**177**), un groupement Boc (**178**, **180**, **181** et **189**), une fonction amine (**170**), une fonction acide carboxylique (**182**), une fonction ester éthylique (**183** et **184**) et une fonction éther (**186**). Les formes géométriques, la solubilité aqueuse et les propriétés physico-chimiques des 29 composés obtenus ont ensuite été analysés.

II.2.3. Caractérisation de la chimiothèque focalisée autour du noyau spirohydantoïne

II.2.3.1. Formes géométriques des 29 composés synthétisés

Les structures 3D des 29 produits synthétisés ont été déterminées et le graphique illustrant leurs formes géométriques à partir des trois principaux moments d'inertie est présenté Figure 84.

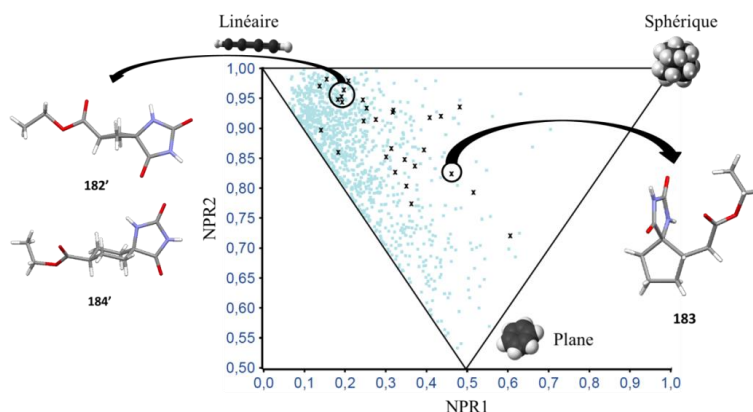


Figure 84 : Représentation 3D des 29 composés synthétisés autour du noyau spirohydantoïne – croix noire : 29 composés synthétisés – carré bleu: fragments de notre chimiothèque – Positionnement des trois produits dont on connaît la structure RX (**182'**, **183** et **184'**)

Sur la base des formes géométriques, cette chimiothèque focalisée autour du noyau spirohydantoïne est diversifiée puisque les 29 composés synthétisés sont globalement bien répartis dans l'espace 3D. Par exemple et comme on a pu le constater avec les structures cristallographiques, les composés **182'** et **184'** adoptent une forme linéaire tandis que le composé **183** tend à être plus sphérique. De plus ce composé **183** occupe un espace qui était jusqu'alors sous-peuplé par les 1040 fragments de notre chimiothèque. En fonction de la position et de la nature du substituant présent sur la cétone cyclique de départ, l'introduction d'un carbone spiranique permet d'aboutir à des composés ayant des formes géométriques diverses et un caractère 3D plus marqué.

II.2.3.2. Solubilité mesurée des 29 composés synthétisés

Le noyau hydantoïne est connu pour avoir une faible solubilité aqueuse¹⁵². La solubilité en milieu aqueux des 29 composés synthétisés a donc été mesurée afin d'évaluer l'impact de

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

l'introduction d'un carbone spiranique sur ce paramètre. Les résultats sont représentés dans le Tableau 36.

Composé	Structure	Solubilité (mM)	Composé	Structure	Solubilité (mM)
171		0.7	181		>1
172		0.8	182		0.8
173		>1	182'		>1
169		0.8	183		0.8
174		0.9	183'		>1
159		>1	184		>1
170		0.4	184'		>1
157		>1	185		0.1
175		>1	186		0.8
158		>1	187		0.9
176		>1	188		>1
177		>1	189		0.9
178		>1	192		
179		>1	192'		
180		>1			

Tableau 36 : Solubilité aqueuse mesurée des 29 composés synthétisés possédant le noyau spirohydantoin

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

24 des composés synthétisés ont une solubilité aqueuse mesurée supérieure à 0.8 mM y compris les composés les plus hydrophobes tels que le composé **169**, **174**, **187** et **189**. L'introduction d'un carbone spiranique permet donc d'accroître la solubilité aqueuse. Seuls 2 produits ont présenté une solubilité moins importante : le composé **170** et le composé **185**.

II.2.3.3. Propriétés physico-chimiques des 29 composés synthétisés

Les propriétés physico-chimiques des 29 composés synthétisés sont représentées en Figure 85.

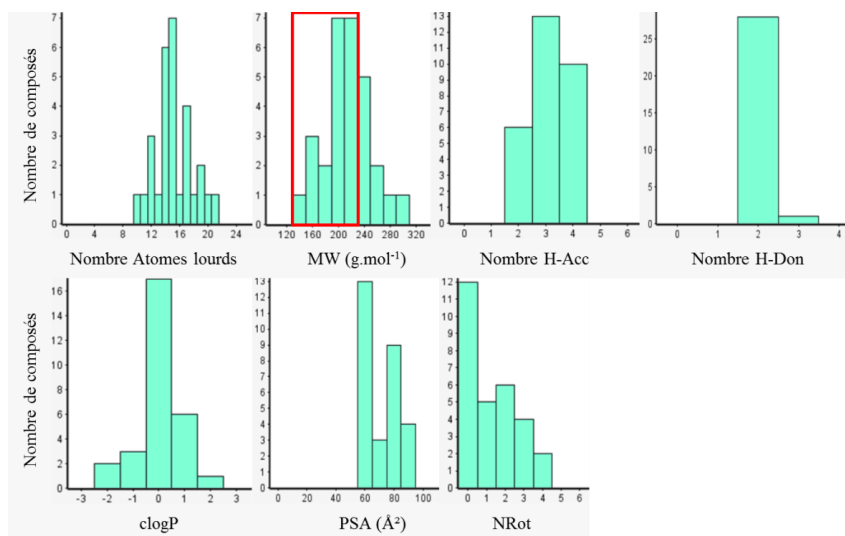


Figure 85 : Propriétés physico-chimiques des 29 spirohydantoïnes synthétisées

Comme attendu, ces résultats montrent que la règle des 3 est respectée pour l'ensemble des 29 spirohydantoïnes synthétisées. Une distribution acceptable est observée pour chaque paramètre physico-chimique même si la quasi-totalité des produits présentent 2 donneurs de liaisons hydrogène. La notion de rigidité est respectée puisque plus de la moitié des composés ont un nombre de liaison à libre rotation inférieur ou égal à 1.

Pour conclure, les 29 composés possédant le noyau spirohydantoïne respectent le cahier des charges du fragment privilégié avec par exemple une variété de forme géométrique ainsi qu'une solubilité aqueuse mesurée supérieure à 0.1 mM. Par ailleurs, parmi les 29 produits synthétisés, 20 ont une masse molaire inférieure à 220 g.mol⁻¹ (Figure 85). Ceci suggère que la fonctionnalisation de ces 20 produits reste possible et permettrait d'aboutir à de nouveaux fragments. Nous avons donc optimisé une stratégie de synthèse pour substituer de façon sélective les deux atomes d'azote de l'hétérocycle hydantoïne.

II.3. N-alkylation sélective du noyau spirohydantoïne

II.3.1. Stratégie de synthèse envisagée pour la N-alkylation sélective de l'hétérocycle hydantoïne

L'atome d'azote en position 3 de l'hétérocycle hydantoïne (noté N3) est plus réactif que l'atome d'azote en position 1 (noté N1). Ceci est justifié par le fait que N3 est en alpha de deux groupements électroattracteurs. Ainsi, l'atome d'hydrogène porté par N3 est plus acide que celui porté par N1.

N3 étant plus sensible à une alkylation que N1, la stratégie de synthèse envisagée pour substituer sélectivement les deux atomes d'azote du noyau spirohydantoïne est présentée en Figure 86.

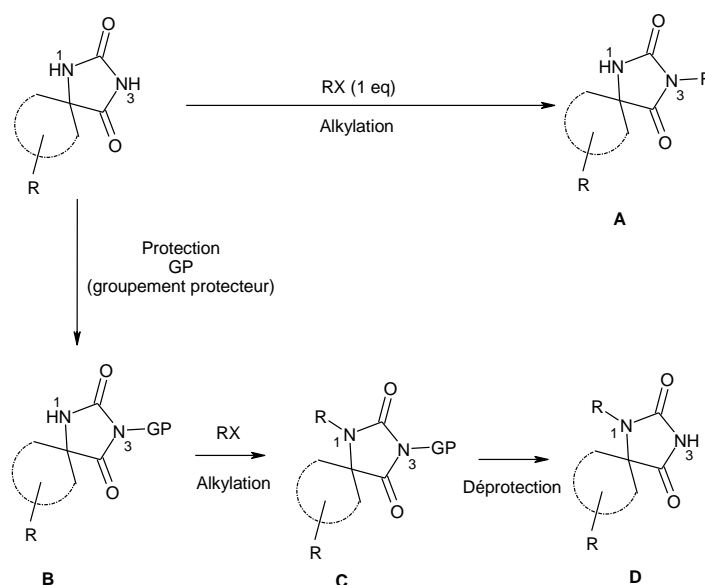


Figure 86 : Voie de synthèse envisagée pour substituer sélectivement chaque atome d'azote du noyau spirohydantoïne

La voie de synthèse envisagée pour alkyler de façon sélective les deux atomes d'azote du noyau spirohydantoïne consiste à substituer la position la plus réactive N3 avec un dérivé halogéné (RX) afin d'obtenir le composé A. Cette même position N3 peut être protégée en conditions basiques pour conduire au composé B. Ainsi, la position N1 du composé B peut ensuite être substituée par le même dérivé halogéné RX afin d'aboutir au composé C qui une fois déprotégé conduit au composé D, isomère du composé A.

Cette voie de synthèse directe a été développée en utilisant le 8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione **159** comme produit de départ et le bromure de propargyle. Plusieurs raisons justifient le choix du bromure de propargyle comme dérivé halogéné : d'une part, le groupement propargyle est un groupement de faible masse molaire ($MW = 54 \text{ g.mol}^{-1}$) ce qui permet d'aboutir à des composés fonctionnalisés A et B qui conservent les propriétés du fragment ; d'autre part ce n'est pas un groupement inerte chimiquement puisqu'il peut être utilisé pour réaliser des couplages de type Sonogashira ou des réactions de click-chemistry. Ainsi, un tel groupement pourra s'avérer utile lors de la phase d'optimisation du fragment hit en un composé lead.

II.3.2. Synthèses des spirohydantoïnes alkylées

II.3.2.1. Synthèse du composé 8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione substitué sur la position N3 par le groupement propargyle

Plusieurs conditions réactionnelles ont été testées pour substituer sélectivement la position N3 du 8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione **159** par le groupement propargyle sous l'action d'une base dans le DMF anhydre. Une irradiation micro-ondes de 10 min à 40 °C en utilisant du K_2CO_3 ou de la TEA a été essayée mais n'a pas permis d'obtenir une conversion totale. L'agitation à température ambiante pendant 2 h en utilisant 2 équivalents de K_2CO_3 a permis d'aboutir à une conversion complète et le produit attendu **193** a été isolé avec un rendement de 65% (Figure 87).

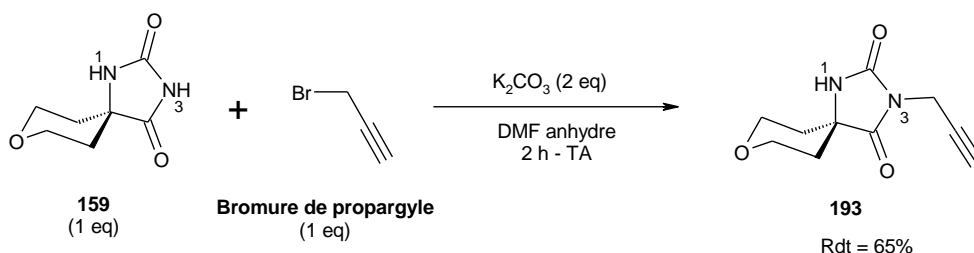


Figure 87 : Conditions réactionnelles appliquées et rendement obtenu pour la synthèse du composé **193**

La structure du composé **193** a été confirmée par des expériences NOESY 1D (Figure 88).

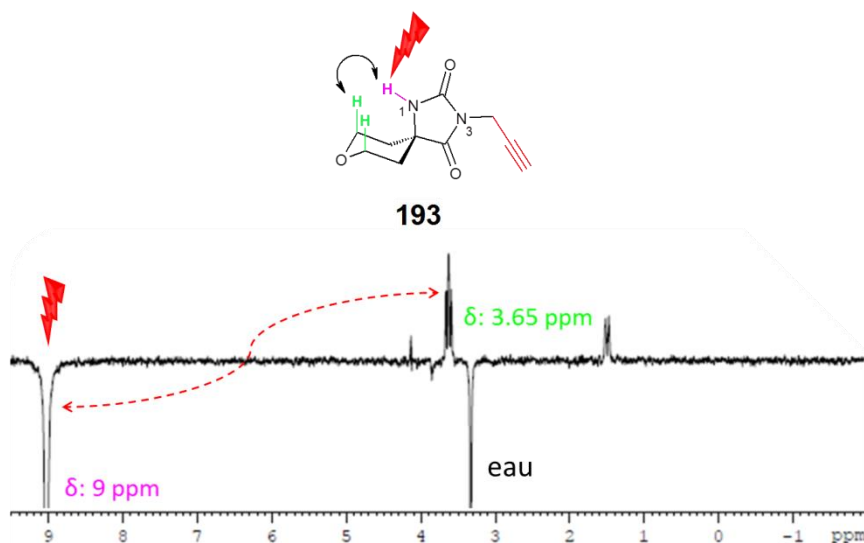


Figure 88 : Expérience NOESY 1D effectuée pour confirmer la structure du composé **193**

En utilisant les différentes constantes de couplage ainsi que les déplacements chimiques, les signaux caractéristiques du noyau oxane ont pu être attribués. L'irradiation sélective du proton porté par N1 (δ : 9 ppm) a permis d'observer un couplage spatial avec les protons axiaux en alpha de l'oxygène (δ : 3.65 ppm) confirmant ainsi la structure du composé **193**.

II.3.2.2. Synthèse du composé 8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione substitué sur la position N1 par le groupement propargyle

Le 8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione substitué sur la position N1 par le groupement propargyle a été obtenu en trois étapes : (i) protection de la position N3, (ii) substitution de la position libre N1 par le groupement propargyle et (iii) déprotection de la position N3.

(i) protection de la position N3 : la position N3 a été protégée par le groupement Boc en utilisant le $(\text{Boc})_2\text{O}$ comme agent de protection, la TEA et la DMAP comme base et le MeCN anhydre comme solvant. Une irradiation micro-ondes de 10 min à 40 °C a conduit au composé attendu **194** qui a été isolé après purification avec un rendement de 27%. Ce faible rendement est dû à la formation du produit protégé sur la position N1 ainsi que du produit protégé sur les deux positions N1 et N3. Ces deux produits caractérisés ont respectivement été isolés avec des rendements de 15% et 5%. Du fait de la formation de ce type de produit secondaire, il a été décidé d'appliquer des conditions plus douces. Une agitation à température ambiante de 10 min a ainsi permis d'isoler le produit désiré **194** avec un rendement de 83% (Figure 89).

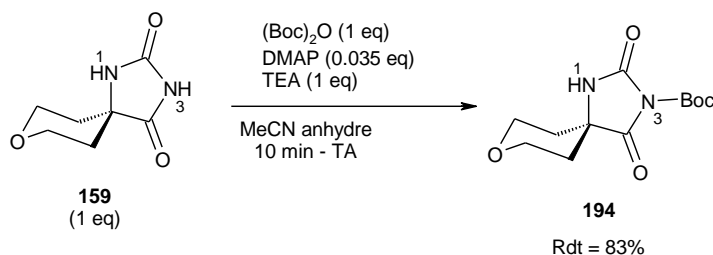


Figure 89 : Conditions réactionnelles appliquées et rendements obtenus pour la synthèse du composé **194**

(ii) substitution de la position N1 par le groupement propargyle : les conditions appliquées pour cette étape de substitution de la position N1 du composé **194** par le groupement propargyle ont été inspirées de celles utilisés pour la synthèse du composé **193**. La position N1 étant moins réactive que la position N3, 3 eq. de K_2CO_3 et 2 eq. de bromure de propargyle ont été nécessaires pour aboutir après 3h30 d'agitation à température ambiante au composé **195**. Celui-ci a été isolé avec un rendement de 88% (Figure 90).

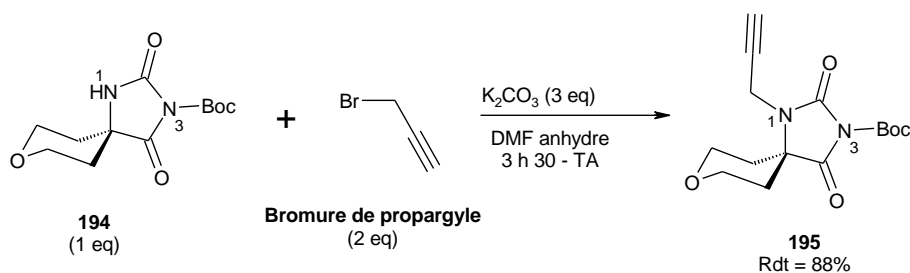


Figure 90 : Conditions réactionnelles appliquées et rendement obtenu pour la synthèse du composé **195**

(iii) déprotection de la position N3 : cette étape de déprotection a été effectuée par action du méthanolate de sodium dans le méthanol en utilisant un chauffage thermique à 60 °C ou sous irradiation micro-ondes à 40 et 60 °C. Les différentes conditions réactionnelles utilisées ont conduit au produit **196** désiré avec des proportions en LC/MS variant de 72 à 88%. Les conditions retenues (irradiation micro-ondes de 10 min à 60 °C en utilisant 4 équivalents de méthanolate de sodium) ont permis d'isoler le composé **196** avec un rendement de 86% (Figure 91).

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

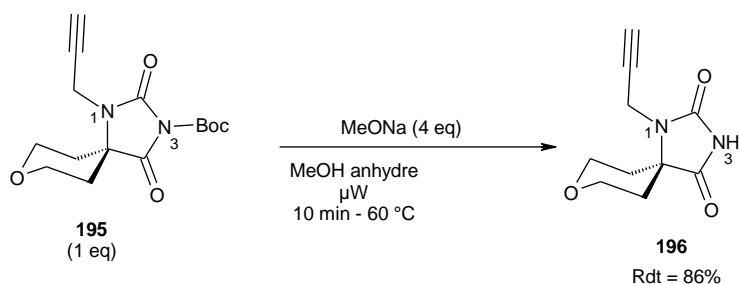


Figure 91. Conditions réactionnelles appliquées et rendement obtenu pour la synthèse du composé **196**

De la même manière que pour le composé **193**, la structure du composé **196** a été confirmée par des expériences NOESY 1D. L'irradiation sélective des protons portés par le groupement propargyle (δ : 4.1 ppm) a permis d'observer un couplage spatial avec les protons axiaux en alpha du carbone spiranique (δ : 2.1 ppm) confirmant ainsi la structure du composé **196** (Figure 92).

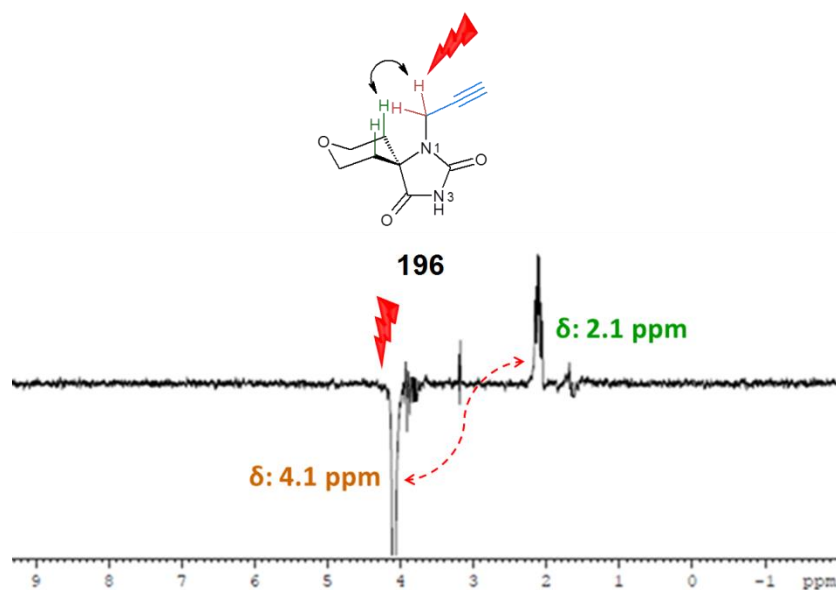


Figure 92 : Expérience NOESY 1D effectuée pour confirmer la structure du composé **196**

Le caractère tridimensionnel des 29 fragments synthétisés avec le noyau spirohydantoin associé à la possibilité de substituer sélectivement les deux atomes d'azote N1 et N3 ouvrent la voie à l'obtention de composés avec des formes géométriques différentes capables d'explorer l'espace chimique plus efficacement.

II.3.3. Exploration de l'espace chimique suite à une substitution sélective des atomes d'azote du noyau spirohydantoin

Afin d'utiliser les composés présentant le noyau spirohydantoin substitué en position N1 ou N3 comme des instruments capables d'explorer l'espace chimique, deux chimiothèques virtuelles de composés ont été générées. Ces composés virtuels correspondent aux 29 spirohydantoinés préalablement synthétisés et qui ont été substitués par 22 agents alkylants de masse molaire compris entre 15 g.mol⁻¹ et 135 g.mol⁻¹, soit en position N1, aboutissant à une première chimiothèque (notée

lib-N1), soit en position N3 conduisant à une seconde chimiothèque (notée lib-N3). Les structures des 22 agents alkylants sont présentées en Figure 93.

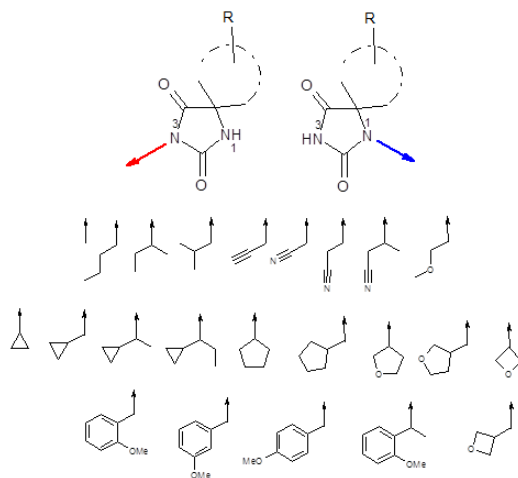


Figure 93 : Structures des 22 agents alkylants utilisés pour substituer sélectivement la position N3 (en rouge) ou la position N1 (en bleu) du noyau spirohydantoïne des 29 molécules synthétisées

Les structures 3D des composés de lib-N1 et lib-N3 ont été analysées et sont représentées en Figure 94.

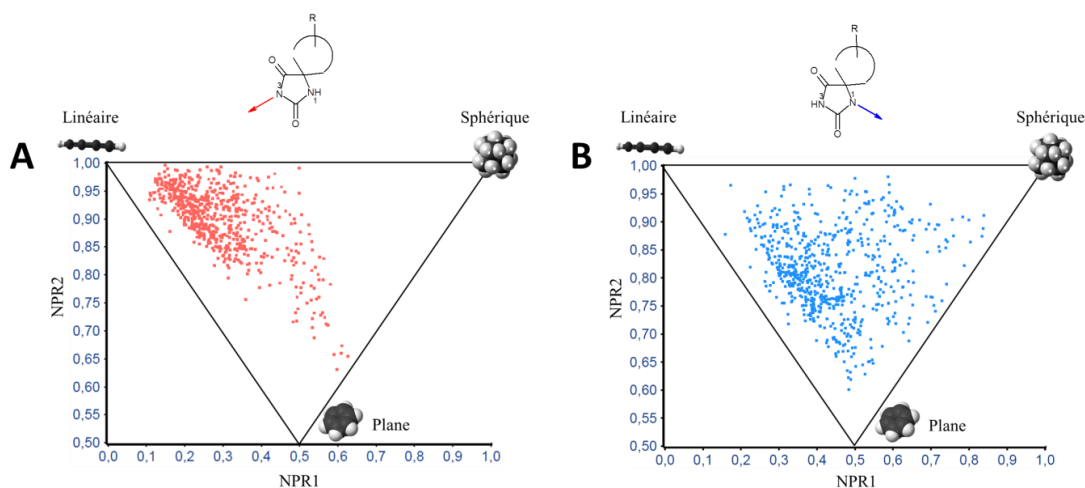


Figure 94 : A. Représentation 3D des composés de la lib-N3. B. Représentation 3D des composés de la lib-N1

La substitution de la position N3 aboutit à des composés qui sont majoritairement linéaires (Figure 94A). En revanche, la substitution de la position N1 conduit à des composés présentant un caractère 3D plus marqué. De plus, ces composés, capables d'adopter des formes géométriques diverses, permettent d'explorer l'espace chimique plus efficacement (Figure 94B).

Afin de mettre en avant l'intérêt de concevoir ce type de fragments privilégiés capables d'être répartis dans l'espace 3D après avoir été fonctionnalisés par des groupements simples, nous avons décidé d'effectuer un criblage *in silico* sur une interaction protéine-protéine. En effet, les composés actifs sur les interactions protéine-protéine doivent présenter préférentiellement un caractère tridimensionnel¹⁵³. L'interaction protéine-protéine choisie a été p53-MDM2. La chimiothèque virtuelle, focalisée autour du noyau spirohydantoïne substitué en différentes positions, a été conçue

selon la même approche que pour lib-N1 et lib-N3 mais à partir d'un plus grand nombre d'agents alkylants commercialement disponibles.

III. Application aux interactions protéine-protéine : criblage *in silico* sur MDM2 d'une chimiothèque focalisée autour du noyau spirohydantoïne

III.1. Rôle biologique et structure de l'interaction p53-MDM2

III.1.1. Implication de l'interaction p53-MDM2 dans le cancer

La protéine p53 est un facteur de transcription qui joue un rôle clé dans la régulation et le contrôle du processus cellulaire. Ainsi, en situation de stress cellulaire causé par exemple par une lésion à l'ADN, la protéine p53 va être capable de provoquer un arrêt transitoire dans la progression du cycle cellulaire afin de réparer la cellule endommagée ou d'induire un phénomène d'apoptose¹⁵⁴.

Cependant, il a été montré que p53 est sous contrôle de la protéine MDM2 (Mouse Double Minute 2). En effet, MDM2 est capable de se lier à p53 ce qui a pour conséquences d'inhiber l'activité de p53, de faciliter sa dégradation et d'induire une prolifération anormale des cellules tumorales^{154, 155}. Ainsi, développer des ligands de MDM2 capables d'inhiber l'interaction p53-MDM2 est apparu comme une stratégie de choix pour activer le suppresseur de tumeur p53. Dans cette optique, les informations structurales du domaine de liaison de MDM2 à p53 sont nécessaires pour concevoir une petite molécule organique capable d'interagir avec MDM2 et ainsi empêcher la formation du complexe p53-MDM2.

III.1.2. Informations structurales sur le domaine de liaison de l'interaction p53-MDM2

Le mode de liaison existant entre ces deux protéines a été décrit et caractérisé à partir de structures cristallographiques¹⁵⁶. La cocrystallisation entre un fragment de p53 [AA : 15-23] et de MDM2 [AA : 17-125] est présentée en Figure 95.

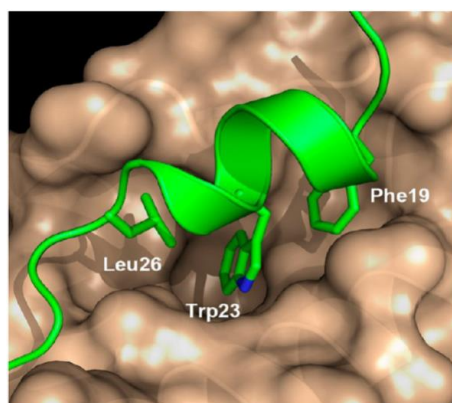


Figure 95 : Mode de liaison de p53 (en vert) à MDM2 (en brun) obtenu par cocrystallisation¹⁵⁷

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Cette cocrystallisation révèle que MDM2 présente trois poches hydrophobes capables de lier trois résidus clés de p53, à savoir Phe19, Trp23 et Leu26. Ainsi, le mode de liaison entre p53 et MDM2 est assuré par ces trois interactions hydrophobes¹⁵⁷. Basée sur cette structure cristallographique, différents squelettes moléculaires ont pu être conçus. Par exemple, Gonzalez-Lopez de Turiso *et al.* ont décrit le noyau *cis*-diarylmorpholine comme inhibiteur de p53-MDM2¹⁵⁷. Le mode de liaison de ce composé est présenté en Figure 96.

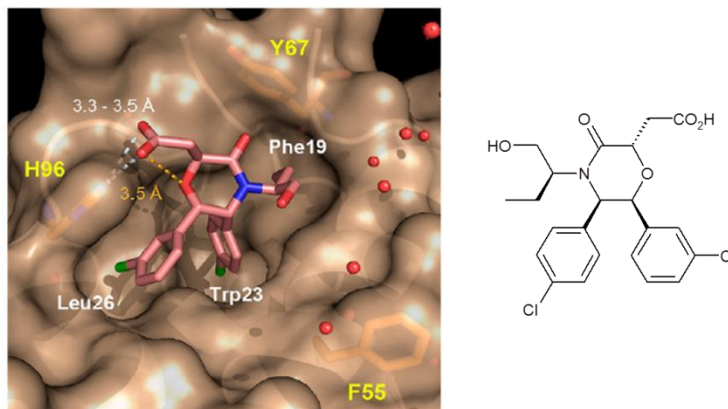


Figure 96 : Mode de liaison du composé possédant le noyau *cis*-diarylmorpholine (en rose) avec la protéine MDM2 (en brun) obtenu par cocrystallisation – PDB 4JWR¹⁵⁷

Cette cocrystallisation révèle que les deux groupements chlorophényle et le chaînon éthylénique miment les trois résidus clés de p53 (Phe19, Trp23 et Leu26) en occupant les trois poches hydrophobes de MDM2. De nombreux autres squelettes moléculaires capables d'interagir avec MDM2 pour empêcher la formation du complexe protéique p53-MDM2 ont été développés tels que le noyau imidazoline, benzodiazépine et spirooxindole¹⁵⁸.

Comme nous l'avons dit précédemment, les composés actifs sur les interactions protéine-protéine doivent avoir un caractère tridimensionnel¹⁵³. Afin de confirmer que l'interaction p53-MDM2 est sensible au caractère 3D des ligands, 5 structures présentant des noyaux différents et cocrystallisés avec MDM2 ont été sélectionnées (Figure 97).

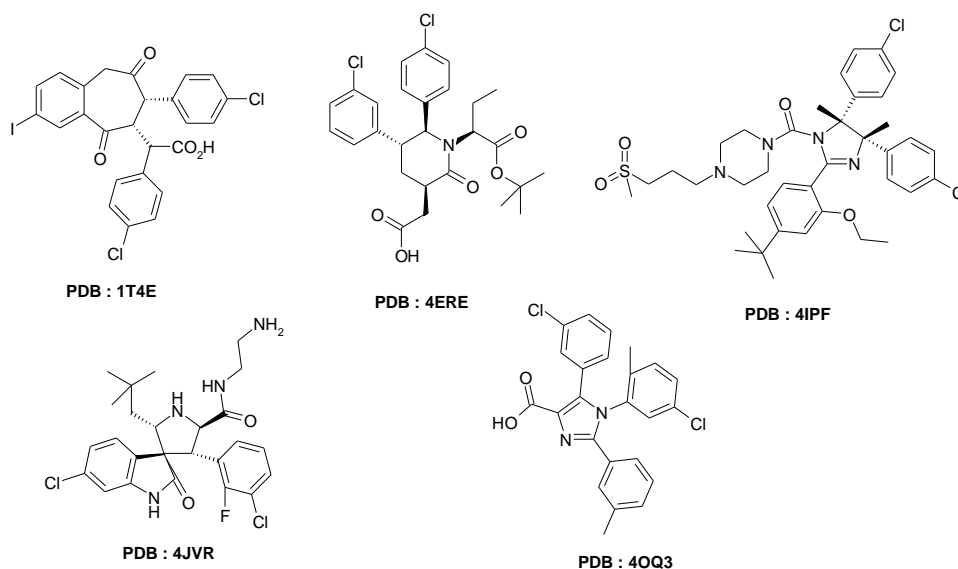


Figure 97 : Structures des 5 ligands sélectionnés pour évaluer leurs représentations 3D. Ces 5 ligands ont été cocrystallisés avec MDM2 (codes PDB indiqués)

Les représentations 3D de ces 5 ligands sont représentées en Figure 98.

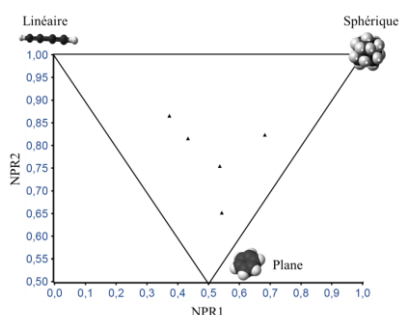


Figure 98 : Représentation 3D des 5 ligands cocristallisés avec MDM2

La Figure 98 indique bien que les ligands cocristallisés avec MDM2 ont un caractère tridimensionnel se traduisant par une occupation de l'espace localisé vers la droite du graphique. Cette cible thérapeutique apparaît donc comme judicieuse pour évaluer l'intérêt de nos 29 fragments privilégiés synthétisés possédant le noyau spirohydantoïne. Ainsi, une chimiothèque virtuelle focalisée autour du noyau spirohydantoïne substitué en différentes positions a été générée à partir d'agents alkylants commercialement disponibles.

III.2. Génération d'une chimiothèque virtuelle focalisée autour du noyau spirohydantoïne substitué en différentes positions par des agents alkylants commerciaux

III.2.1. Sélection des agents alkylants commercialement disponibles

Dans cette étude, la réaction mise en jeu pour aboutir à la chimiothèque virtuelle a été une substitution nucléophile entre l'hétérocycle hydantoïne, agissant comme un nucléophile, et un dérivé halogéné, agissant comme un électrophile. Les dérivés halogénés pris comme réactifs pour cette substitution nucléophile possèdent un atome d'iode, de brome ou de chlore. Ces dérivés halogénés, commercialisés par Sigma Aldrich, sont de nature aliphatiques ou benzyliques.

La génération virtuelle de la base d'agents alkylants a été réalisée en utilisant le logiciel Pipeline Pilot afin de pouvoir appliquer des filtres pour retirer toutes les molécules indésirables. La première étape a consisté à éliminer tous les agents alkylants présentant des fonctions réactives qui ne seraient pas tolérées dans les conditions expérimentales. Ainsi, tous les dérivés halogénés qui possédaient plus d'un centre électrophile ont été éliminés. Les réactifs présentant des fonctions accepteurs de Michael, aldéhydes, cétones, chlorures d'acyles, sulfochlorures, isocyanates ou isothiocyanates ont donc été retirés. Par ailleurs, pour les composés possédant plus d'un atome d'halogène (iode, brome ou chlore), seuls les dérivés avec des atomes d'halogènes portés par des cycles aromatiques ont été conservés. De plus, une limite en nombre d'atomes d'halogènes a été fixée afin de ne pas avoir des composés ayant une masse molaire trop élevée. Outre l'atome d'halogène réactif, le nombre maximum d'atomes d'iode, de brome, de chlore et de fluor a été fixé à 1, 2, 3 et 4 respectivement par agent alkylant. En prenant en compte toutes ces considérations et à partir des 580

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

agents alkylants commercialement disponibles, 170 ont été retenus. Des exemples de structures de dérivés halogénés sélectionnés sont présentés en Figure 99.

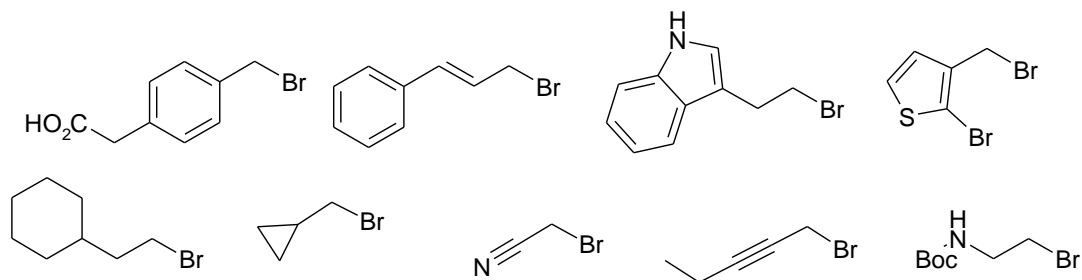


Figure 99 : Exemples d'agents alkylants qui ont été sélectionnés

Des agents alkylants avec des cycles aromatiques substitués par une fonction acide carboxylique ou par une chaîne aliphatique insaturée ont été choisis. Des composés avec des cycles hétéroaromatiques comme un indole ou un thiophène substitué ont également été inclus dans la base d'agents alkylants. De plus, des dérivés halogénés avec des chaînes aliphatiques cycliques de type éthylcyclohexane ou méthylcyclopropane ont été sélectionnés. D'autres agents alkylants avec des chaînes aliphatiques fonctionnalisées par un nitrile, par une amine protégée par un groupement Boc ou possédant un alcyne ont été conservés.

Les 170 dérivés halogénés sélectionnés ont ensuite été utilisés pour alkyler les deux atomes d'azote des 29 spirohydantoïnes.

III.2.2. Synthèse de la chimiothèque virtuelle

Parmi les 29 composés synthétisés, 4 d'entre eux présentent un site d'alkylation supplémentaire : un atome d'azote protégé par un groupement benzyle ou Boc. Ces 4 produits (**173**, **180**, **181** et **189**) ont donc été virtuellement déprotégés puis ils ont été inclus dans la chimiothèque sous forme d'amine libre. Le composé pipéridine-4-spirohydantoïne ayant été réellement synthétisé (composé **170**), son analogue protégé par un groupement Boc (composé **178**) n'a pas été virtuellement déprotégé. Ainsi, le nombre total de composés engagés dans des réactions de substitutions virtuelles est de 33.

Parmi les deux atomes d'azote de l'hétérocycle hydantoïne et les atomes d'azote déprotégés pour les composés **170**, **173**, **180**, **181** et **189** différentes combinaisons de substitution ont été envisagées. Ces substitutions virtuelles ont été réalisées avec le logiciel Pipeline Pilot. La démarche entreprise pour concevoir la chimiothèque virtuelle lib-N1, consistant en l'alkylation de la position N1 de l'hétérocycle hydantoïne par les 170 dérivés halogénés, est représentée en Figure 100.

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

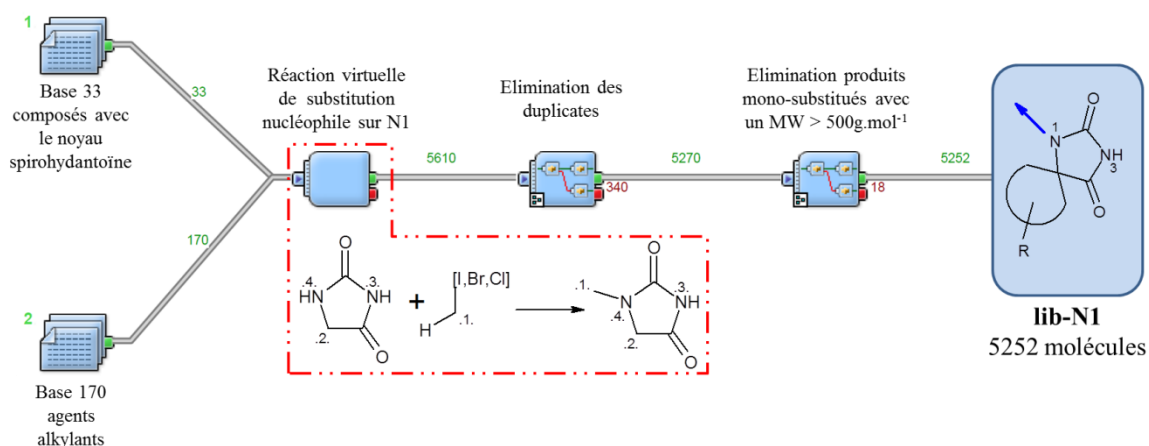


Figure 100 : Protocole Pipeline Pilot utilisé pour générer la chimiothèque virtuelle lib-N1

Les 33 noyaux spirohydantoïnes ont été virtuellement substituées une fois par les 170 agents alkylants en position N1 en utilisant la réaction indiquée dans le cadre rouge de la Figure 100. Les doublons (340 composés) ainsi que les composés mono-substitués ayant une masse molaire supérieure à 500 g.mol⁻¹ (18 composés) ont été éliminés afin d'aboutir à la chimiothèque virtuelle lib-N1 possédant 5252 composés mono-substitués en position N1. Selon ce protocole, d'autres positions de substitutions ainsi que des combinaisons ont été réalisées. Elles sont présentées dans le Tableau 37.

Chimiothèque virtuelle	Structure	Nombre de composés (MW<500)	Chimiothèque virtuelle	Structure	Nombre de composés (MW<500)
lib-N1		5252	lib-N1+N3		359246
lib-N3		5252	lib-N1+N4		130250
				(voir Figure 101)	

Tableau 37 : 4 chimiothèques virtuelles conçues pour le criblage *in silico* sur la protéine MDM2

De la même manière que pour la position N1, les 33 noyaux spirohydantoïnes ont été substitués par les 170 agents alkylants en position N3 conduisant ainsi à la chimiothèque virtuelle lib-N3 contenant 5252 composés mono-substitués.

Ces 33 noyaux spirohydantoïnes ont également été substitués sur les deux positions N1 et N3 simultanément pour aboutir à la chimiothèque virtuelle lib-N1+N3 possédant 359246 composés di-substitués.

Enfin, les 4 produits virtuellement déprotégés ainsi que le composé **170** synthétisé ont été substitués sur leurs fonctions amines libres par les 170 agents alkylants. Les 850 composés obtenus ont

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

été substitués uniquement sur la position N1 de l'hétérocycle hydantoïne pour aboutir à la dernière chimiothèque virtuelle lib-N1+N4 comprenant 130250 composés (Figure 101).

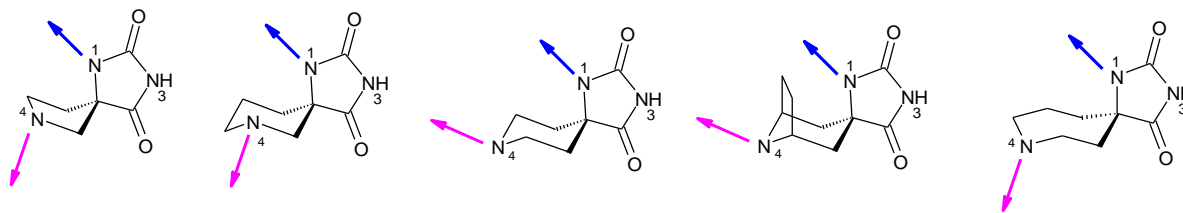


Figure 101 : Substitutions réalisées pour la conception de la chimiothèque virtuelle lib-N1+N4

Le regroupement de ces 4 chimiothèques virtuelles conduit à 500000 molécules qui ont ensuite été criblées *in silico* sur la protéine MDM2.

III.3. Résultat du criblage *in silico*

III.3.1. Système d'étude pour le criblage *in silico* de MDM2

Dans un premier temps, 5 ligands cocrystallisés avec un fragment de la partie N-terminale de MDM2 ont été sélectionnés (Figure 97). Ces 5 structures cristallographiques (PDB 1T4E, 4ERE, 4IPF, 4JVR et 4OQ3) ont été utilisés par notre collaborateur Nicolas Renault (U995, Lille) afin de réaliser des docking croisés. Un docking croisé consiste à évaluer l'affinité virtuelle d'un des 5 ligands cocrystallisés avec les 4 autres structures cristallographiques de MDM2. Pour chaque docking, la différence entre ce qui est réellement observé à travers le système cristallographique et ce qui est prédit au moyen de l'outil informatique a été déterminée. Cette différence est quantifiée par la valeur du rmsd (*root-mean-square deviation*). Deux systèmes de docking ont été étudiés : soit centré sur la cavité d'intérêt de MDM2 soit sur toute la protéine (Figure 102).

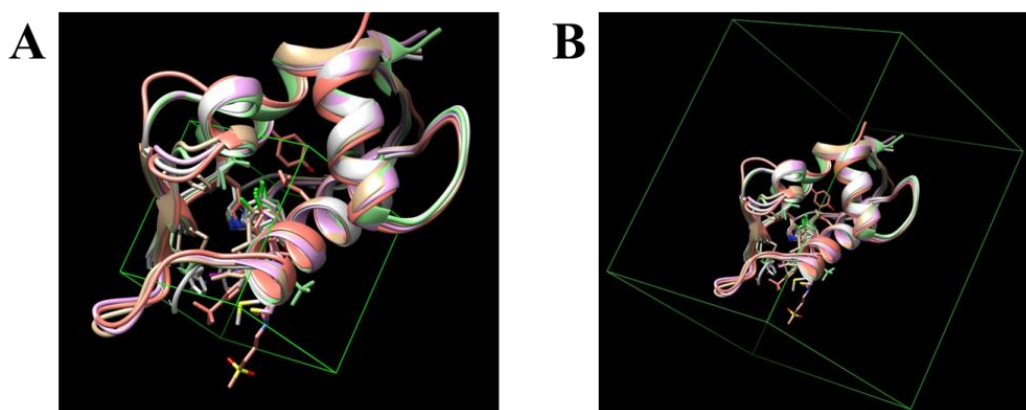


Figure 102 : Les deux systèmes de docking étudiés. A) Docking centré sur la cavité d'intérêt de MDM2 - B) Docking effectué sur toute la protéine MDM2

L'objectif de ces docking croisés est de pouvoir sélectionner une des 5 structures cristallographiques de MDM2 ayant la meilleure affinité virtuelle avec les 4 autres ligands se traduisant par un faible rmsd (inférieur à 2Å) pour chaque ligand. Les résultats de docking centrés sur

la cavité de MDM2 sont présentés en Figure 103A tandis que ceux obtenus sur toute la protéine sont présentés en Figure 103B.

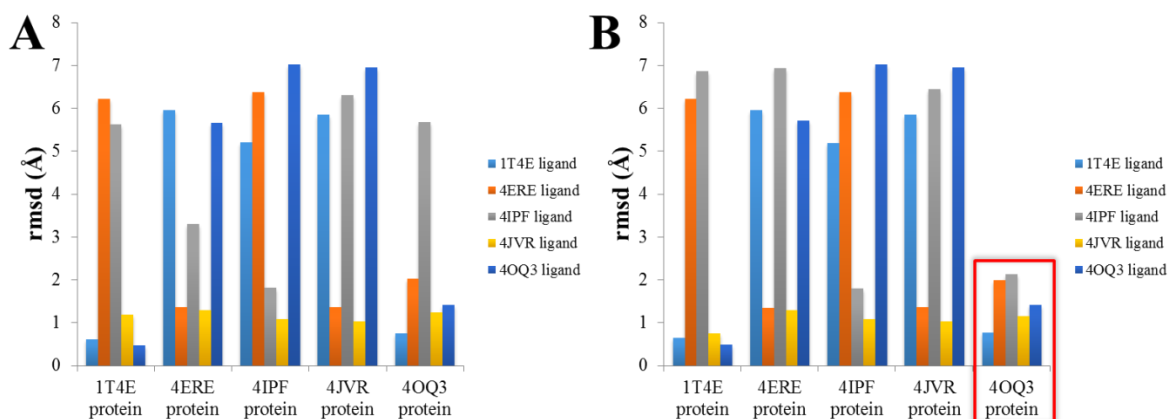


Figure 103 : A. Résultat du docking croisé centré sur la cavité de MDM2
B. Résultat du docking croisé sur toute la protéine MDM2

Que ce soit pour le docking centré sur la cavité d'intérêt de MDM2 (Figure 103A) ou sur toute la protéine (Figure 103B), de faibles rmsd ont été observés lorsque le ligand a été docké dans sa structure cristallographique. Ainsi par exemple, le ligand 1T4E avec la protéine 1T4E ont abouti à un rmsd inférieur à 1Å dans les deux systèmes de docking.

Les meilleurs résultats ont été observés pour le système de docking effectué sur toute la protéine. En effet, en plus de conduire à un faible rmsd avec son ligand de référence, la protéine 4OQ3 a permis d'obtenir des rmsd inférieurs à 2Å avec les 4 autres ligands. Ainsi, la structure cristallographique 4OQ3 de MDM2 a été choisie pour réaliser le criblage *in silico*.

Après avoir choisi la structure cristallographique ainsi que le système de docking, les acides aminés de MDM2 reconnus essentiels pour établir des interactions avec des ligands ou avec p53 ont été choisis. De tels résidus permettent de différencier les composés actifs des composés inactifs et ont donc été utilisés comme des filtres pour ce criblage. Des études ont révélé le rôle prépondérant de l'histidine (His96) de MDM2 capable d'établir des interactions de type π - π stacking^{157, 159} ou des interactions électrostatiques¹⁶⁰ avec des composés organiques. Par ailleurs, il a été montré que des mutagénèses dirigées contre les résidus Gly58 et Val75 permettent d'empêcher *in vitro* l'interaction avec p53 et *in vivo* l'activité régulatrice de p53 suggérant le rôle critique de ces deux résidus¹⁶¹. Les résidus His96, Gly58 et Val75 ont été utilisés comme des filtres : un composé est considéré comme positif s'il interagit avec un ou plusieurs de ces acides aminés. Les 5 ligands cocrystallisés, 21 ligands décrits comme actifs et 6 composés connus pour être inactifs ont été sélectionnés pour examiner l'efficacité de ces filtres. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 104. L'ordonnée représente le pourcentage de composés « positifs » c'est à dire interagissant avec MDM2 via les 3 résidus pris séparément ou combinés.

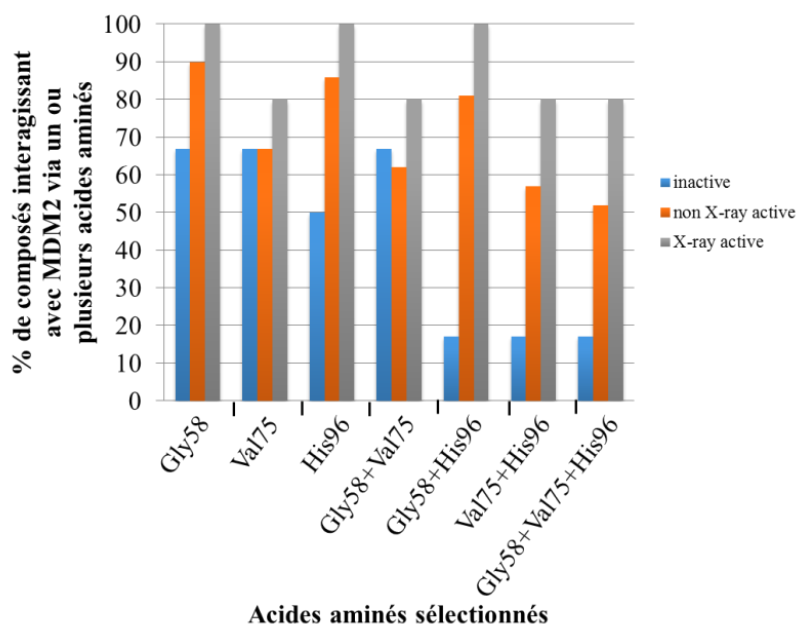


Figure 104 : Pourcentage de composés obtenus après avoir été filtrés sur les 3 résidus clés de MDM2 pris individuellement ou en combinaison

Comme l'indique les résultats de la Figure 104, plus de 50% des composés connus comme inactifs ont passé les filtres individuels Gly56, Val75 ou His96 et le filtre combiné Gly58+Val75 (histogramme bleu – 68%, 68%, 50% et 68% respectivement). Ceci est aberrant car ces composés n'ont pas de raison d'interagir avec un ou plusieurs résidus de MDM2. Par conséquent, ces 4 filtres ne sont pas assez discriminants pour être utilisés. Les 3 autres filtres combinés Gly58+His96, Val75+His96 et Gly58+Val75+His96 ont abouti à un taux faible de composés inactifs (17%). Pour être le plus discriminant possible le filtre, basé sur les 3 résidus Gly58+Val75+His96, a été choisi pour entreprendre le criblage *in silico*.

III.3.2. Résultat du criblage *in silico*

Les différentes étapes ainsi que le mode et le nombre de sélection de composés sont présentés en Figure 105.

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

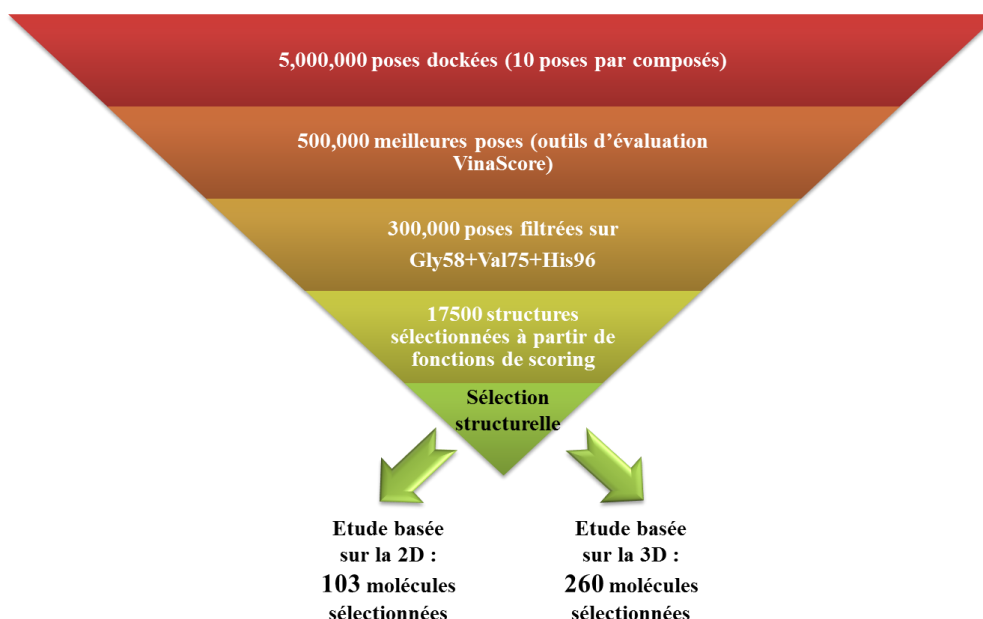


Figure 105 : Différentes étapes de sélection réalisées lors du criblage virtuelle de la chimiothèque de 500000 molécules sur MDM2

Dans un premier temps, 10 poses ont été générées pour chaque composé de la chimiothèque virtuelle. Ces poses ont été évaluées sur la structure cristallographique de MDM2 4OQ3 et la meilleure de ces 10 poses a été sélectionnée. Ensuite, les 500000 meilleures poses de chaque composé ont été examinées sur le filtre Gly58+Val75+His96 ce qui a permis d'éliminer 200000 molécules. A partir de fonctions de scoring optimisées par notre collaborateur pour discriminer les faux positifs, 17500 composés ont été retenus. Des filtres supplémentaires basés sur la structure 2D et sur la structure 3D de ces 17500 molécules ont été nécessaires pour affiner cette sélection.

III.3.2.1. Sélection basée sur la structure 2D des 17500 molécules

Dans un premier temps, la fréquence de présence de chacun des 33 noyaux spirohydantoïnes dans les 17500 structures retenues a été analysée. Les résultats sont présentés en Figure 106.

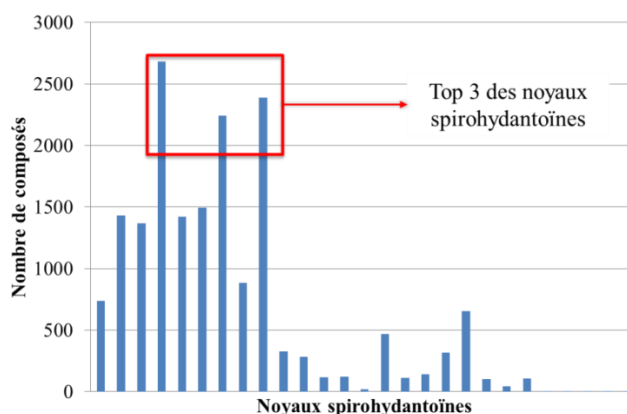


Figure 106 : Evaluation de la fréquence de présence de chacun des 33 noyaux spirohydantoïnes dans les 17500 structures retenues

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Ces résultats indiquent que 3 noyaux spirohydantoïnes sont surreprésentés parmi les 17500 structures retenues. Ces 3 noyaux spirohydantoïnes sont présentés dans la Figure 107.

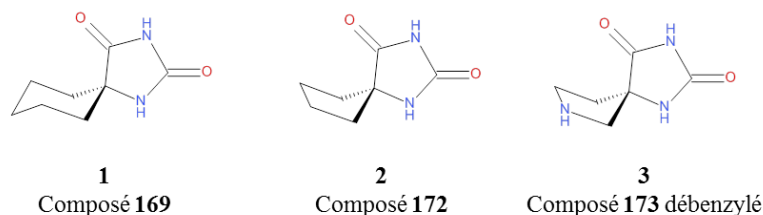


Figure 107 : 3 noyaux spirohydantoïnes majoritairement présents dans les 17500 structures

Ainsi 7312 structures, composées des noyaux spirohydantoïnes 1, 2 ou 3 ont été sélectionnées. Comme cela a été illustré avec la Figure 98, les 5 ligands cocristallisés avec MDM2 présentent tous un NPR1 supérieur à 0.3. Ainsi, les principaux moments d'inertie des 7312 structures ont été calculés, normalisés puis représentés sur un graphique (Figure 108).

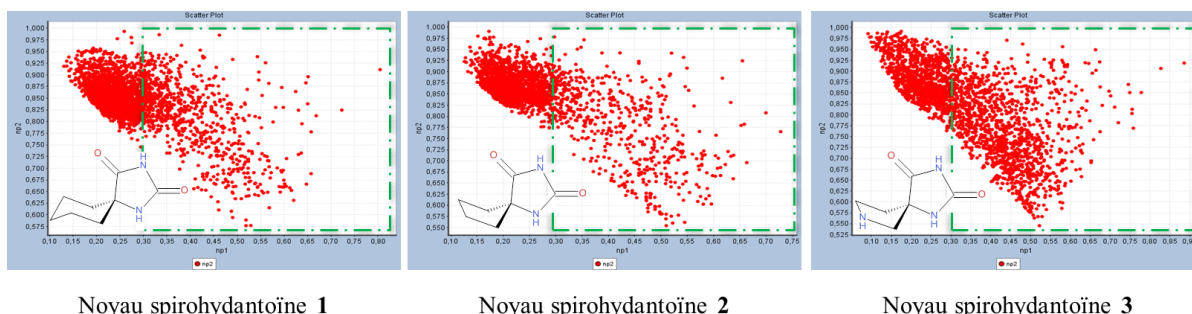


Figure 108 : Représentation 3D des 7312 structures comportant les noyaux spirohydantoïnes 1, 2 ou 3

2646 structures présentant le noyau spirohydantoïne 1, 2 ou 3 avec un NPR1 supérieur à 0.3 ont été sélectionnées. Enfin, de la même manière que pour les noyaux spirohydantoïnes, la fréquence d'apparition des différents agents alkylants dans chacune des 2646 structures a été évaluée. Les résultats sont présentés dans la Figure 109.

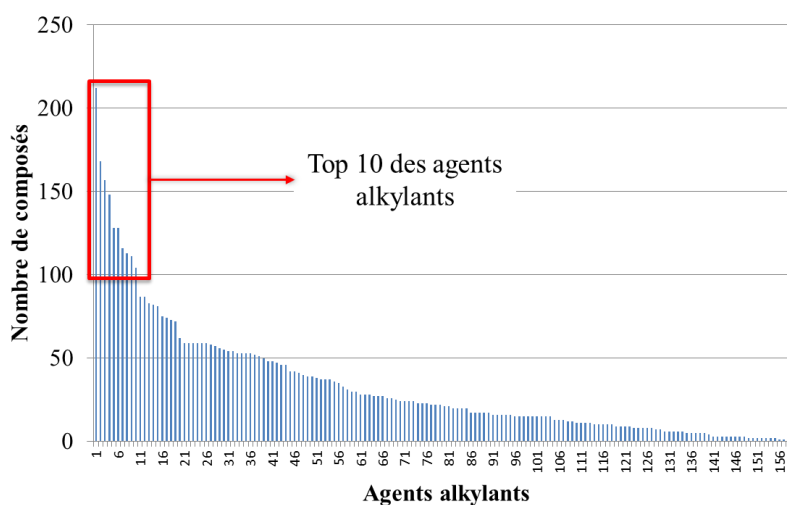


Figure 109 : Agents alkylants majoritairement présents dans les 2646 structures sélectionnées

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

Ces résultats indiquent que 10 agents alkylants sont surreprésentés quel que soit l'atome d'azote substitué considéré. Ces 10 agents alkylants, dont les structures sont présentées en Figure 110, ont été retrouvés dans plus de 100 molécules.

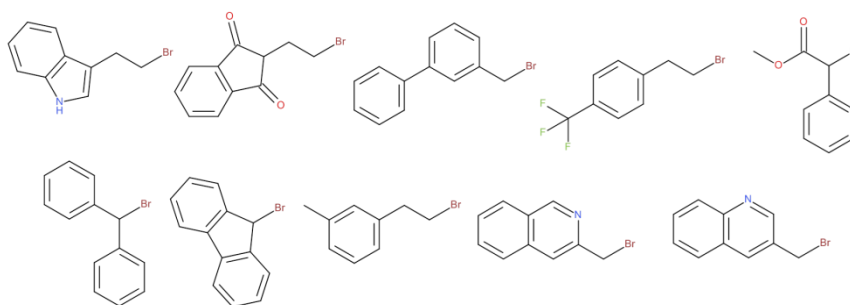


Figure 110 : 10 agents alkylants majoritairement présents dans les 2646 structures analysées

Les 10 agents alkylants possèdent tous un cycle aromatique. Parmi les 2646 structures, celles qui étaient substituées par ces 10 agents alkylants ont été sélectionnées ce qui a permis au final de retenir 103 molécules.

III.3.2.2. Sélection basée sur les structures 3D des ligands et sur leur mode d'interaction avec la poche MDM2

Une empreinte 3D du mode d'interaction de chacun des 17500 composés avec MDM2 a été établie. Ces empreintes 3D ont été regroupées en fonction de leur similarité et un représentant de chaque groupe a été sélectionné permettant d'obtenir 1700 molécules. De la même façon que précédemment, les 1700 molécules présentant un NPR1 supérieur à 0.3 ont été retenues conduisant à 700 molécules. Parmi ces molécules, seules les 260 présentant les noyaux spirohydantoïnes **1**, **2** ou **3** ont été sélectionnées. Ainsi, à l'issue des filtres basés sur la 2D et sur la 3D, 103 et 260 molécules ont respectivement été sélectionnées. Ce nombre de composés est encore trop conséquent pour pouvoir être synthétisés. C'est pour cela qu'un affinement supplémentaire basé sur le mode de liaison *in silico* des 363 molécules à MDM2 a été nécessaire. Ce mode de liaison *in silico* avec MDM2 a été analysé en tenant compte des 3 poches hydrophobes de MDM2 identifiées comme indispensables pour son interaction avec p53.

III.3.2.3. Affinement basée sur le mode de liaison *in silico* à MDM2 des 363 structures sélectionnées

Comme cela a été mentionné dans la partie II.1.2., 3 poches hydrophobes de MDM2 capables d'interagir avec les 3 résidus clés Phe19, Trp23 et Leu26 de p53 ont été identifiées (Figure 111). Ces trois poches de MDM2 seront notées D1 (poche interagit avec Phe19), D2 (poche interagit avec Trp23) et D3 (poche interagit avec Leu26).

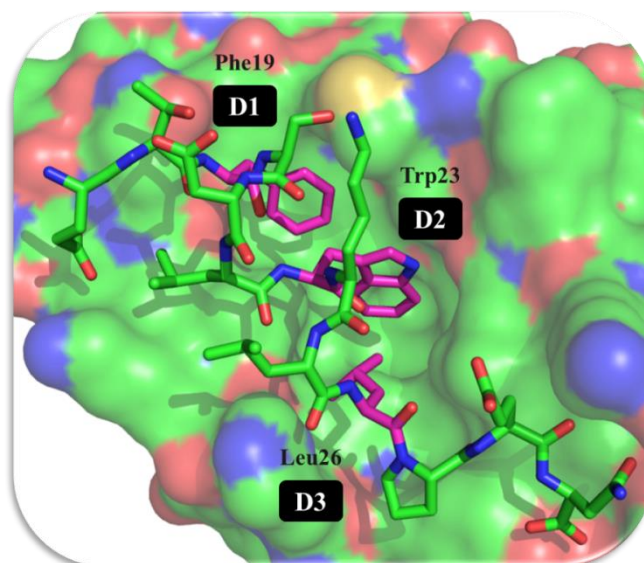


Figure 111 : 3 poches hydrophobes de MDM2 interagissant avec les 3 résidus Phe19, Trp23 et Leu26 de p53

L'objectif de cet affinement a donc été d'identifier des molécules parmi les 363 capables de se lier *in silico* avec ces 3 poches hydrophobes de MDM2. Des exemples de mode de liaison *in silico* obtenus pour chaque type de noyau spirohydantoïne sont présentés en Figure 112.

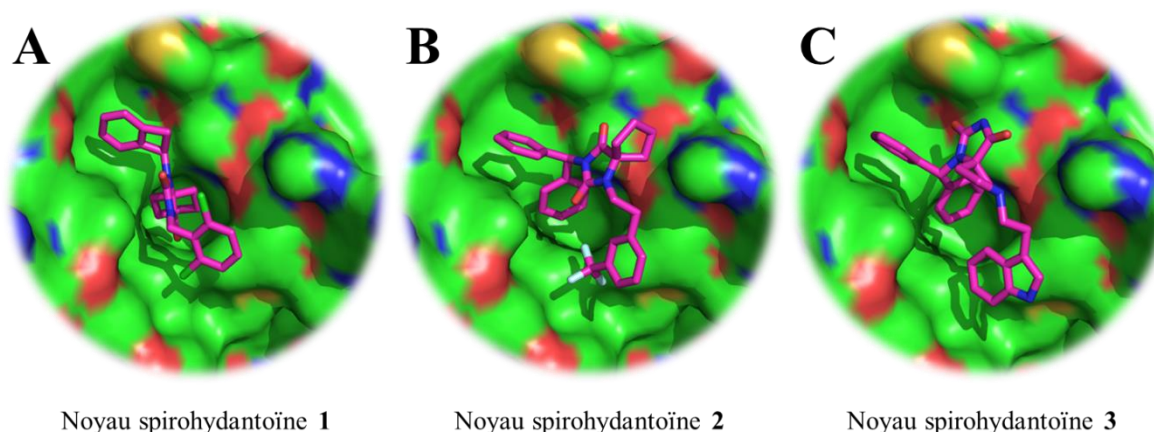


Figure 112 : Mode de liaison *in silico* observé pour les 3 noyaux spirohydantoïnes sélectionnés

L'ensemble des composés interagissent avec les 3 poches clés de MDM2 par l'intermédiaire des différents noyaux spirohydantoïne qui orientent leurs substituants dans les trois directions de l'espace. En fonction du noyau spirohydantoïne étudié, les interactions avec les 3 poches de MDM2 se font de différentes manières. Pour certains composés possédant le noyau spirohydantoïne 1 des interactions entre la poche D2 de MDM2 et le groupement cyclohexane (portant le carbone spiranique) ont été observées (Figure 112A). Dans ce cas, les poches D1 et D3 ont été occupées par des groupements aromatiques portés par l'hétérocycle hydantoïne en position N1 et N3. Enfin, la fonction carbonyle du noyau hydantoïne se situant côté solvant peut être intéressante pour aboutir à des interactions hydrophiles avec le solvant.

Dans le cas de composés possédant le noyau spirohydantoïne 2, les poches D1 et D2 de MDM2 ont été occupées par le groupement diphenyle porté par l'atome d'azote N1 du cycle hydantoïne (Figure 112B). Ce type d'interaction a également été observé pour les composés avec le

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

noyau spirohydantoïne **3**. Pour ces composés avec le noyau spirohydantoïne **3**, la position N3 du cycle hydantoïne étant encore libre, elle pourrait être substituée afin d'établir de nouvelles interactions avec MDM2 ou au contraire rester libre afin d'interagir avec le solvant (Figure 112C).

A l'issue de cet affinement, 51 hits capables d'interagir de différentes manières avec les 3 poches hydrophobes de MDM2 ont été sélectionnés. Parmi ces 51 hits, 24 possèdent le noyau spirohydantoïne **1**, 5 possèdent le noyau spirohydantoïne **2** et 22 possèdent le noyau spirohydantoïne **3**. Ces 3 familles sont représentées en Figure 113, Figure 114 et Figure 115.

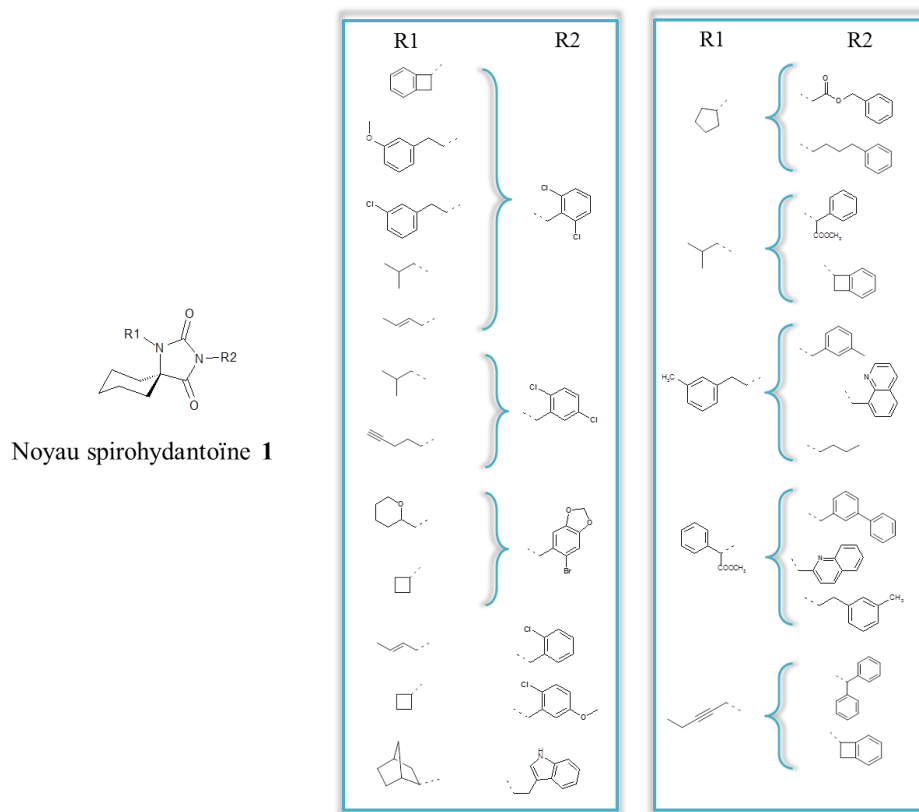


Figure 113 : Structure des 24 hits sélectionnés possédant le noyau spirohydantoïne **1**

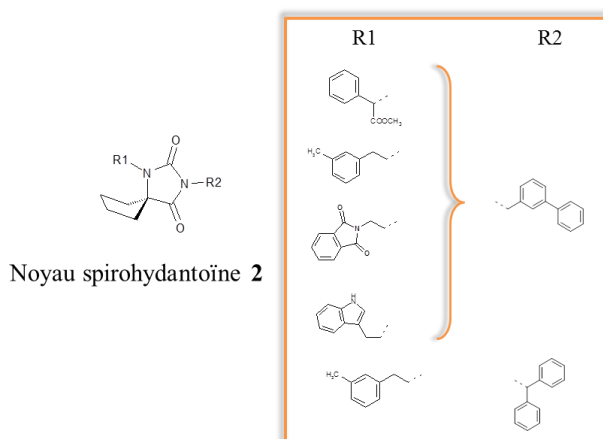


Figure 114 : Structure des 5 hits sélectionnés possédant le noyau spirohydantoïne **2**

Chapitre II – Approche par fragments : synthèse de fragments privilégiés permettant une plus large exploration de l'espace chimique

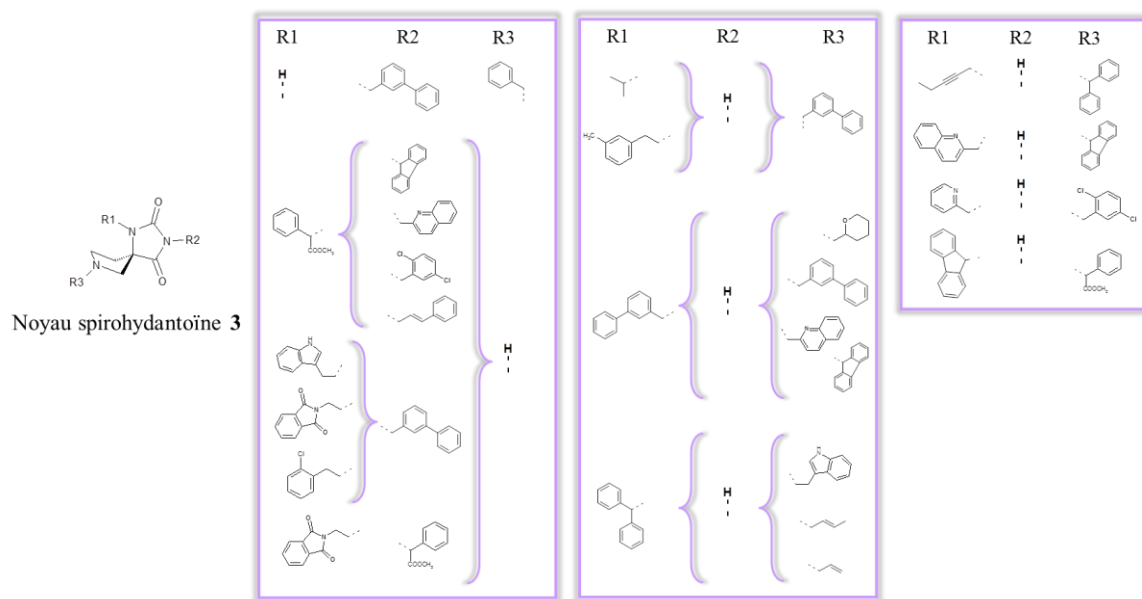


Figure 115 : Structure des 22 hits sélectionnés possédant le noyau spirohydantoïne **3**

L'objectif désormais est de synthétiser ces 51 hits identifiés afin de pouvoir les tester *in vitro* sur la protéine MDM2 de façon à confirmer les résultats *in silico* obtenus. Les synthèses de ces 51 hits sélectionnés sont actuellement en cours.

Conclusion

Dans le but d'accroître la diversité de notre chimiothèque de fragments, deux séries chimiques ont été conçues et synthétisées : l'une comportant le noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione et l'autre possédant le noyau 5-spiro-1,3-imidazoline-2,4-dione ou spirohydantoïne.

Pour la première famille, trois voies de synthèse effectuées par irradiation micro-ondes ont été optimisées et ont permis d'obtenir 14 molécules. La représentation 3D de ces 14 fragments a montré qu'elles tendaient à être moins linéaires et moins planes que la très grande majorité des fragments commerciaux de la chimiothèque de notre laboratoire. L'introduction d'un carbone spiranique en position 3 du noyau 1,4-benzodiazépine-2,5-dione a permis d'aboutir à des composés présentant un caractère 3D marqué. Pour la famille des spirohydantoïnes, l'optimisation d'une voie de synthèse a permis d'obtenir 29 molécules ayant des structures 3D variées. La très grande majorité de ces fragments a une solubilité aqueuse mesurée supérieure à 0.8 mM.

La substitution sélective des deux atomes d'azote de l'hétérocycle hydantoïne par des groupements de faible masse molaire permet d'obtenir de nouveaux fragments capables d'explorer efficacement l'espace chimique. Dans ce sens, nous avons introduit le concept de fragments privilégiés qui consiste à concevoir un fragment de structure rigide présentant un caractère 3D et ayant plusieurs points de fonctionnalisation.

Afin d'évaluer l'intérêt du noyau spirohydantoïne comme fragment privilégié, une chimiothèque virtuelle focalisée autour de ce noyau a été générée. Celle-ci a ensuite été criblée *in silico* sur l'interaction protéine-protéine p53-MDM2 et les 51 hits identifiés sont actuellement en cours de synthèse afin de valider cette stratégie.

Chapitre III – Application de l’approche par fragments : conception et synthèse d’inhibiteurs du répresseur transcriptionnel mycobactérien EthR₂ comme nouvelle approche pour traiter la tuberculose

Introduction

La tuberculose, causée par l’agent pathogène *Mycobacterium tuberculosis*, est aujourd’hui la première maladie infectieuse la plus meurtrière devant le sida. 9.6 millions de nouveaux cas ont été recensés en 2014 et 1.5 millions de personnes sont décédées des suites de cette infection. L’apparition du vaccin BCG au début du XX^{ème} siècle associée au développement d’antituberculeux dans les années 1950 a permis de réduire le nombre de personnes infectées jusque dans les années 1980. Cependant, l’épidémie du virus du sida et l’apparition de bactéries résistantes ont entraîné une recrudescence de la maladie.

Les traitements antituberculeux actuels sont longs et reposent sur l’utilisation de cocktails d’antibiotiques. Ils s’accompagnent dans la majeure partie des cas d’effets indésirables difficilement supportables par les malades déjà affaiblis. Dès lors, l’inobservance du traitement facilite l’apparition de souches résistantes. La recherche de nouvelles solutions thérapeutiques a permis l’identification de deux nouvelles molécules (bédaquiline et délamanide) qui ont récemment obtenu une autorisation temporaire d’utilisation pour le traitement de la tuberculose multi-résistante. Néanmoins, il est plus que nécessaire de découvrir de nouvelles stratégies de lutte contre ce bacille.

Une alternative au développement de nouveaux antituberculeux consiste à potentialiser l’activité d’un médicament déjà existant ce qui permettrait de réduire les doses administrées et ainsi les effets secondaires. Le médicament qui a été choisi pour appliquer cette stratégie de potentialisation est l’éthionamide. Il s’agit d’une prodrogue qui a besoin d’être bioactivée par la monooxygénase EthA pour acquérir son activité antituberculeuse.

Lors de travaux antérieurs, une nouvelle voie de bioactivation de l’éthionamide, jusqu’alors inconnue et passant par une oxydo-réductase bactérienne appelée EthA₂, a été identifiée. La production d’EthA₂ est sous contrôle du répresseur transcriptionnel EthR₂ et il a été montré que l’activation de cette nouvelle voie, via l’inhibition d’EthR₂, permet de rétablir la sensibilité des souches résistantes à l’éthionamide. Il a donc été envisagé au cours de cette thèse, de développer de nouveaux composés capables d’inhiber ce répresseur transcriptionnel EthR₂ en utilisant une approche par fragments.

Le criblage d’une librairie de 960 fragments a permis d’identifier une famille de composés capable de se lier à la protéine EthR₂ empêchant ainsi sa fixation à l’ADN. Le mode de liaison de l’un des composés avec le domaine de régulation de la protéine EthR₂ a pu être déterminé par cristallographie. A partir de ces informations, le design rationnel d’inhibiteurs d’EthR₂ a été effectué et plusieurs analogues structuraux présentant une activité fonctionnelle submicromolaire ont ainsi pu être identifiés.

I. Description de la pathologie, traitements actuels et stratégie envisagée au laboratoire

Dans les pays développés, la tuberculose, maladie causée par une infection liée à la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, est souvent synonyme de maladie du passé. Pourtant elle est désormais la première maladie infectieuse la plus meurtrière devant le sida. Selon le rapport annuel de l’Organisation Mondiale de la Santé¹⁶², 9.6 millions de nouveaux cas ont été recensés en 2014 et 1.5 million de personnes sont mortes dès suite de cette infection.

I.1. Présentation de la tuberculose

I.1.1. Données épidémiologiques¹⁶²

Au début du XX^{ème} siècle, l’apparition des premiers antituberculeux associée à l’utilisation du vaccin développé par Calmette et Guérin a permis la décroissance progressive du nombre de cas de tuberculose dans les pays développés. Cependant, dans les années 1990, une recrudescence des cas de tuberculose a été observée par l’OMS. Cette recrudescence, s’explique par la co-infection avec le virus du sida, présentée en Figure 116, la paupérisation de la population mondiale ainsi que par la multiplication des formes résistantes aux antibiotiques.

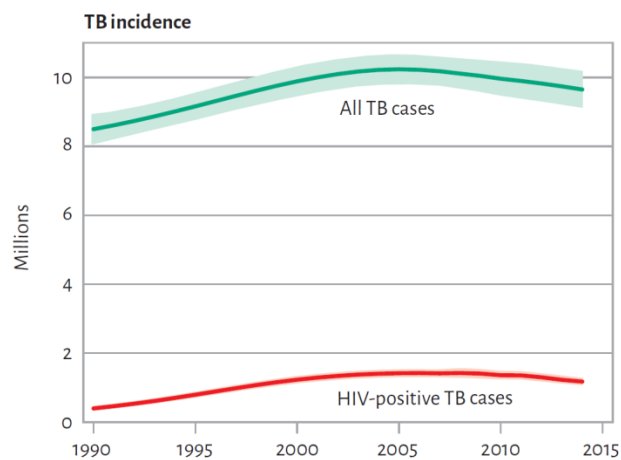


Figure 116 : Evolution de l'incidence de la tuberculose durant ces 25 dernières années pour des personnes séronégatives (courbe verte) et séropositives (courbe rouge)¹⁶²

Comme l’indique la Figure 116, depuis les années 2005, l’incidence de la tuberculose a diminué de 18% avec une baisse annuelle de 1.5% en moyenne^{162, 163}. Ainsi, depuis cette date et jusqu’à ce jour 43 millions de vies ont été sauvées. Ces chiffres, très encourageants, sont le résultat de mesures mises en place par l’OMS et qui s’inscrivent dans la politique adoptée par les Nations Unies ayant pour but de mettre un terme à cette épidémie d’ici 2030.

Cependant, aujourd’hui la tuberculose est encore présente dans tous les pays du monde (Figure 117). Selon l’OMS, 58% des nouveaux cas recensés en 2014 étaient principalement localisés en Asie du Sud-Est ainsi que dans la région du Pacifique occidental. L’Afrique, qui a enregistré 28% des

Chapitre III – Application de l’approche par fragments : conception et synthèse d’inhibiteurs du répresseur transcriptionnel mycobactérien EthR₂ comme nouvelle approche pour traiter la tuberculose

nouveaux cas en 2014, est la région la plus touchée puisqu’elle comptabilise une moyenne de 281 cas pour 100 000 habitants ce qui représente plus du double de la moyenne du nombre de cas observés pour le reste de la population mondiale (133 cas pour 100 000 habitants).

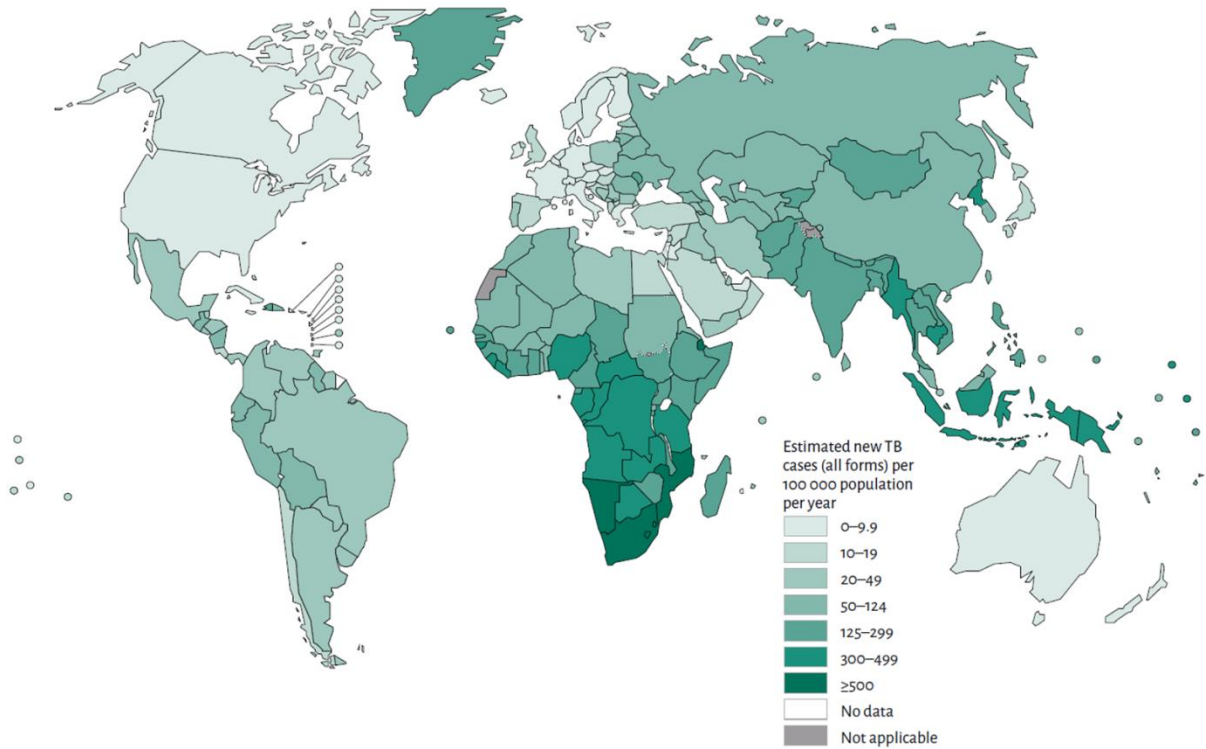


Figure 117 : Répartition par pays du nombre de nouveaux cas de tuberculose estimés en 2014 selon l’OMS¹⁶²

Comme nous l’avons mentionné précédemment, la co-infection avec le virus du sida ainsi que l’apparition de souches résistantes aux antibiotiques constituent des facteurs facilitant le développement de la tuberculose. En 2014, l’OMS estimait que parmi les 9.6 millions de personnes ayant été atteintes par la tuberculose, 12% étaient séropositifs et 480 000 étaient des cas de tuberculose multi-résistante (MDR : *Multi-Drug Resistant*). La majorité des nouveaux cas de tuberculose MDR estimés par l’OMS en 2014 se trouvaient en Russie, Ukraine, Kazakhstan, Ouzbékistan et Kirghizistan (Figure 118).

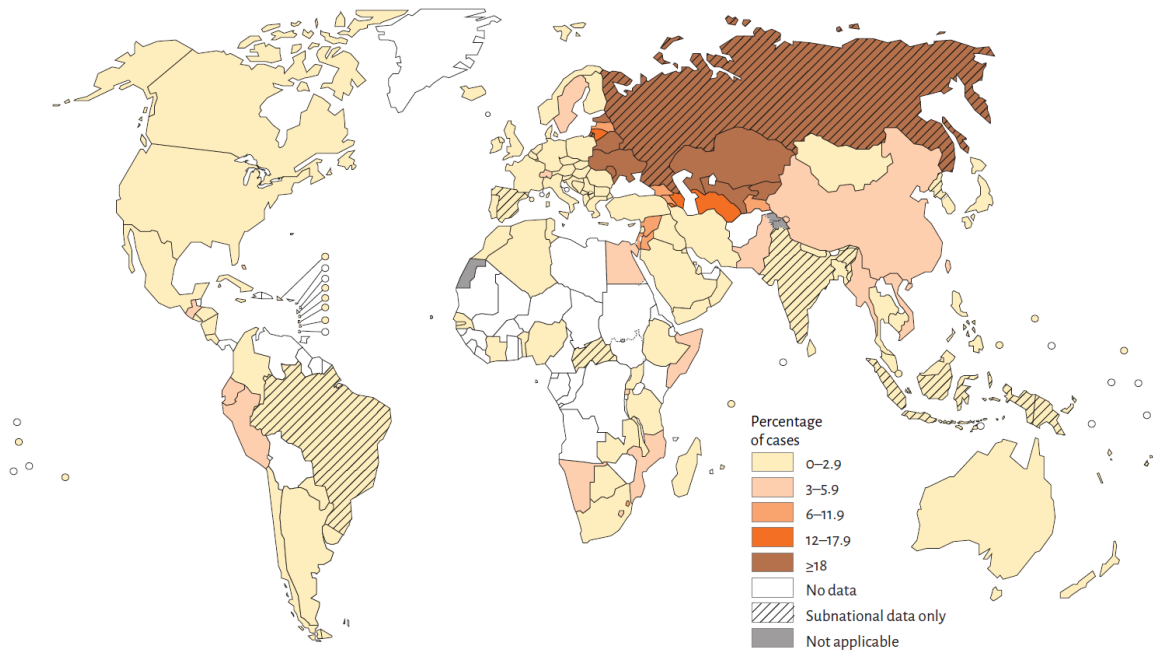


Figure 118 : Répartition des nouveaux cas de tuberculose MDR estimés par l'OMS en 2014¹⁶²

Il existe également une forme de tuberculose extrêmement résistante aux antibiotiques (XDR : *eXtensively-Drug Resistant*). En 2014, 105 pays ont rapporté un cas de tuberculose XDR alors que ce chiffre était de 77 en 2011. Malgré les chiffres de guérison prometteurs observés pour cette maladie infectieuse, la recrudescence du nombre de cas de résistances est un fait qui demeure très alarmant et pour lequel le développement de nouveaux traitements antituberculeux est crucial.

1.1.2. L'agent pathogène : *Mycobacterium tuberculosis*

Cette maladie infectieuse est causée par une bactérie appelée *Mycobacterium tuberculosis*. Appartenant à la famille des mycobactéries, elle a été découverte par Robert Koch en 1882¹⁶⁴ et son génome a été séquencé en 1998¹⁶⁵. Également connue sous le nom de bacille de Koch, en l'honneur de celui qui l'a mise en évidence, cette bactérie a une forme de bâtonnet droit ou légèrement incurvé de 0.2 µm à 0.5 µm de largeur et de 2 µm à 5 µm de longueur (Figure 119).

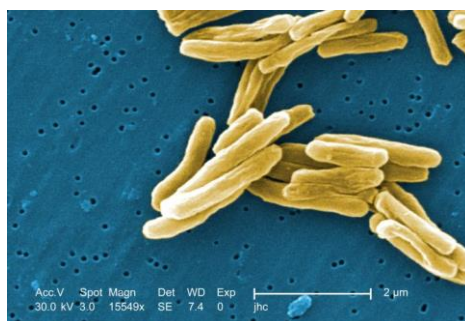


Figure 119 : Structure du bacille de Koch

Ce bacille est composé d’une enveloppe cellulaire renfermant l’ADN bactérien. L’architecture de cette enveloppe, présentée en Figure 120, se compose, de l’intérieur vers l’extérieur, d’une membrane plasmique, d’une paroi cellulaire et d’une capsule¹⁶⁶.

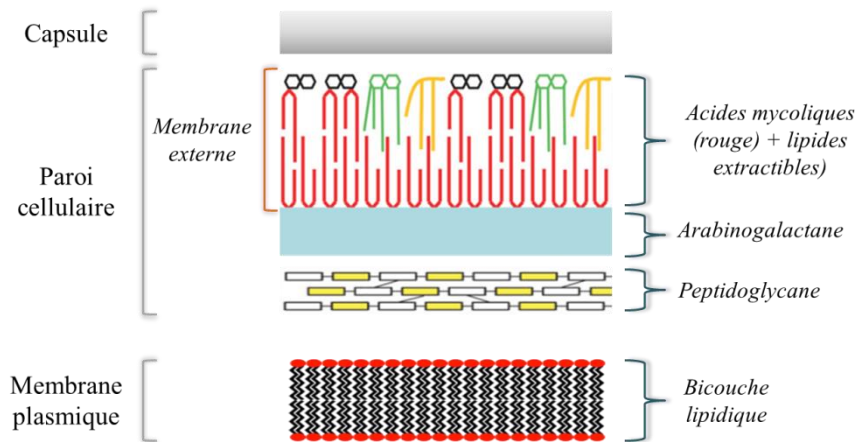


Figure 120 : Architecture de l'enveloppe mycobactérienne composée d'une membrane plasmique, d'une paroi cellulaire et d'une capsule¹⁶⁶

La membrane plasmique est composée de phospholipides, présentant une extrémité hydrophile (Figure 120 point rouge) et deux chaînes d'acides gras (Figure 120 chaînes noires), assemblés en bicouche lipidique. La paroi cellulaire se compose du peptidoglycane assurant la rigidité et la forme des bacilles. Ce peptidoglycane est lié de manière covalente à l'arabinogalactane (biopolymère) qui est estérifié par les acides mycoliques. Une seconde couche de lipides, appelés lipides extractibles (non covalents), se situe au-dessus des acides mycoliques formant avec eux la membrane externe. Le dernier composant de cette enveloppe est la capsule qui est constituée de polysaccharides, de lipides et de protéines. La structure rigide, très épaisse et hydrophobe de cette enveloppe permet de résister à la pression osmotique ainsi qu'aux différents mécanismes de défense mis en place par l'hôte.

En outre, les acides mycoliques (Figure 120 chaînes rouges) jouent un rôle essentiel dans la perméabilité de l'enveloppe bactérienne¹⁶⁷. Principaux composants de la paroi cellulaire, ces acides gras sont une réelle armature empêchant la pénétration d'antibiotiques et contrôlant les transferts de nutriments.

1.1.3. Transmission du bacille de Koch et développement de la tuberculose

La tuberculose est une maladie contagieuse qui affecte les poumons et qui se transmet par voie aérienne. Une fois inhalés sous forme d'aérosols, les bacilles tuberculeux parviennent aux alvéoles pulmonaires de l'organisme hôte. C'est alors qu'intervient la réponse immunitaire spécifique qui consiste à phagocyter les bacilles infectieux grâce aux macrophages alvéolaires. Cependant, les bacilles vont être capables de survivre et de se multiplier au sein des cellules immunitaires. Ainsi, à ce stade de l'infection, trois évolutions sont possibles¹⁶⁸ (Figure 121).

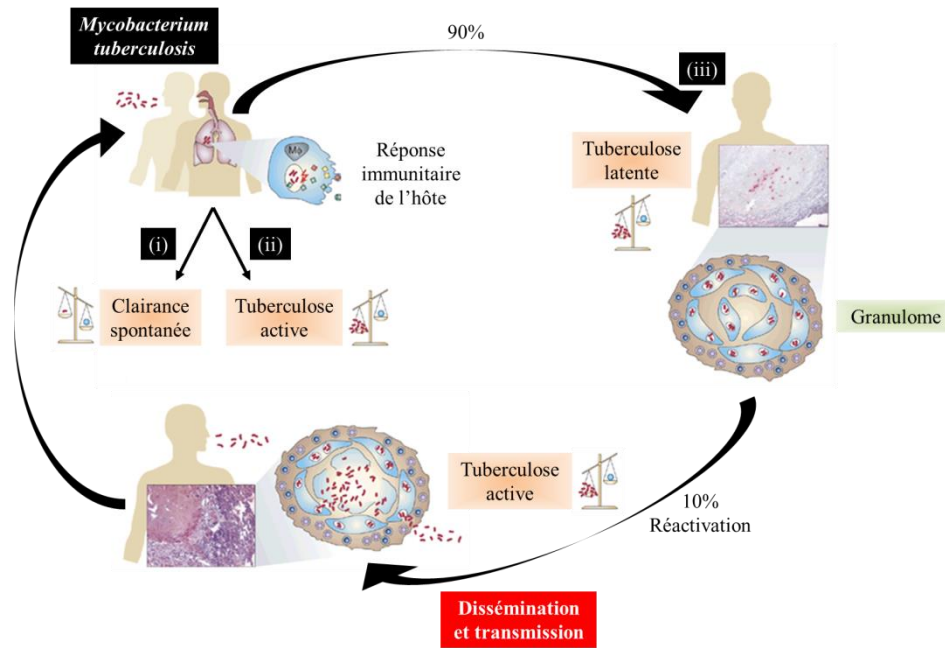


Figure 121 : Cycle d'évolution de l'infection dues à l'agent pathogène *Mycobacterium tuberculosis*¹⁶⁸

(i) la réponse du système immunitaire permet d'éliminer le bacille tuberculeux conduisant à une clairance spontanée. Il s'agit d'une situation extrêmement rare voire inexistante.

(ii) la prolifération du bacille tuberculeux n'est pas contrôlée par le système immunitaire ce qui entraîne l'apparition de la tuberculose dite active, aussi appelée tuberculose-maladie. Cette situation est le plus souvent observée chez des individus dont le système immunitaire est déficient tels que ceux atteints par le virus du sida.

(iii) le système immunitaire est capable de maîtriser l'infection en formant des granulomes qui sont des structures cellulaires constituées de macrophages et entourées de lymphocytes confinant à l'intérieur les bacilles tuberculeux. Cette situation, appelée primo-infection, est observée dans 90% des cas. La tuberculose est dite latente puisque bien que les bacilles soient présents dans l'organisme, l'équilibre établi entre la charge bactérienne et le système immunitaire permet de contrôler la prolifération des bacilles tuberculeux qui sont alors qualifiés de dormants. L'OMS estime qu'un tiers de la population mondiale est aujourd'hui infectée par cette tuberculose latente¹⁶².

La tuberculose latente est non contagieuse et asymptomatique. Dans 10% des cas, un déséquilibre entre la charge bactérienne et le système protecteur de l'individu entraîne le développement de la forme active de la tuberculose, dite tuberculose-maladie. L'âge avancé de l'individu ainsi qu'une immunodépression sont autant de facteurs aggravants qui facilitent cette phase de réactivation. Les bacilles tuberculeux ne sont donc plus contrôlés, leur multiplication est amorcée et la tuberculose-maladie est déclarée. Les personnes atteintes d'une tuberculose-maladie peuvent dès lors transmettre le bacille tuberculeux. Selon l'OMS, une personne malade peut infecter 10 à 15 autres personnes en une année seulement.

Certains symptômes de la tuberculose pulmonaire tels que de la fatigue, de la fièvre et un amaigrissement ne sont pas spécifiques de la maladie. En revanche, une toux persistante, une douleur thoracique et des expectorations teintées de sang constituent des symptômes plus spécifiques et c'est à partir de ces symptômes que le diagnostic de la maladie va être établi. Comme nous l'avons mentionné, les organes les plus exposés à l'agent pathogène sont les poumons. Néanmoins, d'autres

organes peuvent subir une infection par le bacille de Koch tels que les reins, le cerveau (induisant une méningite), la peau, les os et l’intestin. A la différence de la tuberculose pulmonaire, ces formes de tuberculose extra-pulmonaires ne sont pas contagieuses et les symptômes qui y sont associés sont propres à l’organe infecté.

La radiographie des poumons constitue le premier outil pour diagnostiquer une tuberculose pulmonaire. Afin de confirmer ce premier diagnostic, des examens bactériologiques visant à mettre en évidence la présence de mycobactéries sont effectués. Ce type d’examens passe par exemple par le prélèvement et la mise en culture d’expectorations chez des individus suspects. Une fois le diagnostic clairement établi, un antibiogramme est réalisé pour déterminer le traitement adapté.

I.2. Les traitements de première et seconde intentions

La première solution pour lutter contre la tuberculose a consisté en une prévention vaccinale à partir du bacille de Calmette et Guérin utilisée chez le nourrisson pour la première fois en 1921 (vaccin bilié BCG)¹⁶⁹. Même si ce vaccin a montré des résultats intéressants pour la prévention des méningites tuberculeuses chez l’enfant (effet protecteur moyen à hauteur de 80%)^{170, 171}, son efficacité préventive pour la forme pulmonaire chez l’individu adulte s’est révélée être très modeste^{172, 173}. Par ailleurs, l’utilisation de ce vaccin est aujourd’hui très controversée puisqu’en plus de sa faible efficacité, celle-ci est très variable entre les populations vaccinées.

Dès 1944, le premier antibiotique actif contre la tuberculose est découvert. Il s’agit de la streptomycine qui appartient à la classe des aminoglycosides¹⁷⁴ et qui est administrée par voie parentérale.

I.2.1. Traitement de première intention

Dans les vingt années qui ont suivi la découverte de la streptomycine, d’autres antituberculeux administrables par voie orale ont été développés tels que l’isoniazide¹⁷⁵, la rifampicine¹⁷⁶, le pyrazinamide¹⁷⁷ et l’éthambutol¹⁷⁸ (Figure 122).

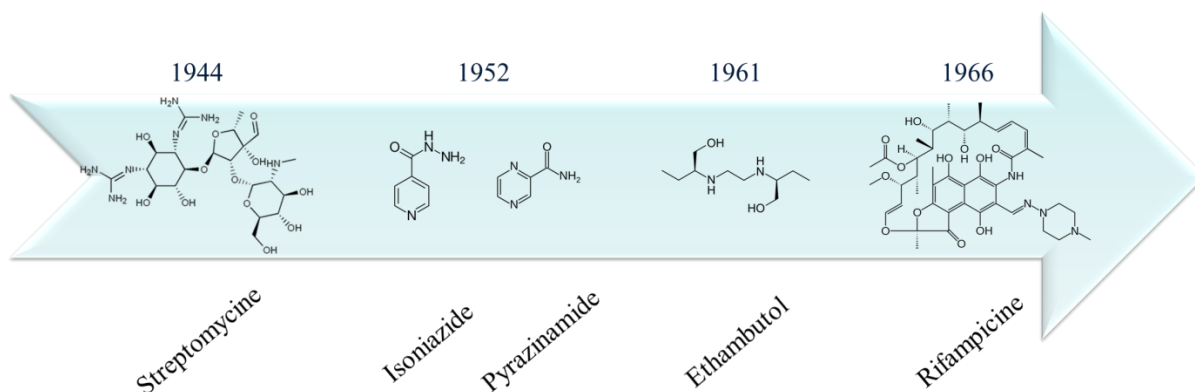


Figure 122 : Frise chronologique de découverte des 5 premiers antituberculeux et structures chimiques associées

Chapitre III – Application de l’approche par fragments : conception et synthèse d’inhibiteurs du répresseur transcriptionnel mycobactérien EthR₂ comme nouvelle approche pour traiter la tuberculose

Le traitement de première intention, prescrit pour une tuberculose pulmonaire non résistante, consiste en un schéma thérapeutique composé de deux phases¹⁶² :

- une première phase, dite intensive, au cours de laquelle un cocktail thérapeutique associant l’isoniazide, la rifampicine, le pyrazinamide et l’éthambutol est administré. Cette phase intensive dure 2 mois.
- la seconde phase, dite de continuation ou consolidation, consiste à utiliser la bithérapie associant l’isoniazide et la rifampicine pendant 4 mois.

Le patient doit faire preuve d’une grande rigueur dans le suivi du traitement pour qu’il soit efficace et capable d’éliminer tous les bacilles. Les 4 antituberculeux utilisés pour ce traitement de première intention ont des modes d’action différents.

Isoniazide (INH) : le mode d’action de l’INH a été découvert dans les années 1970¹⁷⁹. L’INH est une prodrogue bioactivée à l’intérieur de la bactérie par la protéine KatG¹⁸⁰. L’espèce active de l’INH se lie au cofacteur NAD⁺ et forme un adduit NAD-INH. Cet adduit est responsable de l’inhibition d’InhA^{181, 182}, protéine impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques¹⁸³. L’inhibition d’InhA empêche ainsi la synthèse des acides mycoliques, et donc de la paroi bactérienne, entraînant l’élimination du bacille tuberculeux¹⁸⁴.

Pyrazinamide (PZA) : le PZA est également une prodrogue. Une fois entrée dans la bactérie, il est activé en acide pyrazinoïque par la pyrazinamidase. La formation de cet acide à l’intérieur de la bactérie provoque une acidification du milieu intracellulaire inhibant ainsi des enzymes ayant un rôle primordial pour la bactérie¹⁸⁵.

Ethambutol (EMB) : découvert tardivement, son mode d’action consiste à empêcher la biosynthèse de l’arabinogalactane¹⁸⁶ qui est l’un des composants de la paroi bactérienne (Figure 120).

Rifampicine (RIF) : la RIF est un inhibiteur de l’ARN polymérase bactérienne¹⁸⁷. Cet inhibiteur est le seul antibiotique capable d’agir sur la tuberculose latente et d’avoir une activité bactéricide sur les bacilles dormants. C’est justement pour cette raison qu’il est utilisé durant les 6 mois de traitement afin d’éradiquer tous les bacilles tuberculeux dormants.

L’observance optimale de ce traitement permet de soigner en moyenne 86% des individus infectés par une tuberculose sensible¹⁸⁸. Cependant, ce traitement est souvent associé à des effets secondaires graves ce qui complique son observance par le patient. Le non suivi du traitement ou son abandon favorise l’émergence de bacilles résistants. Une tuberculose MDR est alors caractérisée par une résistance à la rifampicine et à l’isoniazide. Pour traiter ces souches MDR, d’autres antituberculeux ont été développés.

1.2.2. Traitements de seconde intention

Les souches résistantes de la tuberculose résultent de l’apparition de mutations survenant au niveau des gènes du bacille de Koch lui permettant d’échapper à l’action des antibiotiques. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce phénomène de résistance : (i) il peut y avoir mutation au niveau du gène cible ce qui conduit à une perte d’affinité de l’antibiotique pour la protéine de la bactérie¹⁸⁹, (ii) il peut y avoir mutation dans l’opéron du gène cible entraînant ainsi une surproduction de la protéine

Chapitre III – Application de l’approche par fragments : conception et synthèse d’inhibiteurs du répresseur transcriptionnel mycobactérien EthR₂ comme nouvelle approche pour traiter la tuberculose

ce qui entraîne une titration de l’antibiotique¹⁹⁰, (iii) il peut y avoir également expression de pompes d’efflux capables d’expulser l’antibiotique hors de la bactérie¹⁹¹.

Comme nous l’avons vu précédemment, l’inobservance du traitement de première intention peut entraîner l’apparition de souches résistantes. La tuberculose pulmonaire pouvant se transmettre par voie aérienne, un individu peut contracter une forme résistante de tuberculose par contact avec un autre individu infecté par cette souche résistante. Les traitements de seconde intention, prescrits contre les souches MDR, consistent en l’administration de 5 à 7 antibiotiques, sur une durée minimale de 20 mois, réunis dans différents groupes thérapeutiques¹⁶².

Groupe I : le PZA et l’EMB, utilisés pour le traitement de première intention, constituent cette première catégorie.

Groupe II : 3 composés injectables, appartenant à la famille des aminoglycosides, sont présents dans cette catégorie : la kanamycine, l’amikacine, et la capréomycine. Ces composés permettent d’inhiber la synthèse protéique en empêchant la traduction de l’ARN du bacille tuberculeux.

Groupe III : 3 structures principales, appartenant à la famille des fluoroquinolones, sont rassemblées dans cette catégorie : la levofloxacinine, la moxifloxacinine et l’ofloxacinine.

Groupe IV : cette dernière catégorie comprend des structures capables d’inhiber la croissance et la reproduction des bactéries. Ces composés, actifs par voie orale, correspondent à l’acide para-aminosalicylique, la cycloserine et la térazidone ainsi que les thioamides tels que l’éthionamide et le prothionamide.

Associés aux antituberculeux de première intention (le PZA et l’EMB), l’OMS recommande que les patients infectés par une tuberculose MDR reçoivent au moins un médicament injectable du groupe II, une fluoroquinolone du groupe III et un des antibiotiques du groupe IV. Les composés utilisés dans les traitements de première et de seconde intention ont tous été découverts dans les années 1950 et 1960. En plus des durées de traitement longs et des effets secondaires lourds associés à ces polythérapies¹⁹², l’utilisation prolongée depuis près de 50 ans du même arsenal thérapeutique a entraîné, à l’échelle mondiale, l’apparition de souches extrêmement résistantes XDR, insensibles aux différents cocktails décrits précédemment. Une souche XDR est une souche MDR qui résiste en plus aux fluoroquinolones (composés du groupe III) et aux aminoglycosides (composés du groupe II). Le développement de nouveaux antituberculeux capables d’être actifs sur ces souches résistantes de tuberculose est donc devenu crucial.

Deux nouveaux antituberculeux ont eu récemment leur autorisation de mise sur le marché pour le traitement de souches résistantes : bédaquiline en 2012¹⁹³ et délamanide en 2014¹⁹⁴ (Figure 123). Ces deux composés ont des modes d’action différents puisque bédaquiline inhibe l’ATP synthase de la mycobactérie tandis que délamanide inhibe la synthèse des acides mycoliques.

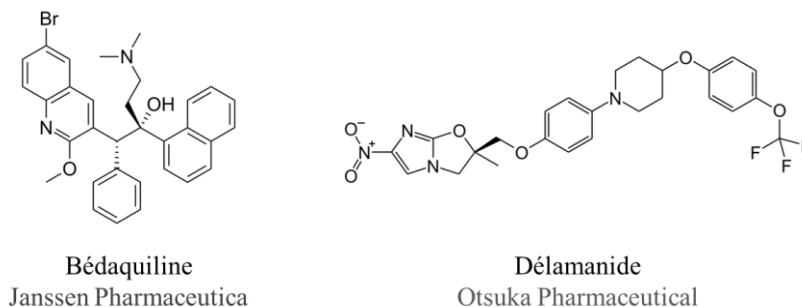


Figure 123 : Structures de bédaquiline et délamanide

Une dizaine de composés sont actuellement en phases cliniques pour lutter contre les souches résistantes de *Mycobacterium tuberculosis*¹⁹⁵⁻¹⁹⁸. Une alternative au développement de nouveaux antituberculeux consiste à potentialiser l’activité d’un médicament déjà existant. Cette stratégie permettrait d’administrer le médicament à des doses moins conséquentes diminuant ainsi les effets secondaires ce qui conduirait à une meilleure observance.

I.3. L’approche par potentialisation de médicaments existants

Il existe actuellement deux types d’antituberculeux : ceux qui ciblent une protéine essentielle de la mycobactérie et les prodrogues qui nécessitent d’être bioactivées par la bactérie pour acquérir leur pouvoir antibactérien. C’est le cas de l’isoniazide, de l’éthionamide et du pyrazinamide. Le processus de bioactivation de l’éthionamide a été établi dans les années 2000 par l’un de nos collaborateurs, Alain Baulard, et a permis de mettre en évidence une cible thérapeutique intéressante pour booster l’activité de l’éthionamide¹⁹⁹.

I.3.1. Ethionamide : une prodrogue au centre de cette stratégie de potentialisation

L’éthionamide (ETH) est donc une prodrogue qui est utilisée pour lutter contre les souches MDR de la tuberculose. Une fois à l’intérieur de la bactérie, il a été montré que la monooxygénase EthA de type Baeyer-Villiger bioactive l’éthionamide^{199, 200} par une réaction d’oxydation. Cette bioactivation conduit alors à la formation d’un adduit NAD-ETH capable d’inhiber la protéine InhA²⁰¹ et ainsi d’empêcher la synthèse des acides mycoliques. La cascade de bioactivation de l’éthionamide est présentée en Figure 124.

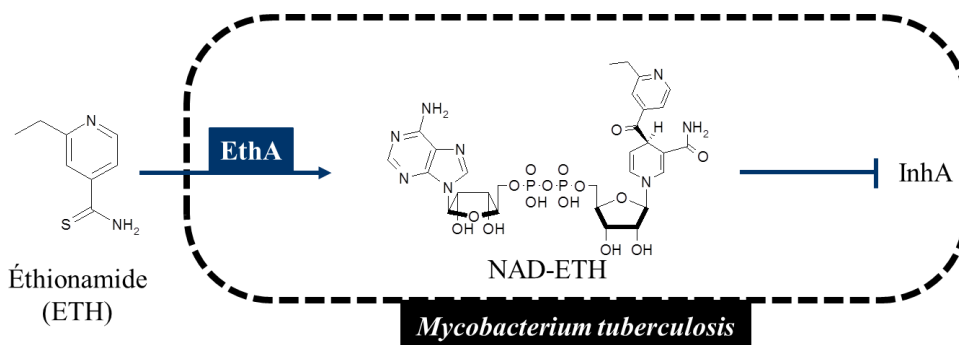


Figure 124 : Cascade de bioactivation de la prodrogue éthionamide conduisant à la formation de l'adduit NAD-ETH capable d'inhiber la protéine InhA impliquée dans la synthèse des acides mycoliques

En parallèle de la découverte du gène *ethA*, un second gène, nommé *ethR*, a été identifié. Ce gène code pour le régulateur transcriptionnel EthR qui contrôle la production de la protéine EthA. En effet, il a été montré qu'une surexpression du gène *ethR* diminue l'expression d'*ethA* et rend la bactérie résistante à l'éthionamide. Inversement, les souches dépourvues du gène *ethR* surproduisent la protéine EthA ce qui entraîne une hypersensibilité de la bactérie à l'éthionamide^{199, 200}.

La protéine EthR appartient aux répresseurs transcriptionnels de la famille TetR dont le rôle consiste à réguler la transcription de certains gènes en se fixant sur leur promoteur. Il a en effet été mis en évidence que la protéine EthR se lie sur le promoteur du gène *ethA* inhibant sa transcription et empêchant ainsi la production de la protéine EthA, capitale pour bioactiver l'éthionamide²⁰². La stratégie envisagée pour booster l'activité de l'éthionamide a donc consisté à développer des inhibiteurs de la protéine EthR afin d'augmenter la production d'EthA et ainsi la bioactivation de l'éthionamide (Figure 125)^{203, 204}.

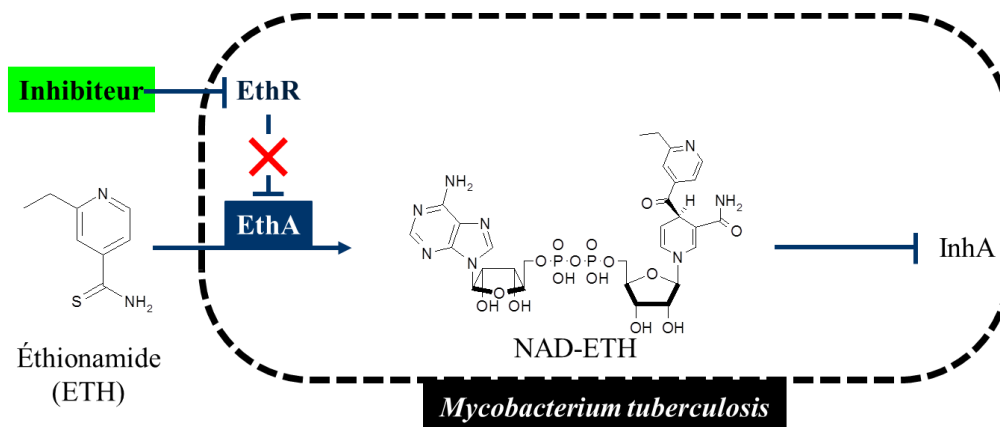


Figure 125 : Stratégie utilisée pour potentialiser l'activité antituberculeuse de l'éthionamide en développant des composés capables d'inhiber le répresseur transcriptionnel EthR

1.3.2. Développement d'inhibiteurs de la protéine EthR et preuve de concept de cette stratégie de potentialisation

Différentes approches ont été utilisées au laboratoire pour développer des inhibiteurs du répresseur transcriptionnel EthR. Parmi elles, deux approches vont être décrites : l'une basée sur le design rationnel d'un modèle de ligand idéal à partir de la structure cristallographique et l'autre basée

Chapitre III – Application de l’approche par fragments : conception et synthèse d’inhibiteurs du répresseur transcriptionnel mycobactérien EthR₂ comme nouvelle approche pour traiter la tuberculose

sur une approche par fragments. Les composés impliqués dans ces deux approches ont été évalués selon 3 tests :

- un test *in vitro*, le Thermal Shift Assay (TSA) utilisé pour déterminer l’affinité du composé pour la protéine EthR. Ce test permet d’aboutir à une différence de températures de dénaturation de la protéine avec et sans ligand (noté ΔT_m). Plus cette valeur est élevée, plus le composé est capable de thermostabiliser la protéine et donc plus il est affiné pour la protéine (cette technique sera détaillée dans la partie II.2.1.).
- un test fonctionnel basé sur la Résonance Plasmonique de Surface (RPS), permettant d’observer et de quantifier les phénomènes d’association et de dissociation de la protéine EthR avec l’ADN ainsi que l’aptitude du composé à empêcher cette fixation. Le composé est testé à différentes concentrations permettant d’obtenir une IC₅₀ : plus celle-ci est faible, meilleure est la capacité du composé à empêcher la fixation d’EthR à l’ADN.
- un test phénotypique sur des macrophages infectés par *M. tuberculosis*, afin de mesurer la puissance du composé à booster 10 fois l’activité de l’éthionamide. L’EC₅₀ obtenue à l’issue de ce test doit être la plus faible possible traduisant une puissance élevée du composé.

I.3.2.1. Approche rationnelle basée sur la construction d’un pharmacophore

La première approche a consisté à établir un modèle de pharmacophore à partir de la structure cristallographique de la protéine EthR^{203, 204}. Ceci a permis l’identification d’un premier ligand d’EthR (BDM14500) qui a ensuite été optimisé afin d’améliorer ses propriétés physico-chimiques, pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Ce travail a abouti au composé BDM41906, affiné pour la protéine EthR ($\Delta T_m = 10.3$ °C), capable d’empêcher la fixation d’EthR à son opérateur ADN (IC₅₀ = 0.6 μ M) et de booster d’un facteur 10 l’activité de l’éthionamide sur des macrophages infectés par *Mycobacterium tuberculosis* (EC₅₀ = 0.06 μ M)^{55, 205, 206} (Figure 126).

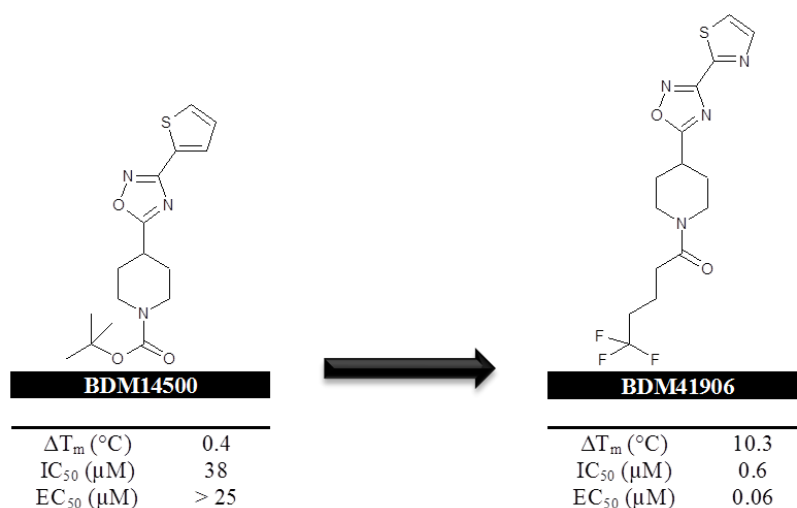


Figure 126 : Optimisations réalisées à partir du composé BDM14500 pour aboutir au composé BDM41906^{55, 205}

Une étude *in vivo* consistant en l’administration orale de BDM41906 (20 mg.kg⁻¹ par jour) pendant 4 semaines avec différentes doses d’éthionamide chez la souris infectée par *Mycobacterium tuberculosis* a été réalisée. Les résultats obtenus indiquent que quelle que soit la dose d’éthionamide utilisée, un effet boost du composé est toujours observé. De façon très intéressante, la combinaison de

Chapitre III – Application de l’approche par fragments : conception et synthèse d’inhibiteurs du répresseur transcriptionnel mycobactérien EthR₂ comme nouvelle approche pour traiter la tuberculose

BDM41906 (20 mg.kg⁻¹) avec l’éthionamide (12.5 mg.kg⁻¹) s’est révélée être aussi active que l’administration d’éthionamide seul à 50 mg.kg⁻¹ caractérisant une potentialisation de l’antituberculeux d’un facteur 4 *in vivo*.

Conformément à nos attentes, cette stratégie de potentialisation de l’éthionamide, en administrant un inhibiteur du répresseur transcriptionnel EthR, permet de diminuer les doses habituellement utilisées pour l’éthionamide seul ce qui devrait permettre de diminuer les effets secondaires de type hépatique couramment observés avec cet antibiotique.

I.3.2.2. Approche basée sur l’utilisation de fragments

Au cours de la recherche de nouveaux inhibiteurs de la protéine EthR²⁰⁷, le composé BDM15048 a été cocrystallisé avec la protéine (Figure 127).

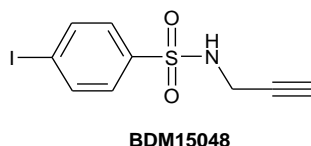


Figure 127 : Structure du composé BDM15048

Ce composé BDM15048 présente 14 atomes lourds, un nombre d’atomes donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène inférieur à 3, une lipophilie inférieure à 3 (clogP < 3) et un nombre de liaisons à libre rotation inférieur à 3. Il peut donc être considéré comme un fragment et de par la présence de groupements fonctionnalisables, ce composé constitue le point de départ idéal pour développer une optimisation rationnelle⁷⁷. Du fait de sa faible taille, son aptitude à empêcher la fixation d’EthR à son opérateur ADN est très faible (IC₅₀ = 160 μM) et aucune activité de potentialisation de l’éthionamide n’a été observée (EC₅₀ > 20 μM). L’optimisation de ce composé a été effectuée selon une stratégie de *fragment-growing* consistant à ajouter des groupements sur ce fragment de manière à améliorer son activité (Figure 128).

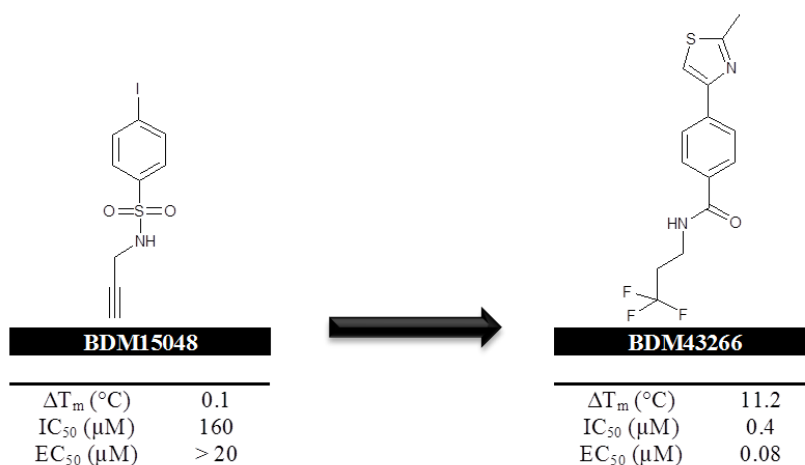


Figure 128 : Optimisation du fragment BDM15048 selon une stratégie de *fragment-growing* pour aboutir au composé BDM43266

Cette approche d’optimisation à partir d’un fragment a permis d’aboutir au composé BDM43266 capable de potentialiser d’un facteur 10 l’activité de l’éthionamide à une concentration de l’ordre de la dizaine de nanomolaire ($EC_{50} = 0.08 \mu M$)⁷⁷.

Au cours des différents travaux réalisés pour identifier des inhibiteurs d’EthR, il a été montré qu’il y avait une bonne corrélation entre l’activité de potentialisation de l’éthionamide sur bactéries (pEC_{50}) et l’affinité des composés pour EthR (ΔT_m). Cette corrélation est représentée en Figure 129.

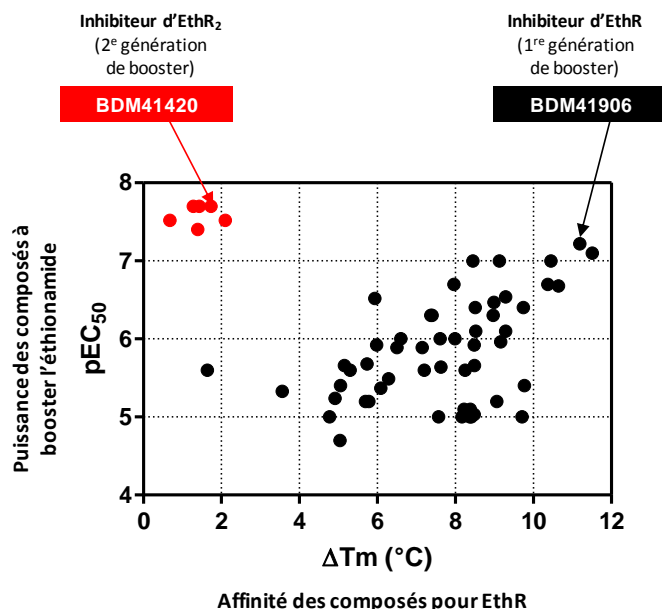


Figure 129 : Corrélation entre l'affinité des composés pour la protéine EthR (ΔT_m), et la capacité des composés à potentialiser d'un facteur 10 l'activité bactéricide de l'éthionamide (pEC_{50})

De façon surprenante, une famille de composés, représentée par des points rouges sur la Figure 129 et dont le chef de file est le composé BDM41420, a montré une faible affinité pour la protéine EthR (TSA) mais un effet boost de l’éthionamide d’un facteur 10 à des concentrations en composés de l’ordre de la centaine de nanomolaire. Par ailleurs, administrés seuls, les composés de cette famille ne présentaient pas d’activité bactéricide. Ce résultat a mis en avant le fait que ces composés se comportaient bien comme des boosters de l’éthionamide sans pour autant inhiber EthR. Le composé BDM41420 a par la suite été évalué sur le test RPS ce qui a permis d’observer que la fixation d’EthR à l’ADN n’était pas inhibée en présence de ce composé. Ce résultat a suggéré que le composé BDM41420 induisait le déclenchement d’une autre potentielle voie de bioactivation de l’éthionamide indépendante du répresseur transcriptionnel EthR.

II. Découverte d’un nouveau répresseur transcriptionnel

Suite aux observations inattendues présentées précédemment, différentes expériences ont été réalisées avec le composé BDM41420 afin de confirmer l’existence d’une éventuelle voie de bioactivation de l’éthionamide.

II.1. EthR₂ : une nouvelle cible pour lever la résistance à l’éthionamide

II.1.1. EthR₂/EthA₂ : une nouvelle voie éventuelle de bioactivation de l’éthionamide

L’impact du composé BDM41420 sur le transcriptome de la mycobactérie a alors été étudié et nous avons comparé ces résultats avec ceux générés en présence du composé BDM41906, connu pour inhiber le répresseur EthR. Comme attendu, lorsque la culture bactérienne est traitée avec le composé BDM41906, une surexpression des gènes *ethA* et *ethR* a pu être observée. En revanche, le traitement avec le composé BDM41420 s’accompagne d’une faible surexpression des gènes *ethA* et *ethR* mais surtout d’une très nette surexpression de deux nouveaux gènes, *ethA*₂ et *ethR*₂. L’analyse des banques de données du génome de *M. tuberculosis* a révélé une analogie entre *ethA/ethR* et *ethA*₂/*ethR*₂ : la protéine EthA₂, codée par le gène *ethA*₂, est une oxydoréductase tandis que la protéine EthR₂, codée par le gène *ethR*₂, est un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille TetR. Ces observations suggèrent que le déclenchement de l’expression du gène *ethA*₂ via l’inhibition d’EthR₂ par le composé BDM41420, fonctionnerait de la même manière que dans le cas du trio BDM41906/EthR/EthA. Nous faisons donc l’hypothèse, qui n’a pas encore été confirmée, que l’oxydoréductase EthA₂, dont la production est sous contrôle du répresseur EthR₂, est impliquée dans la bioactivation de l’éthionamide.

Pour vérifier que la protéine EthR₂ est bien la cible du composé BDM41420, la protéine a été produite puis nous avons testé les composés BDM41420 et BDM41906 en utilisant les techniques de TSA, afin d’évaluer l’affinité de ces composés pour la protéine (cette technique est détaillée dans la partie II.2.1.), et de RPS, afin d’évaluer l’aptitude des composés à empêcher la fixation d’EthR₂ sur son opérateur ADN. Les résultats de ces expériences sont présentés en Figure 130.

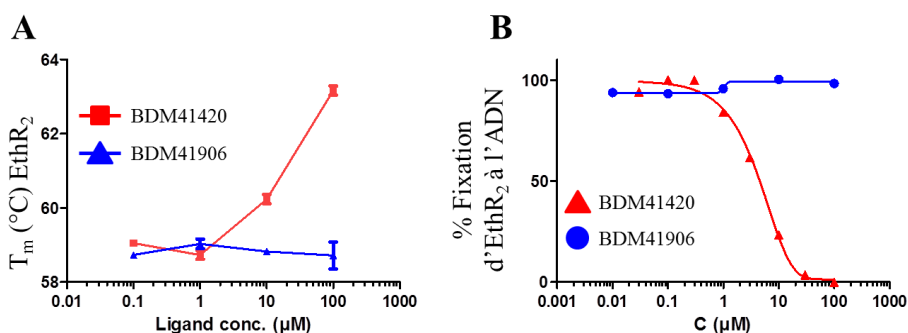


Figure 130 : A. Évaluation de l’affinité des composés BDM41420 et BDM41906 pour la protéine EthR₂ par TSA
B. Évaluation de l’aptitude des composés BDM41420 et BDM41906 à inhiber la fixation d’EthR₂ à l’ADN par RPS

Comme l’indique le résultat de la Figure 130A, la température de dénaturation de la protéine EthR₂, notée T_m, augmente avec la concentration du composé BDM41420 (Figure 130A courbe rouge) traduisant ainsi la capacité de ce composé à stabiliser la protéine et donc à se lier à celle-ci. Comme attendu, aucune stabilisation n’est observée avec le composé BDM41906 montrant qu’il n’a pas d’affinité pour la protéine EthR₂ (Figure 130A courbe bleue). De plus, par RPS (Figure 130B), un effet dose-réponse est observé pour le composé BDM41420 indiquant sa capacité à inhiber la fixation d’EthR₂ à l’ADN tandis qu’aucune inhibition n’est constatée pour le composé BDM41906 (Figure 130B courbe rouge vs courbe bleue).

L’ensemble de ces résultats confirme que le composé BDM41420 est bien un ligand du répresseur transcriptionnel EthR₂ capable d’inhiber sa fixation à l’ADN. Ainsi la transcription du gène *ethA*₂ est possible et l’activité de l’éthionamide est alors potentialisée.

II.1.2. Intérêt du réveil des gènes *ethR*₂/*ethA*₂

L’intérêt primordial de la découverte de l’activation du gène *ethA*₂ par l’intermédiaire de l’inhibition d’EthR₂ est que cela permet de lever la résistance à l’éthionamide observée pour certaines souches de *M. tuberculosis*. Les deux principales résistances à l’éthionamide sont dues à des mutations survenant au niveau du gène *inhA* ou du gène *ethA*²⁰⁸. Le gène *inhA* code pour la protéine InhA qui est impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques¹⁸³ et qui est la cible de l’éthionamide. Selon une étude, 62% des souches cliniques résistantes à l’éthionamide possèdent des mutations dans le gène *inhA*²⁰⁹. La principale d’entre elles correspond à la mutation c-15t qui se déclare dans la région promotrice du gène. Celle-ci a pour conséquence d’augmenter le taux d’ARN messagers d’*inhA* de 20 fois entraînant une surproduction de la protéine InhA ce qui augmente la CMI de l’éthionamide d’un facteur 8²¹⁰. Ainsi, dans ce cas de mutation, potentialiser l’activité bactéricide de l’éthionamide en développant des inhibiteurs d’EthR ou d’EthR₂ permettrait de compenser cette résistance.

Lorsque les mutations se produisent dans le gène *ethA*, l’éthionamide ne peut plus être bioactivé ce qui le rend inefficace contre la maladie. Dans ce cas, la découverte d’une voie alternative de bioactivation de l’éthionamide, indépendante de la monooxygénase EthA, permettrait de contourner les résistances dues à ce type de mutations. Cette stratégie est présentée en Figure 131.

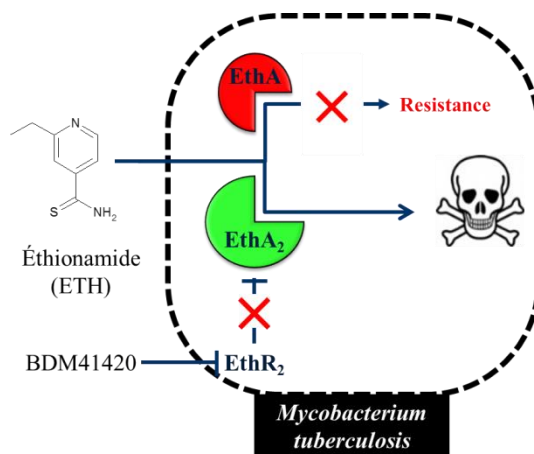


Figure 131 : Action supposée d’EthA₂ dans la bioactivation de l’éthionamide permettant de contourner les résistances liées à des mutations survenant dans le gène *ethA*

Afin de confirmer l’intérêt de cette nouvelle voie de bioactivation dans la lutte contre la tuberculose, 3 souches cliniques de tuberculose MDR isolées et mutées dans *ethA* ont chacune été traitées de trois manières différentes : avec l’éthionamide seul, avec une co-administration ETH+BDM41906 (inhibiteur d’EthR) et avec une co-administration ETH+BDM41420 (inhibiteur d’EthR₂). Pour chacun des traitements, les CMI de l’éthionamide ont été mesurées. Les résultats sont présentés dans Tableau 38.

Souches MDR-TB (mutées dans <i>ethA</i>)	CMI (µg.mL ⁻¹)		
	ETH	ETH	ETH
		+	+
		BDM41906	BDM41420
B1	> 256	> 64	0.5
B2	> 256	> 64	0.5
B3	> 256	32	0.25

Tableau 38 : CMI de l'éthionamide obtenues sur 3 souches de tuberculose MDR présentant une mutation dans le gène *ethA* selon un traitement utilisant l'éthionamide (ETH) seul ou co-administré avec le composé BDM41906 (inhibiteur d'EthR) ou co-administré avec le composé BDM41420 (inhibiteur d'EthR₂)

Comme attendu, les CMI de l'éthionamide administré seul ou co-administré avec le composé BDM41906 (inhibiteur d'EthR) sur ces souches de tuberculose MDR mutées dans le gène *ethA* sont très élevées. En effet, à cause des mutations dans *ethA*, l'éthionamide n'est plus bioactivé ce qui explique les résistances observées. En revanche, la co-administration de l'éthionamide avec le composé BDM41420 permet de lever cette résistance à l'éthionamide et ainsi obtenir des CMI comprises entre 0.25 µg.mL⁻¹ et 0.5 µg.mL⁻¹ pour les 3 souches cliniques considérées.

Ainsi, du fait de l'intérêt du répresseur transcriptionnel EthR₂, nous avons décidé d'identifier de nouveaux inhibiteurs de cette protéine selon une approche par fragments.

II.2. Criblage d'une librairie de fragments par Thermal Shift Assay sur EthR₂

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, l'approche par fragments consiste à cribler une librairie de petites molécules respectant la règle des 3 avec notamment une masse molaire inférieure à 300 g.mol⁻¹. Après avoir identifié un ou plusieurs hits fragments présentant une faible activité mais un mode de liaison à la cible thérapeutique dit efficace, ils sont optimisés en composé lead. Pour identifier de nouveaux inhibiteurs du répresseur transcriptionnel EthR₂, nous avons utilisé notre librairie de fragments commerciaux et issus de nos synthèses que nous avons reformatée pour conserver 960 fragments solubles à 100 mM dans le DMSO. Cette librairie a ensuite été criblée sur EthR₂ par la technique du *Thermal Shift Assay* (TSA).

II.2.1. Principe du Thermal Shift Assay (TSA)

Le test TSA est basé sur le phénomène de dénaturation de protéines. Un marqueur fluorescent, généralement le Sypro orangeTM, est utilisé (Figure 132A bille jaune). Ce marqueur est capable de se fixer de façon non spécifique à des surfaces hydrophobes ce qui a pour conséquence d'amplifier son signal de fluorescence. Sous l'action de la chaleur, la protéine se dénature et ses régions hydrophobes deviennent accessibles au marqueur. Nous pouvons ainsi déterminer la température, notée T_m, à laquelle la protéine est dénaturée à 50%. Ce test est présenté en Figure 132A.

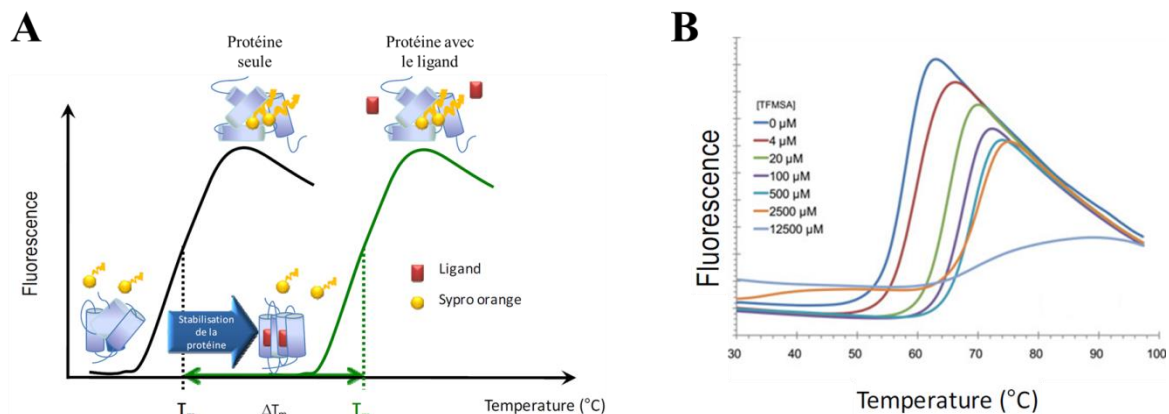


Figure 132 : A. Principe du fonctionnement du TSA
B. Expériences TSA effectuées à différentes concentrations de ligand

Cet outil permet de renseigner sur la capacité d’un ligand à stabiliser une protéine. Pour ce faire, et après avoir déterminé le T_m de la protéine seule, on réalise la même expérience en ajoutant le ligand au mélange protéine/marqueur (Figure 132A cube rouge). On obtient alors une nouvelle température de dénaturation et en la comparant à celle de la protéine seule, on peut déterminer un écart de température, noté ΔT_m (Figure 132A). L’affinité du ligand pour la protéine étant liée à sa capacité à stabiliser la protéine, plus le ΔT_m est élevé, meilleure est l’affinité du ligand pour la protéine.

Un effet dose réponse peut être observé avec cette technique en appliquant des concentrations croissantes en ligand. Ainsi, cette augmentation de concentration en ligand s’accompagne d’une augmentation de la température de dénaturation de la protéine ce qui se traduit par une meilleure capacité du ligand à stabiliser la protéine (Figure 132B). Cet outil, rapide et haut débit, a été utilisé pour cribler la librairie de 960 fragments sur le répresseur transcriptionnel EthR₂.

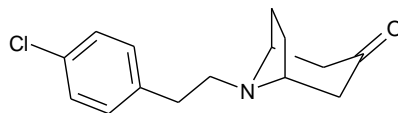
II.2.2. Criblage par TSA de la librairie de fragments sur EthR₂

Les 960 fragments ont été testés à une concentration de 1 mM sur EthR₂. 50 composés présentant un ΔT_m supérieur à 2 °C ont été sélectionnés. Ces composés ont été confirmés par des expériences de dose-réponse en utilisant la même technique TSA. 12 composés ont montré une stabilisation dose dépendante de la protéine EthR₂. La capacité de ces 12 composés à empêcher la fixation d’EthR₂ à l’ADN a été évaluée au moyen d’un test basé sur l’utilisation d’un gène rapporteur dans des cellules embryonnaires HEK-293. La caractéristique de ce test, développé par la société BioVersys, est d’observer la production d’une phosphatase sous le contrôle d’EthR₂²¹¹.

II.3. Identification d’un hit et mode de liaison du composé à EthR₂

II.3.1. Identification d’un hit capable d’empêcher la fixation d’EthR₂ à son l’opérateur ADN

Les 12 composés ont été évalués dans ce test cellulaire et le composé **198**, capable d’inhiber l’interaction EthR₂/ADN avec une IC₅₀ de 0.95 µM, a été identifié. Ce composé **198** à une concentration de 20 µM a montré un ΔT_m de 0.5 °C dans le test TSA. Il possède un noyau 8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one, couramment appelé tropinone (Figure 133).



198
ΔT_m = 0.5 °C - IC₅₀ = 0.95 µM

Figure 133 : Structure du hit identifié **198** à l’issue du criblage de la librairie des 960 fragments effectué sur la protéine EthR₂

Une expérience de « soaking » entre ce composé **198** et la protéine EthR₂ a été effectuée (Figure 134). Les cristaux ainsi obtenus ont été diffractés aux rayons X pour déterminer le mode de liaison du composé à EthR₂. Comme pour la protéine EthR et la grande majorité des répresseurs de la famille TetR, EthR₂ se trouve sous une forme homodimérique. On distingue deux régions dans la structure tridimensionnelle d’EthR₂ (Figure 134A) :

- le domaine HTH (Helix-Turn-Helix), qui est responsable de la fixation à l’opérateur ADN.
- le reste des hélices forme le domaine de régulation. Cette région est celle où un ligand peut venir se lier afin d’empêcher la liaison du domaine HTH au promoteur du gène *ethA*₂ entraînant ainsi sa transcription²¹².

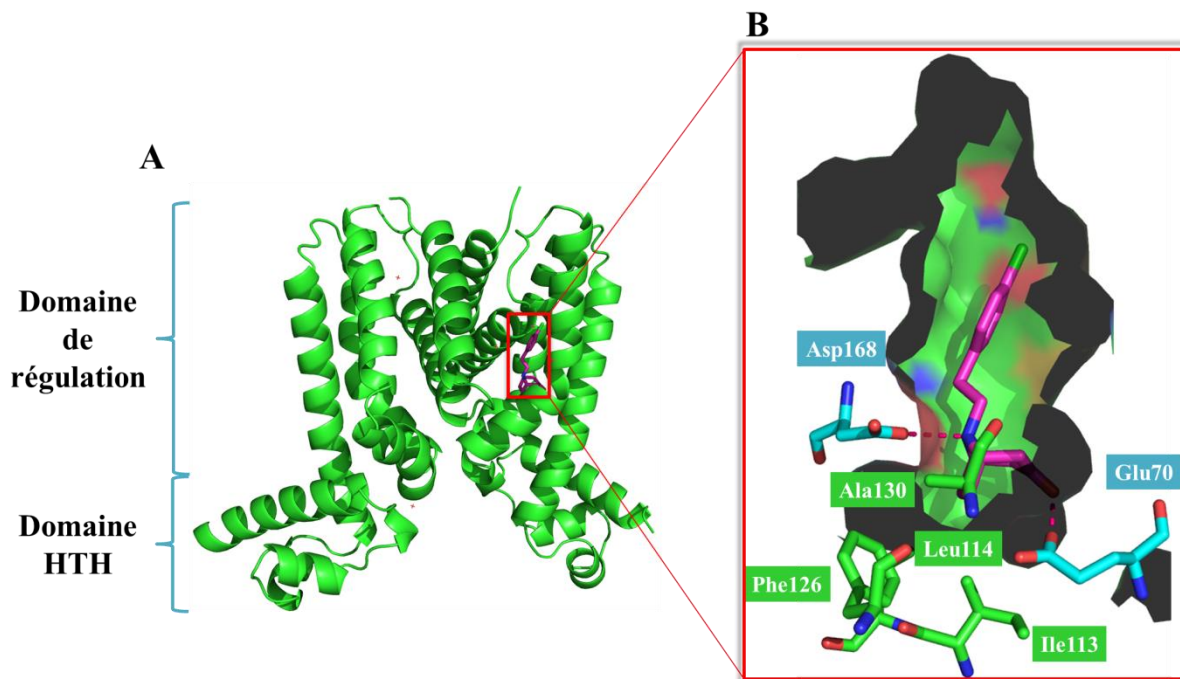


Figure 134 : A. Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine EthR₂ sous sa forme homodimérique
B. Mode de liaison du composé **198** avec EthR₂ obtenu par « soaking »

La liaison de **198** avec EthR₂ révèle deux interactions polaires dans le domaine de régulation (Figure 134B) : une liaison ionique entre l’atome d’azote de la tropinone et le résidu Asp168 et une

liaison hydrogène entre la fonction cétone de ce même hétérocycle et le résidu Glu70. Le reste de la poche est essentiellement constitué de résidus hydrophobes et le pont du cycle tropinone vient occuper la poche hydrophobe délimitée par les résidus Ile113, Leu114, Phe126 et Ala130. Guidée par cette structure cristallographique, différentes pharmaco-modulations ont été envisagées afin d’optimiser l’activité inhibitrice du hit **198**.

II.3.2. Stratégies d’optimisation envisagées à partir de la structure cristallographique

Ces stratégies d’optimisation ont concerné différentes régions du composé **198** (Figure 135). D’abord, des modifications autour du noyau aromatique ont été effectuées. Par ailleurs, la structure cristallographique révèle la présence de deux résidus polaires, la sérine 134 et la thréonine 138, dans la région où se trouve le groupement 4-chlorophényle. Il a donc été envisagé d’introduire des accepteurs de liaisons hydrogène au niveau du cycle aromatique. De plus, l’ajout d’un chaînon méthylénique sur la chaîne carbonée a été effectué afin d’occuper plus efficacement le haut hydrophobe de la poche. Enfin, l’importance de l’aromaticité a été évaluée en remplaçant le cycle aromatique par des groupements aliphatiques.

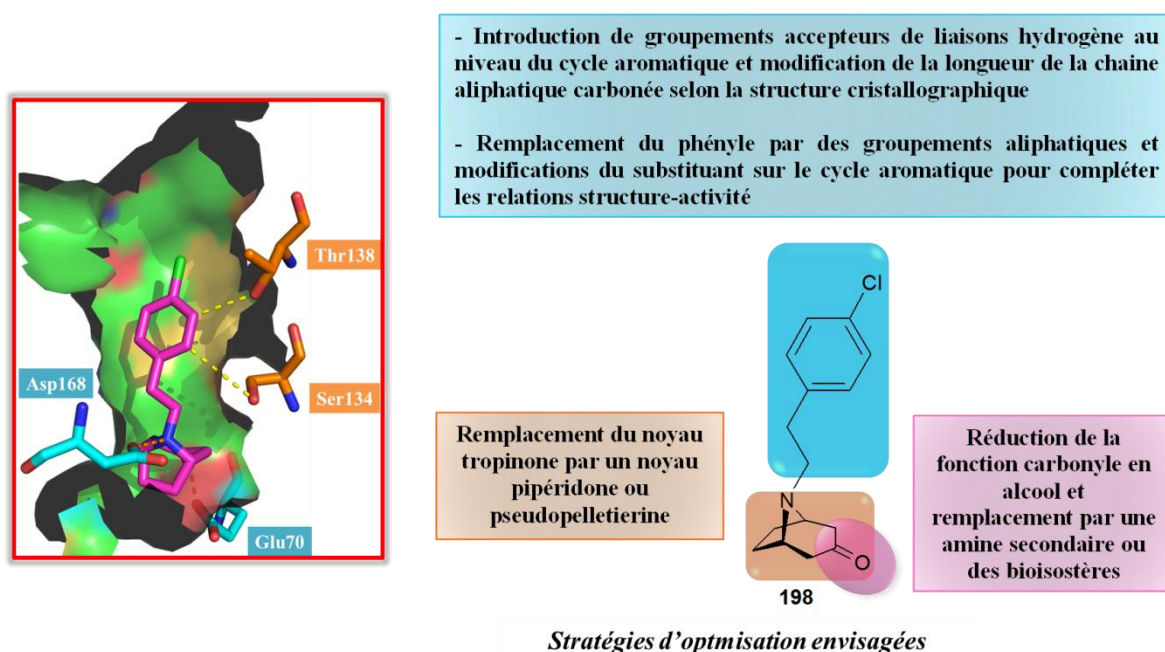


Figure 135 : Stratégies d’optimisation du composé **198** envisagées basées sur la structure cristallographique

L’importance du cycle tropinone pour l’activité a également été étudiée en synthétisant l’analogue du composé **198** avec un noyau pipéridone et un noyau 9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-one. Ce dernier, appelé pseudopelletiérine, correspond à l’homologue supérieur de la tropinone pour lequel il y a un atome de carbone supplémentaire au niveau du pont. De plus, la synthèse de l’isomère de position du noyau tropinone, correspondant au composé présentant le pont carboné en position alpha de la fonction carbonyle, a été réalisée.

De façon à compléter ces relations structure-activité, les analogues avec une fonction hydroxyle ou une amine secondaire à la place de la fonction carbonyle du noyau tropinone ont été synthétisés. De plus, des fonctions bioisostères du groupement carbonyle ont été introduites.

III. Optimisation du composé hit 198

III.1. Modifications autour du groupement 4-chlorophénéthyle

III.1.1. Stratégie et analogues envisagés

Les premières modifications apportées sur la structure du hit **198**, ont été réalisées en changeant la nature du groupement 4-chlorophénéthyle. Différents substituants ont d’abord été introduits sur le noyau aromatique à la place de l’atome de chlore ou alors en supplément, tout en conservant la chaîne aliphatique éthylénique. La nature des substituants introduits a permis d’évaluer l’influence de leur caractère lipophile, électronique et stérique²¹³.

Les différents groupements envisagés selon cette stratégie sont présentés en Figure 136 :

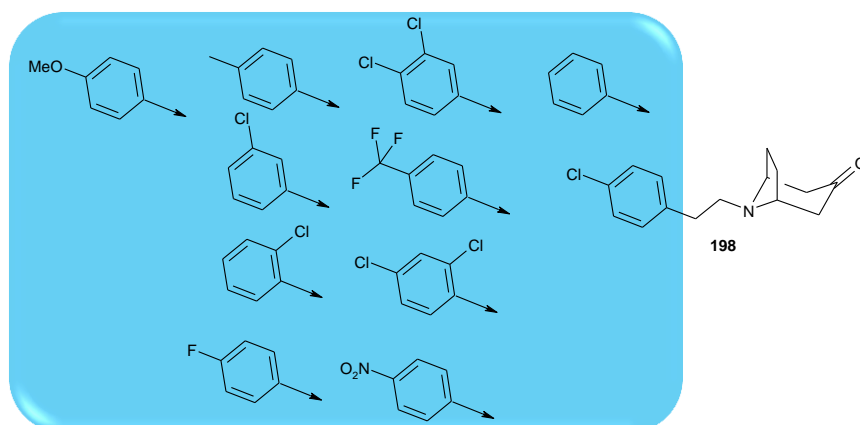


Figure 136 : Analogues du composé 198 envisagés par modification du substituant 4-chlorophényle

III.1.1.1. Synthèses des composés 198 à 208

Comme cela a été décrit dans la littérature²¹⁴, la voie de synthèse des composés **198** à **208** s’effectue en deux étapes. Cette voie de synthèse est présentée en Figure 137.

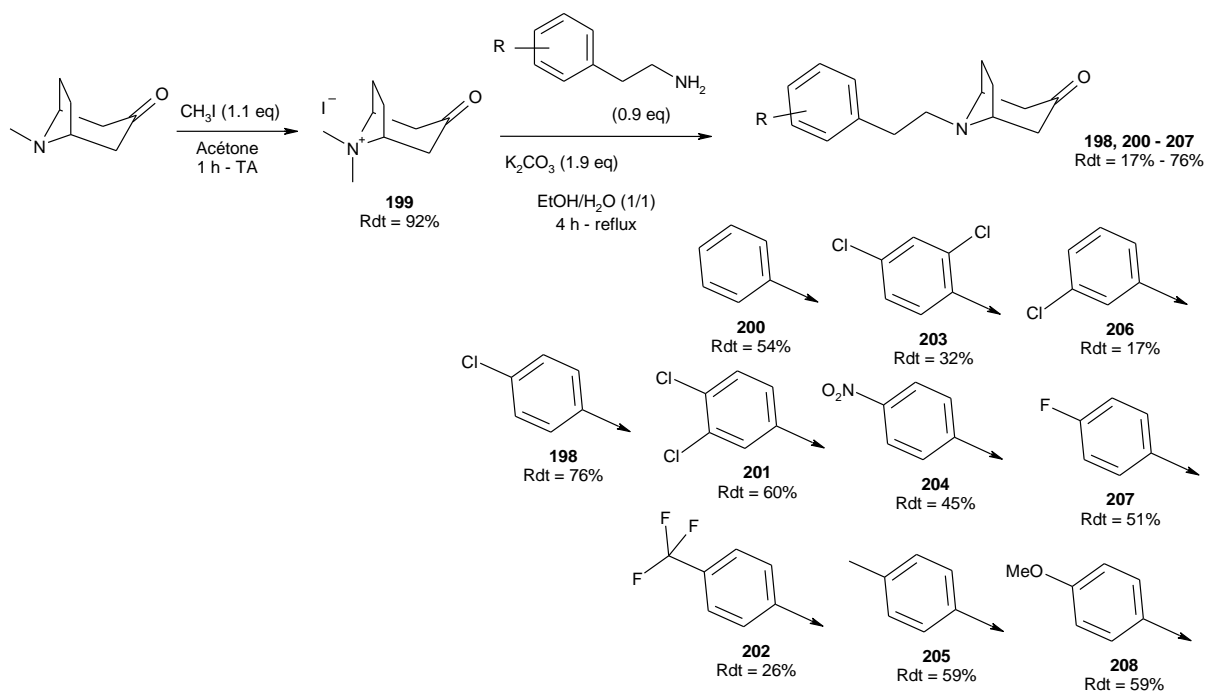


Figure 137 : Schéma réactionnel utilisé pour la synthèse des composés **198** à **208** et rendements associés²¹⁴

La première étape a consisté à méthyler l’atome d’azote de la tropinone par l’action du iodure de méthyle dans l’acétone afin d’aboutir à l’iodure de 8,8-diméthyl-3-oxo-8-azoniabicyclo[3.2.1]octane (IDABO) **199** avec un rendement de 92%. Les composés **198** et **200** à **207** ont ensuite été obtenus selon une double addition de Michael de la phénéthylamine d’intérêt sur le composé **199** en utilisant le carbonate de potassium comme base et un mélange eau/éthanol (1/1) comme solvant. A l’issue de 4 h de chauffage à reflux, les rendements obtenus pour les composés **198** et **200** à **207** ont été compris entre 17% à 76%.

Le mécanisme réactionnel proposé pour cette seconde étape est présenté en Figure 138.

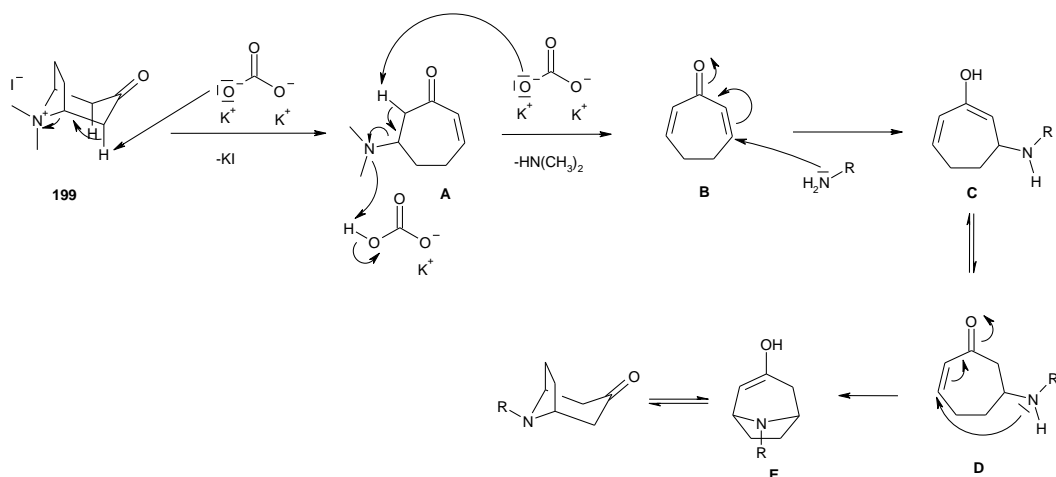


Figure 138 : Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des composés **198** et **200** à **208** à partir du composé **199**

Les deux premières étapes de la réaction, consistent en une double élimination d’Hofmann : lors de la première étape un proton en alpha de la fonction cétone du composé **199** est arraché sous l’action de la base minérale afin de conduire au composé α,β -insaturé **A**. Un second proton peut alors être lui-même arraché en alpha de la fonction carbonyle afin de favoriser l’élimination d’une molécule

Chapitre III – Application de l’approche par fragments : conception et synthèse d’inhibiteurs du répresseur transcriptionnel mycobactérien EthR₂ comme nouvelle approche pour traiter la tuberculose

de diméthylamine, conduisant ainsi à la formation de la cycloheptadiènone **B**. Cet intermédiaire **B** va subir l’addition nucléophile 1,4 de l’amine pour donner, après prototropie, le composé **C**. Un équilibre céto-énolique permet d’aboutir au composé **D** qui réagit de façon intramoléculaire avec l’amine pour conduire au composé cyclisé **E**. Un dernier équilibre céto-énolique permet d’obtenir la tropinone alkylée avec la chaîne désirée.

Les composés **198** et **200** à **208** ont ensuite été évalués avec le test d’affinité TSA et la capacité des meilleurs d’entre eux à inhiber l’interaction EthR₂/ADN a été mesurée.

III.1.1.2. Résultats et discussion

Les différentes activités biologiques obtenues pour les composés **198** et **200** à **208** sont présentées dans le Tableau 39.

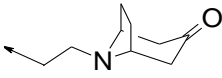
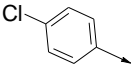
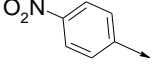

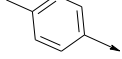
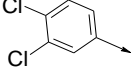
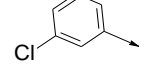
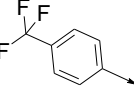
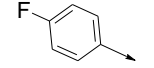
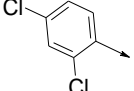
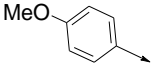
							
Composé	Substituant	ΔT_m (°C)	pIC ₅₀ [*]	Composé	Substituant	ΔT_m (°C)	pIC ₅₀ [*]
198 , référence		0.6	6.0	204		-0.2	ND
200		0.1	5.0	205		0.6	5.8
201		1.0	6.0	206		0.1	ND
202		1.8	6.7	207		0.4	5.6
203		0.2	ND	208		0.3	ND

Tableau 39 : Résultats biologiques obtenus pour les analogues 198 et 200 à 208 - pIC₅₀ = -log(IC₅₀), ND : non déterminé

A la suite de ces premiers résultats, la corrélation entre l’affinité des composés pour la cible et leur capacité à empêcher la fixation d’EthR₂ à son opérateur ADN a été évaluée (Figure 139).

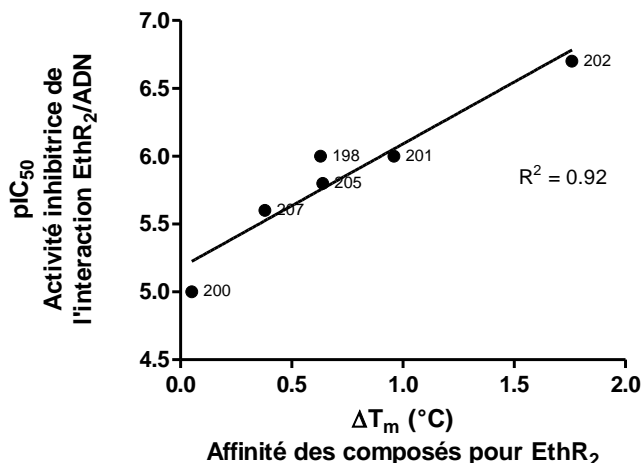


Figure 139 : Corrélation entre l'affinité des composés pour la protéine EthR₂ (ΔT_m en °C) et la capacité des composés à empêcher la fixation d'EthR₂ à son opérateur ADN (pIC₅₀)

Le graphique, présenté dans la Figure 139, montre une très bonne corrélation entre ces deux paramètres, avec un coefficient de régression linéaire R^2 égal à 0.92. Ceci démontre bien que l'activité mesurée par TSA est bien représentative d'une activité fonctionnelle des composés, ceux-ci jouant bien le rôle d'inhibiteurs de l'interaction d'EthR₂ avec son promoteur.

Les résultats présentés dans le Tableau 39 indiquent que les valeurs d'affinité (TSA) et d'inhibition (pIC₅₀) pour le hit **198** resynthétisé ($\Delta T_m = 0.6$ °C ; pIC₅₀ = 6.0) sont identiques aux valeurs obtenues lors de la campagne de criblage ($\Delta T_m = 0.5$ °C ; pIC₅₀ = 6.0). Le remplacement du groupement 4-chlorophényle par un groupement phényle non substitué a conduit à un composé **200** beaucoup moins affiné et actif ($\Delta T_m = 0.1$ °C ; pIC₅₀ = 5.0). A l'opposé, le composé **201** avec un groupement 3,4-dichlorophényle a montré une affinité et une activité ($\Delta T_m = 1.0$ °C ; pIC₅₀ = 6.0) du même ordre de grandeur que le composé de référence **198**. L'introduction d'un groupement 4-trifluorométhylphényle a conduit au composé **202**. Celui-ci présente une meilleure affinité pour EthR₂ ainsi qu'une meilleure activité inhibitrice que le composé **198** ($\Delta T_m = 1.8$ °C ; pIC₅₀ = 6.7). Ce résultat suggère que l'encombrement stérique et/ou l'hydrophobie en position 4 du cycle phényle sont des critères importants pour l'activité. Le composé **204**, présentant un groupement 4-nitrophényle, s'est révélé quant à lui non affiné pour la protéine ($\Delta T_m < 0$ °C) ce qui laisse supposer que l'appauvrissement en électrons du cycle aromatique n'est pas le seul paramètre nécessaire à l'affinité des composés. Par ailleurs, le remplacement du groupement 4-chlorophényle par un groupement 2,4-dichlorophényle a conduit au composé **203** pour lequel une diminution d'affinité a été observée ($\Delta T_m = 0.2$ °C). Ce résultat suggère que la position 2 du cycle phényle peut être sensible à l'encombrement stérique.

Le composé le plus actif (**202**) possède un groupement trifluorométhyle à la place de l'atome de chlore du composé de référence **198**. Le mode de liaison de ce composé, obtenu par modélisation moléculaire, a été comparé à celui du composé **198** obtenu par « soaking » avec la protéine EthR₂ (Figure 140A). La superposition montre que le composé **202** semblerait établir les mêmes interactions avec les résidus Asp168 et Glu70 que le composé de référence **198**. Une rotation de 90° permet de voir que le groupement trifluorométhyle en position 4 du cycle phényle (composé **202**) permet d'occuper plus efficacement le haut de la poche et d'établir des interactions hydrophobes avec les résidus hydrophobes Ile93, Ala96, Val97, Leu141, Leu163, Ile164 et Leu167 (Figure 140B). De plus, cette rotation montre qu'en position 2 du cycle phényle il n'y a pas beaucoup d'espace, ce qui pourrait expliquer la perte d'activité observée avec l'introduction d'un chlore en cette position (composé **203**).

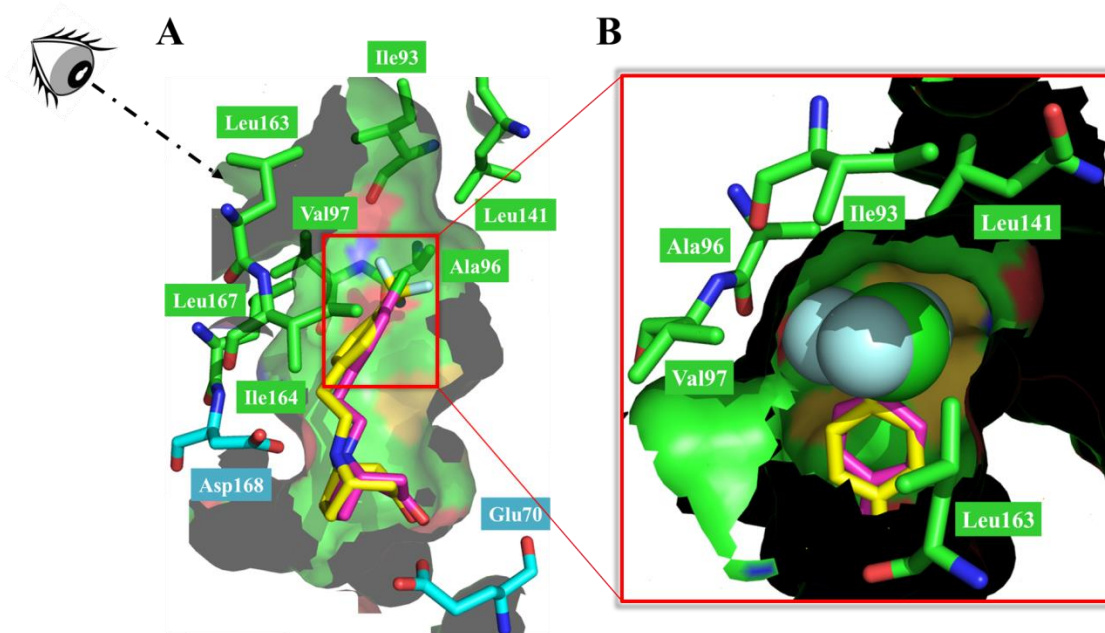


Figure 140 : Superposition dans la poche de liaison d’EthR₂ du composé de référence **198** (couleur magenta) obtenu par « soaking » et du composé **202** (couleur jaune) obtenu par modélisation moléculaire

Le groupement 4-chlorophényle a ensuite été remplacé par le groupement 4-méthylphényle (**205**) pour lequel une affinité et une activité similaires au composé de référence **198** sont observées (**205**, $\Delta T_m = 0.6$ °C ; $pIC_{50} = 5.8$). Les analogues 3-chlorophényle (**206**) et 4-fluorophényle (**207**) ont été synthétisés et ont conduit respectivement à une perte d’affinité (**206**, $\Delta T_m = 0.1$ °C) et à une diminution d’affinité et d’activité (**207**, $\Delta T_m = 0.4$ °C ; $pIC_{50} = 5.6$). Pour finir, l’introduction d’un groupement 4-méthoxyphényle a conduit à un composé moins affin (**208**, $\Delta T_m = 0.3$ °C). Ces résultats permettent de confirmer l’importance de l’ajout d’un substituant hydrophobe en position 4 du cycle phényle tout en limitant l’encombrement stérique dans le haut de la poche d’EthR₂ (Figure 140B).

Les modifications autour du groupement 4-chlorophényle ont permis d’aboutir au composé **202** possédant un groupement trifluorométhyle et présentant une meilleure affinité pour EthR₂ et une meilleure activité inhibitrice ($\Delta T_m = 1.8$ °C ; $pIC_{50} = 6.7$). D’après la modélisation moléculaire, le groupement 4-trifluorométhylphényle du composé **202** semble occuper plus efficacement le haut de la poche hydrophobe en interagissant avec les résidus hydrophobes Ala96, Val97, Ile93, Leu141 et Leu163. En s’appuyant sur la structure cristallographique présentée en Figure 134 et Figure 135, d’autres analogues ont été envisagés.

III.1.2. Stratégie et analogues envisagés à partir des données cristallographiques

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à augmenter l’affinité de nos ligands en essayant d’interagir avec la Ser134 et la Thr138 de la poche de liaison d’EthR₂. Pour cela, nous avons incorporé dans les structures de nos composés, des atomes ou groupements d’atomes capables d’interagir avec les chaînes latérales de la Ser134 et de la Thr138 via la formation d’une liaison hydrogène. Ainsi la synthèse du composé **216** possédant un groupement 4-chloro-3-aminophénéthyle a été envisagée. Son mode de liaison, présenté en Figure 141, a été évalué par modélisation moléculaire.

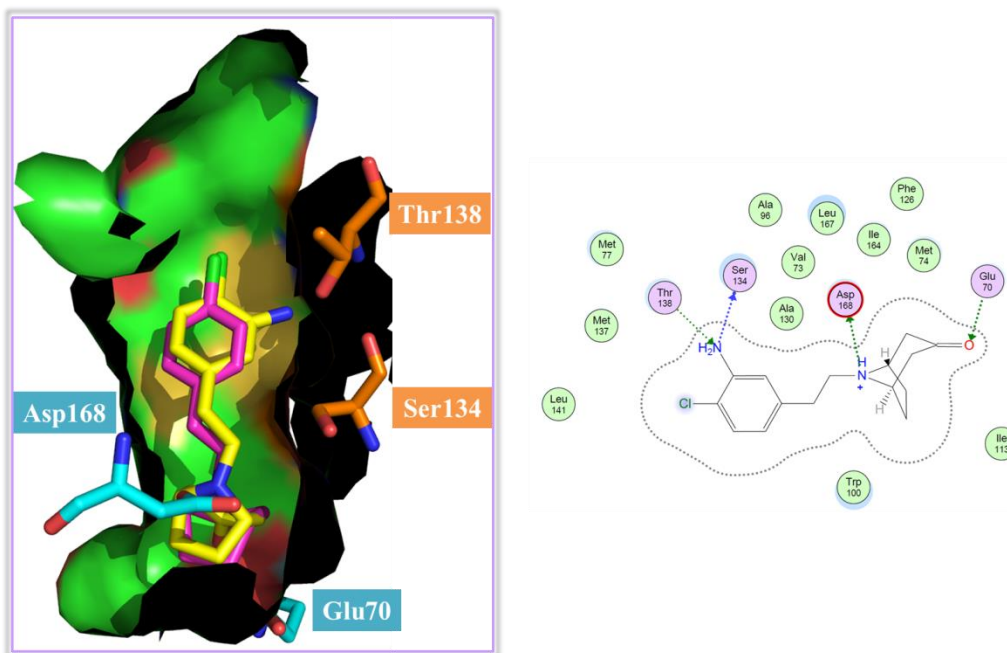


Figure 141 : Superposition dans la poche de liaison d’EthR₂ du composé de référence **198** (couleur magenta) obtenu par «soaking » et du composé **216** (couleur jaune) obtenu par modélisation moléculaire. Prédiction des interactions du composé **216** dans la poche d’EthR₂

Comme le montre la Figure 141, des interactions de type liaison hydrogène peuvent être prédites entre la fonction amine du composé **216** ainsi que les résidus polaires Ser134 et Thr138 d’EthR₂.

D’autres composés possédant un groupement 3-éthyl-pyridine (**210**) ou 3-éthyl-indole (**212**) ont été synthétisés pour essayer d’interagir avec la Thr138. Des groupements 2-éthyl-pyridine (**209**) et 4-éthyl-pyridine (**211**) ont également été incorporés pour compléter les relations structure-activité.

Par ailleurs nous avons également envisagé de faire varier la longueur de la chaîne carbonée (composé **213**) afin de chercher à occuper de façon optimale le haut de la poche. Les différents analogues synthétisés sont présentés en Figure 142.

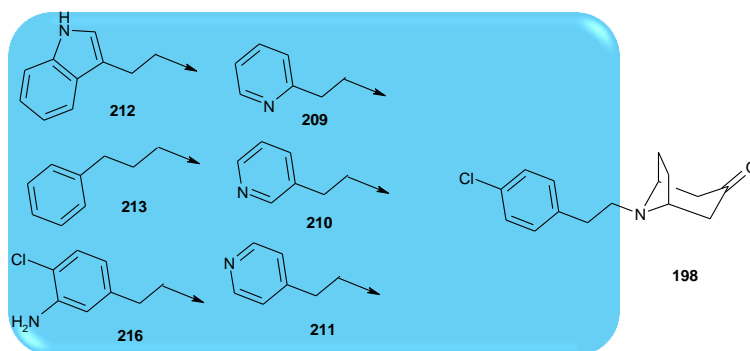


Figure 142 : Analogues du composé **198** envisagés afin d’interagir avec la Thr138 ou améliorer les interactions hydrophobes

III.1.2.1. Synthèses des composés **209** à **216**

Les composés **209** à **213** ont été synthétisés selon la même stratégie²¹⁴ que celle utilisée pour la synthèse des composés **198** et **200** à **208** décrite en Figure 137. Les rendements obtenus pour la synthèse de ces composés **209** à **213** sont compris entre 50% à 66%.

La formation du composé **216** a nécessité au préalable la synthèse de la 5-(2-aminoéthyl)-2-chloro-aniline **215** en deux étapes à partir de la 4-chloro-phénylamine, commercialement disponible. La voie de synthèse est présentée en Figure 143.

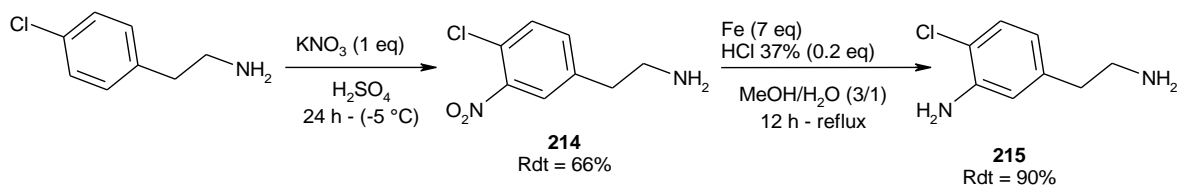


Figure 143 : Schéma réactionnel appliqué pour la synthèse de la 5-(2-aminoéthyl)-2-chloro-aniline **215**²¹⁵

La première étape a consisté à effectuer la nitration de la position 3 du cycle phényle de la 4-chlorophénylamine. Cette réaction a été réalisée dans l’acide sulfurique en présence de nitrate de potassium selon les conditions réactionnelles décrites dans la littérature²¹⁵. Une plaque froide a par ailleurs été utilisée pour s’assurer que la température n’excède pas les -5°C . Au bout de 24 h d’agitation, le produit désiré **214** a été isolé avec un rendement de 66%. Ce groupement nitro a ensuite été réduit en présence de fer et en catalyse acide dans un mélange $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (3/1). Après 12 h d’agitation à reflux, le produit **215** a été obtenu et isolé avec un rendement de 90%. Ce produit **215** a ensuite été engagé dans la voie de synthèse décrite en Figure 137 afin d’aboutir au composé **216** qui a été isolé avec un rendement de 40%.

Les activités biologiques de ces 6 composés (**209-213, 216**) ont ensuite été déterminées.

III.1.2.2. Résultats et discussion

Les différentes activités biologiques obtenues pour les composés **209** à **213** et **216** sont présentées dans le Tableau 40.

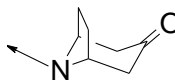
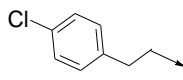
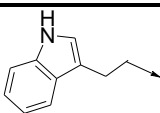
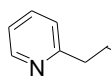
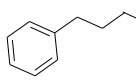
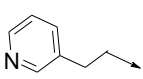
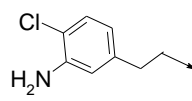
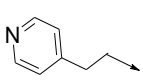
							
Composé	Substituant	ΔT_m (°C)	pIC ₅₀ *	Composé	Substituant	ΔT_m (°C)	pIC ₅₀ *
198, référence		0.6	6.0	212		-0.1	ND
209		0.0	ND	213		-0.1	ND
210		0.0	ND	216		0.2	ND
211		0.0	5.0				

Tableau 40 : Résultats biologiques obtenus pour les analogues 198, 209 à 213 et 216 - *pIC₅₀ = -log(IC₅₀)

Le remplacement du groupement 4-chlorophénéthyle par un groupement 2-éthyl-pyridine (**209**), 3-éthyl-pyridine (**210**), 4-éthyl-pyridine- (**211**), 3-éthyl-indole (**212**) et phénylpropyle (**213**) a conduit à une perte d’affinité pour la protéine. La valeur de pIC₅₀ obtenue pour le composé **211** (pIC₅₀ = 5.0) est inférieure d’un log par rapport au composé de référence. Enfin, l’introduction du groupement 4-chloro-2-aminophénéthyle (**216**) a abouti à une diminution d’affinité ($\Delta T_m = 0.2$ °C). Toutes les modifications envisagées au niveau du groupement 4-chlorophénéthyle n’ont pas permis d’accroître l’affinité pour la protéine EthR₂ et donc la capacité à inhiber l’interaction EthR₂/ADN.

D’autres structures ont été envisagées afin de compléter ces relations structure-activité.

III.1.3. Analogues envisagés pour compléter les relations structure-activité

Afin de confirmer l’importance de l’encombrement stérique et de l’hydrophobie en position 4 du noyau phényle, des atomes de brome et d’iode ont été introduits. L’influence de la position du groupement trifluorométhyle sur le cycle phényle a également été évaluée. Le remplacement du groupement 4-chlorophényle par un cycle morpholine ou une fonction amine protégée par un groupement Boc a été effectuée afin d’examiner l’importance de l’aromaticité pour l’activité du composé. Une réduction d’un chaînon méthylénique ainsi qu’une rigidification de la chaîne carbonée ont permis de compléter ces relations structure-activité. Ces différents analogues envisagés sont présentés en Figure 144.

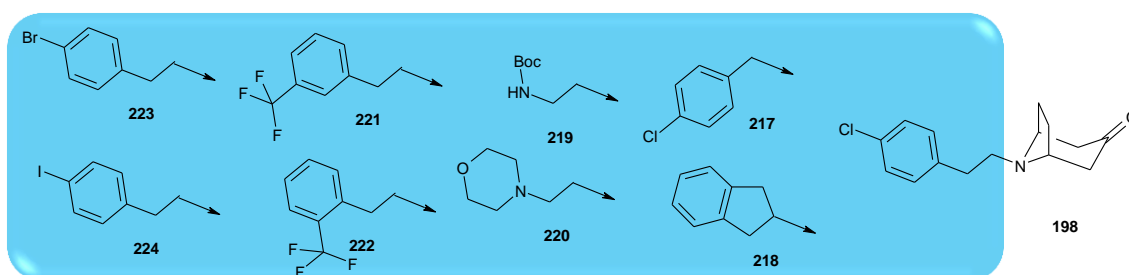


Figure 144 : Analogues du composé 198 envisagés pour compléter les relations structure-activité en modifiant le groupement 4-chlorophénéthyle

III.1.3.1. Synthèses des analogues **217** à **224**

La synthèse des composés **217** à **223** a été effectuée en utilisant la voie réactionnelle présentée en Figure 137²¹⁴. Les composés **217** à **223** ont été isolés avec des rendements allant de 25% à 64%. Le composé **224** a été synthétisé à partir du composé **223** par une réaction de Finkelstein. Les conditions réactionnelles utilisées sont décrites en Figure 145.

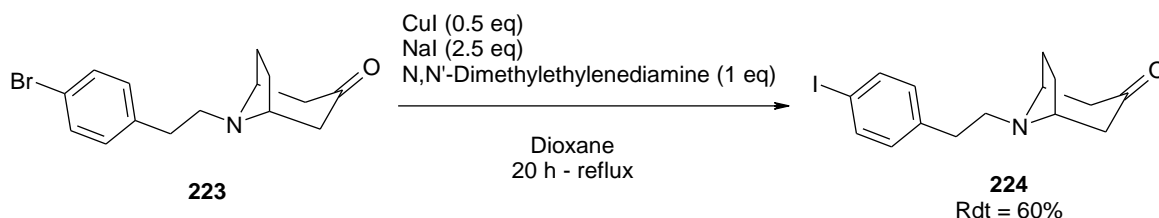


Figure 145 : Voie réactionnelle appliquée pour la synthèse du composé **224** à partir du composé **223** par la réaction de Finkelstein²¹⁶

Comme cela a été décrit dans la littérature²¹⁶, le composé **223** a été mis en réaction dans un tube scellé en présence d'iodure de cuivre, d'iodure de sodium et la N,N'-diméthyléthylènediamine dans le dioxane anhydre. A l'issue de 20h de chauffage à reflux, le produit désiré **224** a pu être isolé avec un rendement de 60%. L'affinité pour l'ensemble de ces composés **217** à **224** a été évaluée et pour une partie d'entre eux nous avons mesuré leur capacité d'inhibition de l'interaction EthR₂/ADN.

III.1.3.2. Résultats et discussion

Les activités biologiques obtenues pour les composés **217** à **224** sont présentées dans le Tableau 41. Par ailleurs, afin de faciliter la compréhension, les activités biologiques obtenues pour les composés **202**, avec le groupement trifluorométhyle en position 4 du cycle phényle, et **207**, avec l'atome de fluor en position 4 du cycle phényle, sont également reportées.

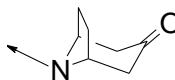
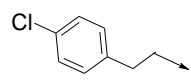
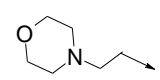
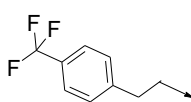
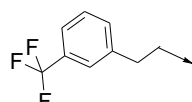
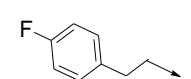
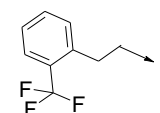
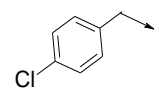
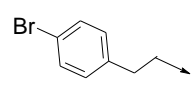
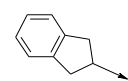
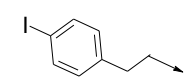
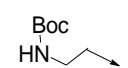
							
Composé	Substituant	TSA ΔT_m (°C)	pIC ₅₀ [*]	Composé	Substituant	TSA ΔT_m (°C)	pIC ₅₀ [*]
198 , référence		0.6	6.0	220		0.0	5.0
202		1.8	6.7	221		-0.1	ND
207		0.4	5.6	222		0.3	ND
217		0.0	ND	223		1.0	6.1
218		0.0	ND	224		1.5	ND
219		-0.1	ND				

Tableau 41 : Résultats biologiques obtenus pour les analogues 198, 202, 207 et 217 à 224 - *pIC₅₀ = -log(IC₅₀)

Ces résultats montrent que la chaîne aliphatique carbonée à deux sommets semble importante pour l’activité puisque lorsqu’elle est réduite d’un chaînon méthylénique (**217**) ou lorsqu’elle est rigidifiée (**218**), une perte d’affinité en TSA est observée ($\Delta T_m = 0$ °C). Par ailleurs, le caractère aromatique semble être important, puisque le remplacement du groupement 4-chlorophényle par une fonction amine primaire protégée par un Boc (**219**) ou par une morpholine (**220**) a conduit à une perte d’affinité pour la protéine ($\Delta T_m \leq 0$ °C) et d’activité (pIC₅₀ = 5.0). De plus, la position du substituant sur le cycle phényle est importante puisque lorsque le groupement trifluorométhyle se trouve en position méta sur le cycle phényle, nous observons une perte d’activité (**221**, $\Delta T_m < 0$ °C) tandis qu’une nette diminution d’affinité est observée avec ce même groupement en position ortho (**222**, $\Delta T_m = 0.3$ °C).

En série halogénée, nous observons une augmentation graduelle de l’activité en passant du dérivé fluoré (**207**, $\Delta T_m = 0.4$ °C ; pIC₅₀ = 5.6), au dérivé chloré (**198**, $\Delta T_m = 0.6$ °C ; pIC₅₀ = 6.0), puis au dérivé bromé (**223**, $\Delta T_m = 1.0$ °C ; pIC₅₀ = 6.1) et enfin à l’analogue iodé (**224**, $\Delta T_m = 1.5$ °C) pour lequel l’IC₅₀ n’a pas encore été mesurée. Ces résultats confirment bien le fait qu’un groupement volumineux et hydrophobe doit être présent dans cette position 4 du cycle phényle afin d’occuper le haut de la poche de la protéine EthR₂.

III.1.4. Conclusion concernant les modifications autour du groupement 4-chlorophénéthyle

Les résultats précédemment présentés suggèrent qu’une chaîne aliphatique carbonée à deux sommets est nécessaire pour l’activité des composés. De plus, l’aromaticité est également un facteur important pour l’activité des composés puisque le remplacement du groupement 4-chlorophényle par

une amine primaire protégée par un Boc (**219**) ou par une morpholine (**220**) a abouti à une perte d'affinité pour la protéine EthR₂. L'exploration de la nature et de la position du substituant à introduire sur le cycle phényle a été basée sur la structure cristallographique. Ces différentes stratégies ont permis de dégager certains points importants pour l'affinité et l'activité du composé. Les positions 2 et 3 du cycle phényle sont sensibles à l'encombrement stérique. Concernant la position 4 du cycle phényle, un groupement/atome volumineux et hydrophobe est nécessaire pour l'activité. En effet, les résultats précédents ont montré qu'un substituant trifluorométhyle (**202**) ou qu'un atome d'iode (**224**) permettaient d'augmenter l'affinité à EthR₂ ainsi que l'activité inhibitrice. De tels groupements/atomes volumineux permettent non seulement d'occuper plus efficacement le haut de la poche d'EthR₂ mais aussi d'établir des interactions avec les résidus hydrophobes Ile93, Ala96, Val97, Leu141, Leu163, Ile164 et Leu167.

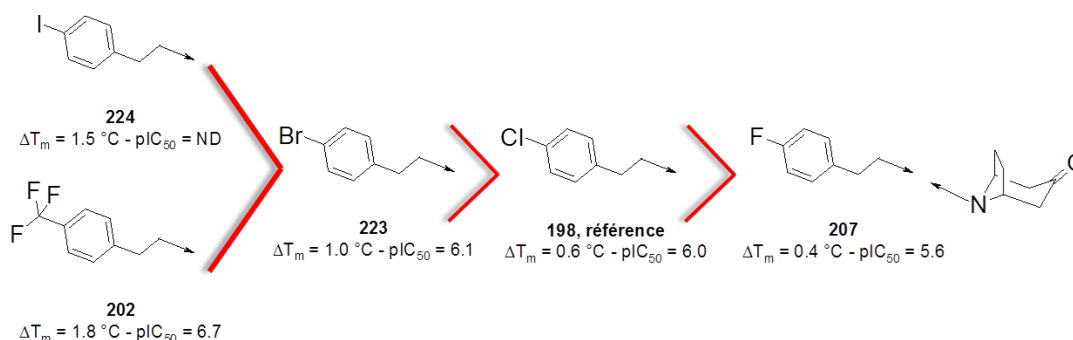


Figure 146 : Bilan obtenu après avoir modifié le groupement 4-chlorophényle

Après s'être intéressés aux modifications autour du groupement 4-chlorophénéthyle, nous sommes intéressés à l'importance du noyau tropinone.

III.2. Modifications du noyau tropinone

III.2.1. Analogues envisagés

L'importance du noyau tropinone a été évaluée en le remplaçant par un noyau pipéridone (composé **227**) et par un noyau pseudopelletiérine (composé **228**). De plus, il a été envisagé de synthétiser l'isomère du noyau tropinone, pour lequel le pont carboné est en α du groupement carbonylé (cycle 3-azabicyclo[3.2.1]octan-8-one, composé **233**). De la même manière, la synthèse du cycle 3-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-one, composé **234**, a été envisagée. Tous ces analogues ont été substitués par un groupement 4-chlorophénéthyle afin de mieux comparer leurs activités. Pour compléter les relations structure-activité, les analogues 3,4-dichlorophénéthyle (**229**), 4-méthylphénéthyle (**230**) et 4-bromophénéthyle (**231**) en série pseudopelletiérine ont également été synthétisés. Les structures des analogues envisagés sont présentées en Figure 147.

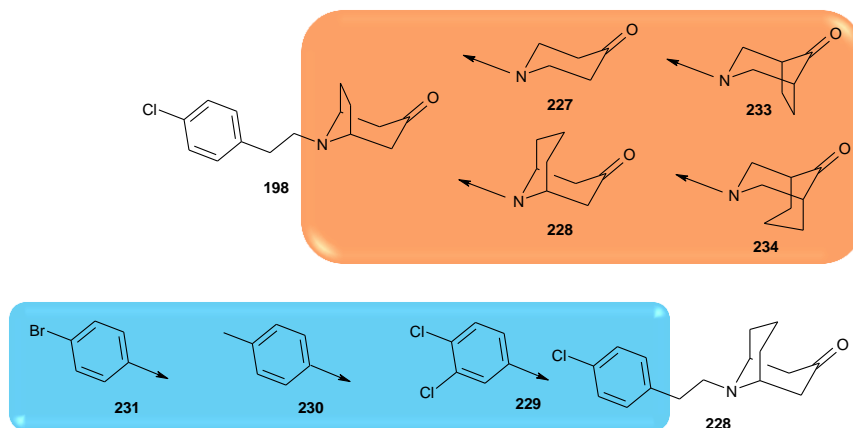


Figure 147 : Analogues du composé 198 envisagés en modifiant le noyau tropinone

Les modes de liaison des composés **228** et **233** portant respectivement le noyau pseudopelletiérine et le noyau 3-azabicyclo[3.2.1]octan-8-one ont été déterminés par modélisation moléculaire et comparés au mode de liaison du composé de référence **198** obtenu par « soaking ». Les différentes structures sont présentées en Figure 148.

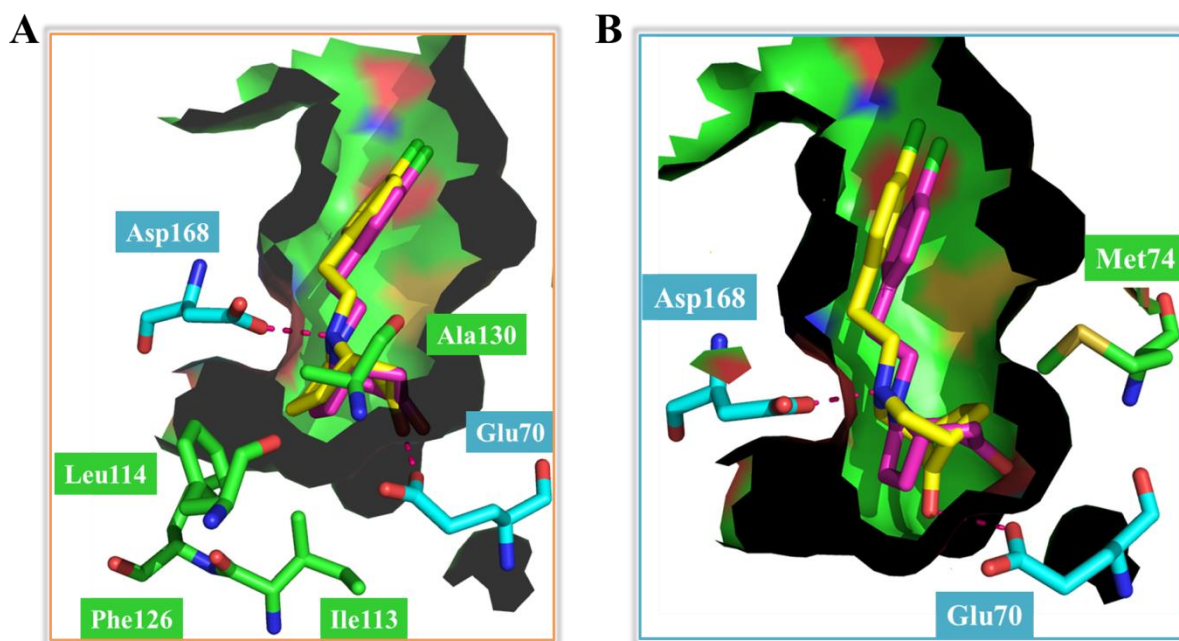


Figure 148 : A. Superposition du composé de référence **198** (couleur magenta) obtenu par « soaking » avec EthR₂ et du composé **228** (couleur jaune) obtenu par modélisation moléculaire
B. Superposition du composé de référence **198** (couleur magenta) obtenu par « soaking » avec EthR₂ et du composé **233** (couleur jaune) obtenu par modélisation moléculaire

Les modélisations moléculaires des composés **228** et **233** montrent que les interactions polaires avec les résidus Asp168 et Glu70 peuvent être conservées. L’atome de carbone supplémentaire pour le noyau pseudopelletiérine (**228**) peut occuper plus efficacement le bas de la poche d’EthR₂ et établir des interactions hydrophobes avec les résidus Leu114 et Phe126 fermant le bas de la poche (structure jaune Figure 148A). Concernant le composé **233**, le pont aliphatique carboné pourrait établir des interactions hydrophobes avec le résidu Met74 dans une autre région d’EthR₂ (structure jaune Figure 148B).

III.2.2. Synthèses des analogues 227 à 234

Les composés **227** à **231** ont été synthétisés selon la même stratégie (Figure 137) que celle utilisée pour la formation des composés **198** à **223** mais en utilisant soit la *N*-méthyl-4-pipéridone soit la pseudopelletiérine comme réactif de départ. La voie de synthèse des composés **227** à **231** est présentée en Figure 149.

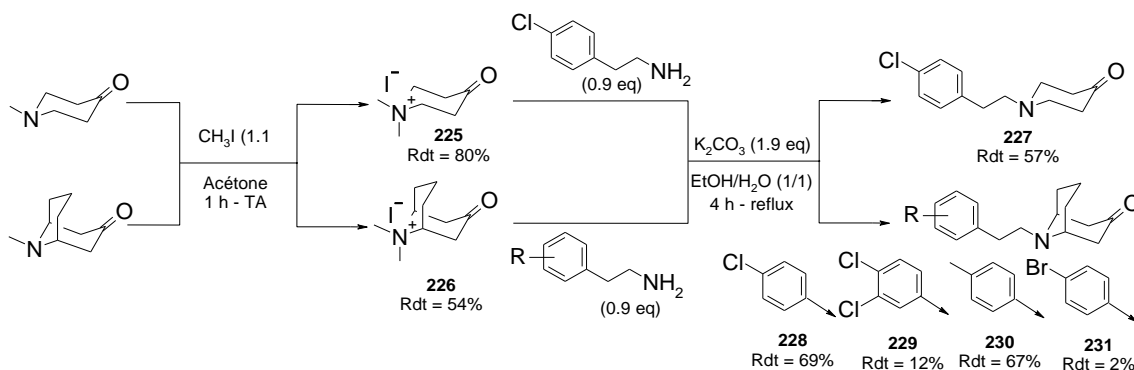


Figure 149 : Schéma réactionnel utilisé pour la synthèse des composés **227** à **231** et rendements associés²¹⁴

Les ammoniums quaternaires **225** et **226**, sont obtenus par méthylation de la *N*-méthyl-4-pipéridone et de la pseudopelletiérine, avec des rendements de 80% et 54% respectivement. La réaction des différentes phényléthylamines substituées avec ces deux composés a permis d’aboutir aux produits **227** à **231** avec des rendements variant de 2% à 69%. La présence du pont aliphatique carboné n’a pas influencé le rendement de la réaction puisque les composés **227** et **228** ont été obtenus avec des rendements équivalents (57% et 69% respectivement). Les faibles rendements obtenus pour les composés **229** et **231** sont dus à des difficultés survenues lors de la purification par chromatographie sur silice.

Les composés **233** et **234** ont été synthétisés en deux temps à partir de la cétone cyclique désirée (cyclopentanone ou cyclohexanone respectivement) et du *N,N*-bis(méthoxyméthyl)-2-(4-chlorophényl)-éthylamine **232**. La voie de synthèse est présentée en Figure 150.

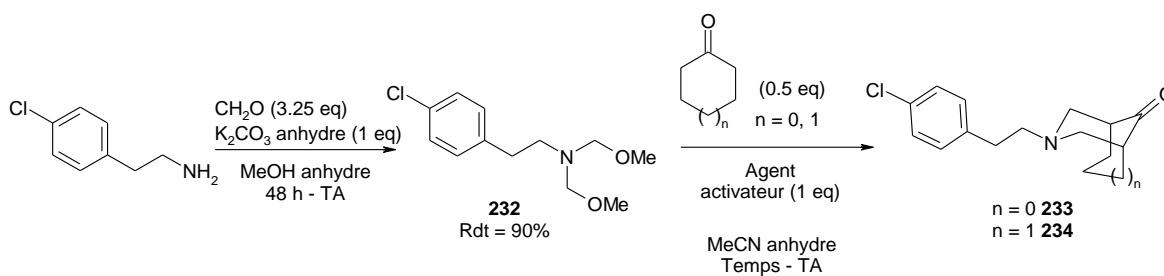


Figure 150 : Stratégie envisagée pour la synthèse des composés **233** et **234** à partir de l’intermédiaire **232**^{217, 218}

Comme cela a été décrit dans la littérature²¹⁷, la première étape consiste à obtenir le composé **232** à partir de la 4-chlorophényléthylamine commercialement disponible qui est mise en réaction avec le paraformaldéhyde en présence de carbonate de potassium anhydre, dans le méthanol anhydre. Après 48 h d’agitation à température ambiante le composé **232** est isolé avec un rendement de 90%. Ce composé **232**, réagit ensuite avec la cétone cyclique pour conduire aux composés **233** et **234**. Cette étape s’effectue dans l’acétonitrile anhydre à température ambiante et nécessite l’utilisation d’un agent activateur. Comme décrit dans la littérature, deux agents activateurs ont été essayés, le chlorure de

Chapitre III – Application de l’approche par fragments : conception et synthèse d’inhibiteurs du répresseur transcriptionnel mycobactérien EthR₂ comme nouvelle approche pour traiter la tuberculose

triméthylsilyle ((CH₃)₃SiCl)²¹⁷ et le trichlorure de méthylsilyle (CH₃SiCl₃)²¹⁸. Ils permettent d’obtenir l’éther d’énol silylé en présence de la cétone cyclique (le mécanisme de cette étape sera détaillé Figure 151). Les résultats obtenus en fonction de l’agent activateur utilisé sont présentés dans le Tableau 42. Les rendements indiqués dans ce Tableau 42 correspondent au produit isolé après purification.

Cétone cyclique	Agent activateur	Temps	Résultats
		137 h	Produit désiré non observé Dégradation
	(CH ₃) ₃ SiCl ²¹⁷	20 h	Produit désiré non observé Produits secondaires supposés :
	CH ₃ SiCl ₃ ²¹⁸	8 h	Rdt : 40%
		3 h	Rdt : 25%

Tableau 42 : Résultats obtenus pour la synthèse des composés **233** et **234** en fonction de l’agent activateur utilisé

Ces résultats montrent que l’utilisation du chlorure de triméthylsilyle (CH₃)₃SiCl n’a pas permis d’isoler les produits désirés **233** et **234** après respectivement 137 h et 20 h d’agitation à température ambiante. Dans le cas de la cyclopentanone, de la dégradation a été observée par analyse LC/MS. Dans le cas de la cyclohexanone, deux produits majoritaires ont été observés en LC/MS. Le premier produit correspond à la 4-chlorophénylamine issue de la dégradation du composé **232**. Le second produit correspondrait au produit monoalkylé. En revanche, l’utilisation du trichlorure de méthylsilyle CH₃SiCl₃ a conduit aux composés **233** et **234** qui ont été isolés avec des rendements de 40% et 25% respectivement. Ces différences peuvent s’expliquer par la différence de réactivité du triméthylsilyle (CH₃)₃SiCl, moins réactif que le trichlorure de méthylsilyle CH₃SiCl₃, ce qui expliquerait que le produit **232** ait eu le temps de se dégrader. Le mécanisme proposé pour la formation des composés **233** et **234** est présenté en Figure 151.

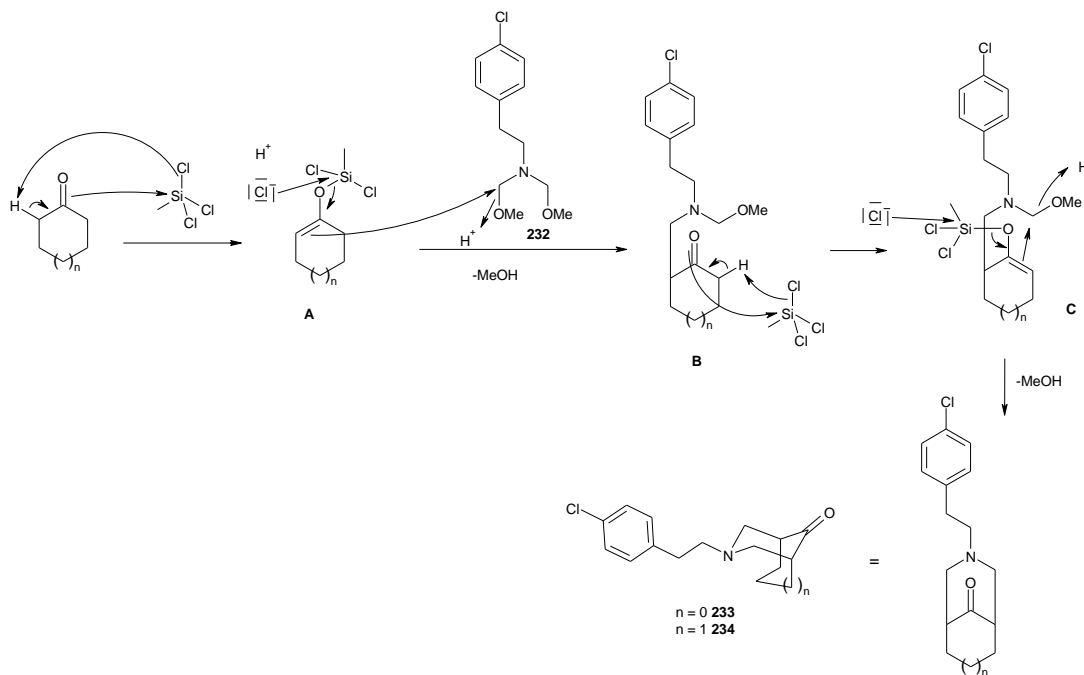


Figure 151 : Mécanisme réactionnel proposé pour la synthèse des composés 233 et 234

La première étape de ce mécanisme réactionnel consiste à obtenir l'éther d'énol silylé **A** par action du trichlorure de méthylsilyle sur la cétone cyclique. Le produit **B** est obtenu par une première addition de l'éther d'énol silylé **A** sur le composé **232**. L'addition du trichlorure de méthylsilyle sur l'intermédiaire **B** conduit à un nouvel éther d'énol silylé **C**. Une seconde addition intramoléculaire de l'éther d'énol silylé de **C** sur le carbone électrophile en α de l'amine tertiaire et du groupement méthoxy permet d'aboutir aux composés **233** et **234** avec n égal à 0 ou 1 respectivement.

L'affinité de ces composés **227** à **231**, **233** et **234** pour EthR₂ a ensuite été évaluée. La capacité de certains de ces composés à empêcher la fixation d'EthR₂ à son opérateur ADN a été mesurée.

III.2.3. Résultats et discussion

Les activités biologiques obtenues pour les composés **227**, **228**, **233** et **234** sont présentées dans le Tableau 43.

Composé	Substituant	ΔT_m (°C)	pIC_{50}^*	Composé	Substituant	ΔT_m (°C)	pIC_{50}^*
198, référence		0.6	6.0	233		0.1	ND
227		0.3	ND	234		-0.1	ND
228		0.6	5.8				

Tableau 43 : Résultats biologiques obtenus pour les analogues 198, 227, 228, 233 et 234 - * $pIC_{50} = -\log(IC_{50})$

Le remplacement du noyau tropinone par un noyau pipéridone (**227**) a abouti à une diminution de l’affinité pour EthR₂ ($\Delta T_m = 0.3$ °C). En revanche, l’affinité et l’activité inhibitrice sont conservées lorsque le noyau pseudopelletiérine (**228**) est introduit. Ces résultats suggèrent que l’introduction d’un pont à deux ou trois chaînons méthyléniques reliant les deux carbones en β de la fonction carbonyle est nécessaire pour l’affinité et pour l’activité du composé. De plus, la position de ce pont est importante, puisqu’une perte d’affinité est observée lorsqu’il est introduit en α de la fonction carbonyle quelle que soit sa taille (**233**, $\Delta T_m = 0.1$ °C et **234**, $\Delta T_m < 0$ °C).

Les résultats obtenus avec les composés **229** à **231** sont présentés dans le Tableau 44 où figurent également leurs analogues **201**, **205** et **223** possédant le noyau tropinone.

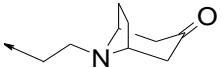
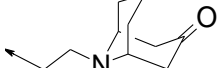
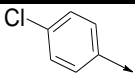
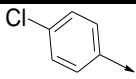
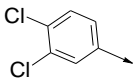
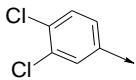
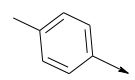
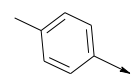
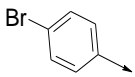
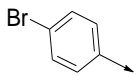
							
Composé	Substituant	ΔT_m (°C)	pIC ₅₀ *	Composé	Substituant	ΔT_m (°C)	pIC ₅₀ *
198		0.6	6.0	228		0.6	5.8
201		0.1	6.0	229		0.9	5.9
205		0.6	5.8	230		0.6	5.7
223		1.0	6.1	231		0.6	5.7

Tableau 44 : Résultats biologiques obtenus pour les analogues **198**, **201**, **205**, **223** et **228** à **231** - *pIC₅₀ = -log(IC₅₀)

Ces résultats montrent que pour tous les groupements phényles envisagés, l’introduction du noyau pseudopelletiérine à la place du noyau nortropinone ne permet pas d’améliorer l’affinité et l’activité du composé (**228** vs **198** – **229** vs **201** – **230** vs **205** – **231** vs **223**). Il a donc été décidé de conserver le noyau tropinone pour la suite des modifications envisagées.

Les composés **198**, **200**, **201**, **205**, **206**, **207**, **209**, **210**, **211**, **218**, **219**, **220**, **223** et **227** à **231** ont ensuite été testés sur *Mycobacterium tuberculosis* afin d’évaluer leur capacité à potentialiser l’activité de l’éthionamide. Aucune activité n’a été observée pour tous ces composés (EC₅₀ > 30 μ M).

Même si les modifications envisagées, notamment autour du groupement 4-chlorophénéthyle, ont permis d’obtenir des composés présentant une meilleure affinité pour EthR₂ ainsi qu’une meilleure activité inhibitrice, aucun composé n’a été capable de potentialiser l’activité de l’éthionamide sur bactéries (EC₅₀ > 30 μ M pour tous les composés). Cette absence d’activité sur bactéries suggère que les composés ne parviennent pas à traverser la paroi de la bactérie et à inhiber le répresseur transcriptionnel EthR₂. Deux hypothèses ont donc été formulées pour expliquer cette absence de perméabilité bactérienne : (i) la présence d’un centre électrophile réactif dû à la fonction carbonyle et (ii) la présence d’un atome d’azote protonable à pH physiologique. Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons cherché à remplacer la fonction carbonyle par des groupements bioisostères de cette fonction et également à remplacer la fonction amine par une fonction amide. Des atomes de fluor à proximité de l’atome d’azote ont également été introduits pour diminuer le caractère basique de la molécule et ainsi augmenter la perméabilité bactérienne.

III.3. Modifications autour de la fonction carbonyle

III.3.1. Analogues envisagés

Différents groupements bioisostères de la fonction carbonyle, inspirés de la littérature²¹⁹, ont été envisagés tels qu’un groupement difluorométhyle (**235**), un groupement gem-difluorooléfine (**236**), un groupement acétal cyclique (**237**) ou non cyclique (**238**). De plus, la fonction carbonyle a également été réduite en alcool (**239**) ou transformée en amine secondaire (**240**) afin de compléter les relations structure-activité autour de cette région du composé **198** (Figure 152).

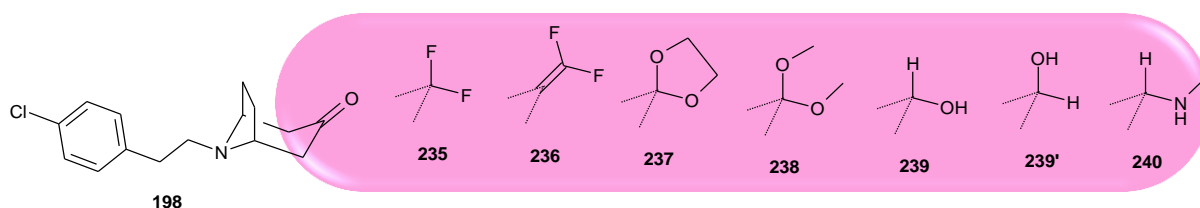


Figure 152 : Analogues du composé **198** envisagés en modifiant la fonction carbonyle

III.3.2. Synthèses des analogues **235** à **240**

Afin de synthétiser le composé **235** à partir du composé **198**, il a été envisagé d’utiliser deux agents de fluoration différents décrits dans la littérature, le trifluorure de bis(2-méthoxyéthyl)aminosulfure (Deoxofluor)²²⁰ et le trifluorure de diéthylaminosulfure (DAST)^{221, 222}. Ces deux agents permettent de fournir des atomes de fluor nucléophiles capables d’attaquer le centre électrophile de la fonction carbonyle. Les différentes conditions essayées ainsi que les résultats sont présentés dans le Tableau 45.

Condition	Agent de fluoration	Température (°C)	Temps (h)	Résultats
1 ²²⁰	 Deoxofluor 1 eq	0	30 min	Aucune conversion mais dégradation
		TA	24	
2 ^{221, 222}	 DAST 3 eq	-20	12	Pas de conversion ni de dégradation
		TA	4	Pas de conversion mais dégradation
		Reflux	4	Dégradation totale

Tableau 45 : Conditions essayées pour la synthèse du composé **235** à partir du composé **198**

Le traitement du composé **198** avec le Deoxofluor dans le DCM anhydre pendant 30 min à 0 °C puis 24 h à température ambiante n'a pas permis d'aboutir au composé désiré **235** (condition 1). En présence de DAST, aucune conversion n'est observée après 12 h d'agitation à -20 °C (condition 2). En revanche, 4 h d'agitation à température ambiante ont suffi pour que le mélange réactionnel se dégrade (condition 2). Cette dégradation s'est avérée être totale lorsqu'un reflux pendant 4 h a été appliqué (condition 2).

Les conditions réactionnelles 2, pour lesquelles le DAST est utilisé, ont été appliquées à la tropinone protégée par un groupement Boc. Après 12 h d'agitation à -20 °C, aucune conversion en produit désiré n'a été observée. Il a donc été envisagé d'effectuer cette réaction avec l'analogue en série pipéridone **227** afin de voir si la présence du pont pouvait nuire à l'attaque de l'ion fluorure. En présence de DAST, et au bout de 3 h d'agitation à -20 °C le composé désiré **241** a été observé et isolé avec un rendement de 41% (Figure 153). Ceci confirme bien l'hypothèse que la gêne stérique liée à la présence du pont éthylénique peut être la cause de la non réactivité du composé **198**.

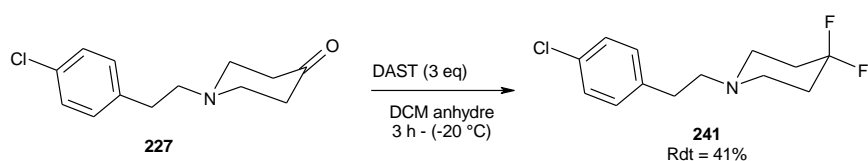


Figure 153 : Conditions appliquées pour la synthèse du composé **241** à partir du composé **227**^{221, 222}

Comme nous l'avons présenté dans le Tableau 43, le composé **227** présente un ΔT_m de 0.3 °C. Ceci nous permettra donc de mesurer l'impact du remplacement du carbonyle par deux atomes de fluor (composé **241**).

Comme cela a été décrit dans la littérature par Zhao *et al.*²²³, la synthèse du composé **236** a été réalisée à partir de la 2-(difluorométhylsulfonyl)pyridine commercialement disponible. Cet agent de gem-difluorooléfination a été mis à réagir avec le composé **198** dans le DMF anhydre en présence de la base *tert*-butalonnate de potassium. A l'issue de 96 h d'agitation à -25 °C, une solution d'acide chlorhydrique à 3 M a été ajoutée et le composé **236** a été isolé avec un rendement de 30% (Figure 154)²²³.

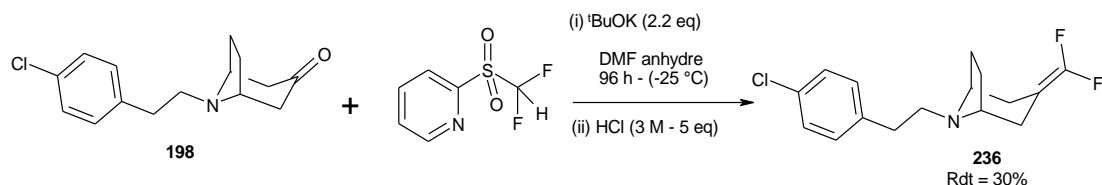


Figure 154 : Conditions appliquées pour la synthèse du composé **236** à partir du composé **198**²²³

Le mécanisme réactionnel, proposé par Zhao *et al.*²²³ et présenté en Figure 155, est apparenté à celui de l'oléfination de Julia-Kocienski.

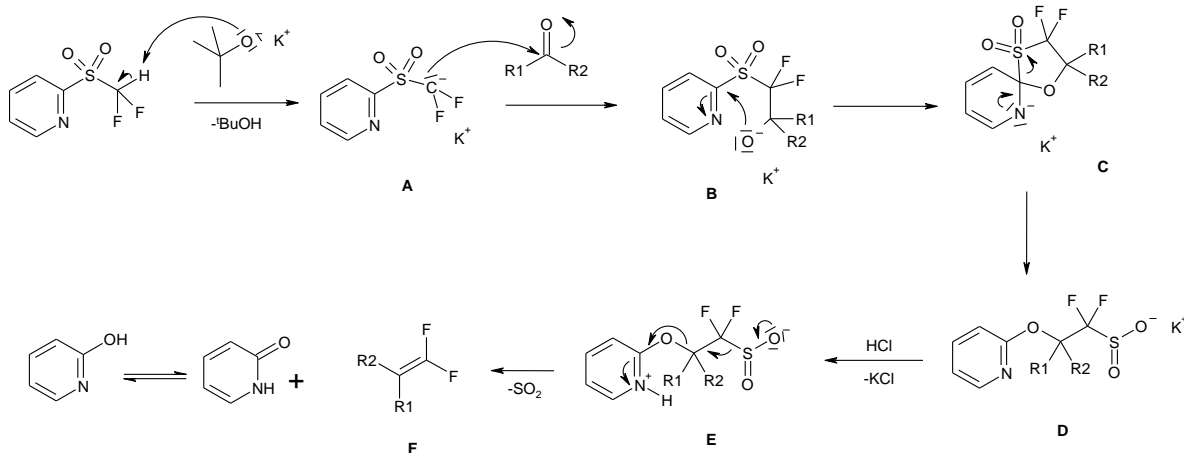


Figure 155 : Mécanisme réactionnel proposé pour la gem-difluorooléfination d'une fonction carbonyle²²³

La première étape consiste à former le carbanion **A** par arrachement du proton de la 2-(difluorométhylsulfonyl)pyridine sous l'action du *tert*-butanolate de potassium. Le carbanion **A** s'additionne ensuite sur le dérivé carbonyle pour aboutir à l'intermédiaire **B** qui par addition intramoléculaire conduit au composé **C** possédant un carbone spiranique. Ce composé **C** se réarrange pour former l'intermédiaire **D** où le noyau pyridine va pouvoir être protoné sous l'action de la solution d'acide chlorhydrique pour aboutir à l'intermédiaire **E**. Par réarrangement intramoléculaire et élimination du dioxyde de soufre, le produit désiré **F** est obtenu ainsi que le sous-produit 2-(1H)-pyridone qui par équilibre céto-énolique conduit à la 2-hydroxypyridine.

La protection de la fonction carbonyle de **198** en acétal cyclique a été effectuée sous irradiation micro-ondes en présence d'éthanediol et de chlorure de triméthylsilyle, utilisé en tant qu'acide de Lewis, dans l'acétonitrile anhydre²²⁴. Après 25 min de chauffage sous micro-ondes à 80 °C, le composé **237** a été obtenu avec un rendement de 83% (Figure 156).

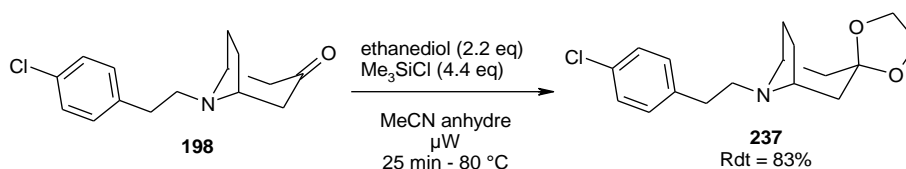


Figure 156 : Conditions réactionnelles appliquées pour la synthèse du composé **237** à partir du composé **198** sous irradiation microonde²²⁴

La protection de la fonction carbonyle du composé **198** en acétal non cyclique (**238**) a été essayée en présence d'acide para-toluènesulfonique (APTS), utilisé en tant que catalyseur acide, et de triméthylorthoformate, utilisé comme desséchant, dans le méthanol anhydre²²⁵. A l'issue de 24 h d'agitation à reflux, seulement 2% de conversion ont été observés (Tableau 46, condition 1). Il a été décidé d'appliquer les conditions réactionnelles utilisées pour la synthèse du composé **237**. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 46. Les pourcentages de conversion indiqués ont été déterminés par LC/MS.

Condition	Réactifs (X eq)	Type de chauffage	Temps – Température	Résultats
1 ²²⁵	APTS (cat.) HC(OCH ₃) ₃ (5 eq)	Thermique	24 h – reflux	Conversion : 2%
2 ²²⁴	Me ₃ SiCl (4.4 eq)	μW	25 min – 80 °C 25 min – 80 °C	Conversion : 43% Conversion : 33%
3	APTS (2 eq) HC(OCH ₃) ₃ (5 eq)	μW	25 min – 80 °C	Conversion : totale Rdt : 60%

Tableau 46 : Conditions réactionnelles appliquées pour la synthèse du composé **238** à partir du composé **198**^{224, 225}

En utilisant le chlorure de triméthylsilyle dans le méthanol anhydre, une conversion de 43% en produit **238** a pu être observée après un chauffage sous micro-ondes de 25 min à 80 °C (condition 2). L’application d’une irradiation micro-ondes supplémentaire dans les mêmes conditions a conduit à une diminution de conversion (33%). Cela pourrait s’expliquer par le fait que l’eau libérée favorise l’hydrolyse de l’acétal puisqu’il n’y a pas de déshydratant dans le milieu réactionnel. Il a donc été décidé d’utiliser un excès d’APTS en présence de triméthylorthoformate comme déshydratant et d’appliquer un chauffage par irradiation micro-ondes de 25 min à 80 °C. Une conversion totale a ainsi été obtenue et le composé **238** a été isolé avec un rendement de 60% (condition 3).

Enfin, la réduction de la fonction carbonyle du composé **198** en une fonction alcool (**239**) a été effectuée dans l’éthanol en présence de borohydrure de sodium utilisé comme agent réducteur (Figure 157). Après 2 h d’agitation à température ambiante, les deux isomères présentant le groupement hydroxyle en position axiale ou en position équatoriale, ont été observés en LC/MS. Ces isomères ont été séparés par HPLC préparative et leur attribution a été effectuée grâce à une analyse RMN.

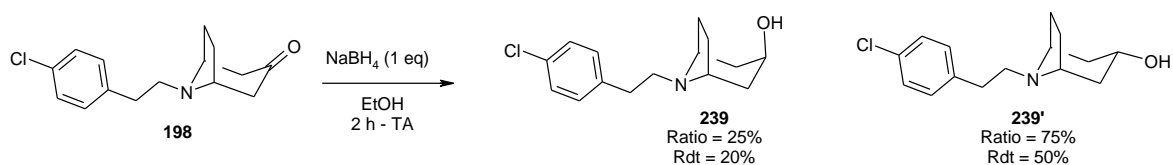


Figure 157 : Conditions de réduction appliquées pour la synthèse des composés **239** et **239'** à partir du composé **198**

L’amination réductrice de la fonction carbonyle du composé **198** a été effectuée à partir de la méthylamine en présence de cyanoborohydrure de sodium, utilisé en tant que réducteur, dans le méthanol. Après 72 h d’agitation à température ambiante, le composé **240** a été isolé avec un rendement de 83% (Figure 158)²²⁶.

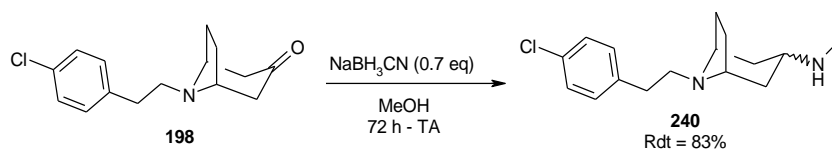


Figure 158 : Conditions d’amination réductrice appliquées pour la synthèse du composé **240** à partir du composé **198**²²⁶

L’affinité des composés **236** à **241** pour la protéine EthR₂ et leur aptitude à potentialiser l’activité de l’éthionamide sur bactéries ont ensuite été évaluées.

III.3.3. Résultats et discussion

Les différents résultats biologiques obtenus pour les composés **236** à **241** sont présentés dans le Tableau 47. L’EC₅₀ correspond à la puissance du composé à booster 10 fois l’activité de l’éthionamide. Cette EC₅₀ est obtenue sur la souche de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

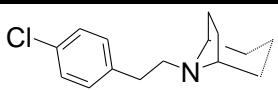
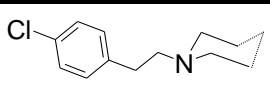


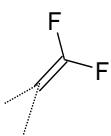
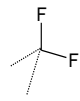
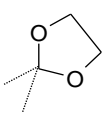
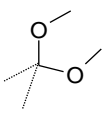
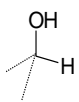
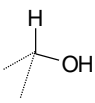
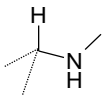
							
Composé	Substituant	ΔT_m (°C)	EC ₅₀ (μM)	Composé	Substituant	ΔT_m (°C)	EC ₅₀ (μM)
198, référence		0.6	> 30	227		0.3	> 30
236		0.6	> 30	241		0.3	> 30
237		0.1	> 30				
238		0.2	> 30				
239		0.0	> 30				
239'		0.0	> 30				
240		0.1	> 30				

Tableau 47 : Résultats biologiques obtenus pour les analogues 198, 227 et 236 à 241

Les résultats du Tableau 47 montrent que le remplacement de la fonction carbonyle par un groupement gem-difluorooléfine a permis de conserver l’affinité pour EthR₂ (**236**, $\Delta T_m = 0.6$ °C) tandis que l’introduction d’un groupement acétal cyclique (**237**) ou non cyclique (**238**), d’un groupement hydroxyle (**239** et **239'**) ou d’une amine secondaire (**240**) a entraîné une diminution de l’affinité. Le remplacement de la fonction carbonyle par un groupement difluoro-méthyle (**241**), sur

l’analogue pipéridine, permet de conserver l’affinité (**244**, $\Delta T_m = 0.3$ °C vs **227**, $\Delta T_m = 0.3$ °C). Néanmoins, comme le montrent les résultats du Tableau 47, aucun de ces composés n’a été capable de potentialiser l’activité de l’éthioamide sur bactéries ($EC_{50} > 30\mu M$). Nous avons donc cherché à diminuer la basicité de la molécule de référence **198** en introduisant des atomes de fluor à proximité de l’atome d’azote.

III.4. Remplacement de la fonction amine par une fonction amide et introduction d’atomes de fluor pour diminuer la basicité des composés

III.4.1. Introduction d’une fonction amide : synthèse, résultat et discussion

La première possibilité envisagée pour diminuer la basicité du composé **198** a été de synthétiser son analogue **243** possédant une fonction amide (Figure 159).

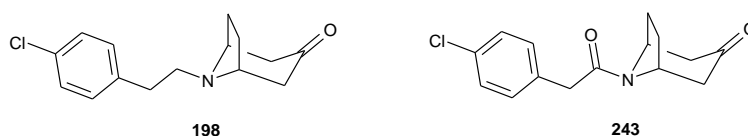


Figure 159 : Analogue **243** du composé **198** envisagé présentant une fonction amide

La synthèse du composé **243** a été effectuée à partir de l’intermédiaire activé 1-(benzotriazol-1-yl)-2-(4-chlorophényl)ethanone **242**²²⁷. Cet intermédiaire **242** a été obtenu par réaction de couplage entre l’acide 2-(4-chlorophényl) acétique et le 1H-benzotriazole, en présence de chlorure de thionyle, dans le DCM. Après 24h d’agitation à température ambiante le produit **242** a été isolé avec un rendement de 74% (Figure 160).

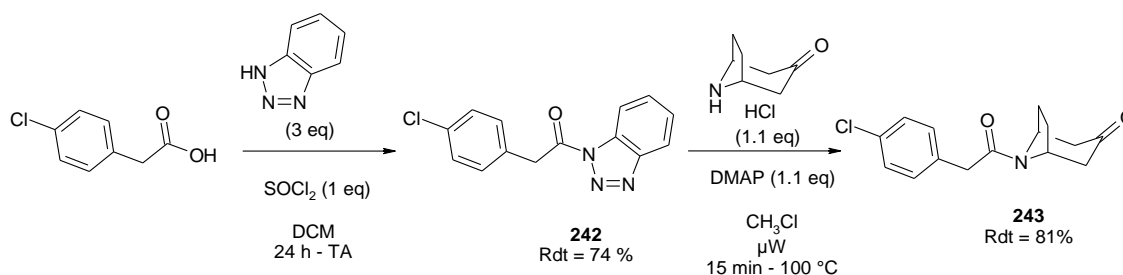


Figure 160 : Voie de synthèse effectuée pour isoler le composé **243** à partir de l’intermédiaire **242**

L’intermédiaire **242** a ensuite été engagé avec la nortropinone en présence de DMAP, utilisée comme base, dans le chloroforme. Ce mélange réactionnel a été soumis à un chauffage micro-ondes pendant 15 min à 100 °C pour obtenir le composé **243** qui a été isolé avec un rendement de 81%. L’affinité de ce composé **243** pour EthR₂ a été évaluée par TSA mais aucune affinité n’a été détectée ($\Delta T_m = -0.1$ °C). Ce résultat montre que la fonction amine est primordiale pour l’affinité du composé avec la protéine comme l’indique la structure cristallographique (Figure 134) où l’atome d’azote de cette fonction établit une liaison ionique avec le résidu Asp168. Il a donc été envisagé d’introduire des atomes de fluor afin de diminuer la basicité de la molécule tout en conservant cette liaison ionique.

III.4.2. Analogues envisagés

Il a été montré qu’il était possible de diminuer le pKa d’amines linéaires en substituant la position en β de l’atome d’azote par un ou plusieurs atome(s) de fluor (Tableau 48)²²⁸.

Amine Linéaire (β-substitution)	pKa	Amine Linéaire (β-substitution)	pKa
CH ₃ CH ₂ NH ₃ ⁺	10.7	CH ₃ CH ₂ N(CH ₃) ₂ H ⁺	10.2
F CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	9.0	F ₃ CCH ₂ N(CH ₃) ₂ H ⁺	4.8
F ₂ CHCH ₂ NH ₃ ⁺	7.3		
F ₃ CCH ₂ NH ₃ ⁺	5.7		

Tableau 48 : Effet de la substitution d'un ou plusieurs atome(s) de fluor sur le pKa de la fonction amine

Cette diminution est d’autant plus importante que le nombre d’atomes de fluor ajouté est grand. Ainsi, deux analogues présentant des atomes de fluor en position β de l’atome d’azote ont été envisagés. Les structures de ces composés sont présentées en Figure 161.

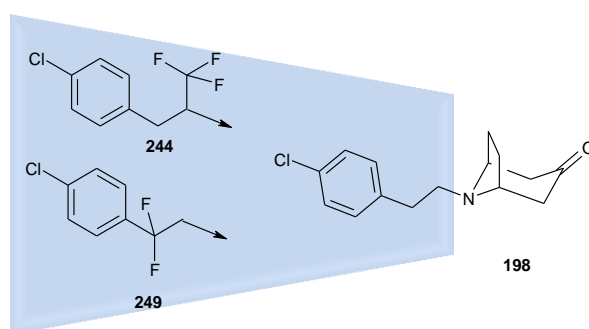


Figure 161 : Analogues du composé 198 envisagés présentant des atomes de fluor en position β de l’atome d’azote

III.4.2. Synthèses des analogues 244 et 249

La synthèse du composé **244** a d’abord été envisagée en utilisant la même stratégie²¹⁴ que celle appliquée pour la formation des composés **198** à **223**. Cette stratégie a consisté à faire réagir la 3-(4-chlorophényl)-1,1,1-trifluoropropyl-2-amine commercialement disponible sur IDABO **199** en milieu basique dans un mélange eau/éthanol (1/1) (Figure 162).

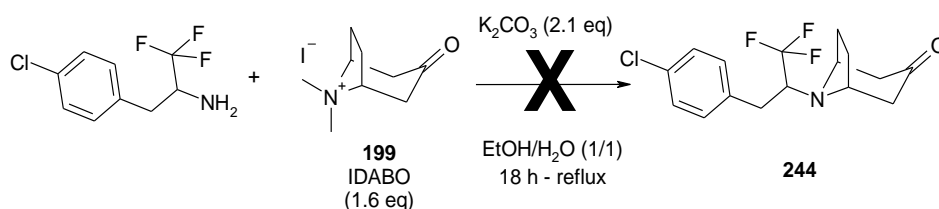


Figure 162 : Conditions réactionnelles appliquées pour la synthèse du composé **244** à partir de la 3-(4-chlorophényl)-1,1,1-trifluoropropyl-2-amine et d'IDABO **199**²¹⁴

Après 18 h de chauffage à reflux, le mélange réactionnel obtenu était très complexe et le composé **244** n’a pas été observé. Cette absence de réaction peut s’expliquer par la plus faible nucléophilie de l’atome d’azote de la 3-(4-chlorophenyl)-1,1,1-trifluoropropyl-2-amine due à la présence du groupement trifluorométhyle. De plus, la gêne stérique occasionnée par le pont aliphatique carboné du noyau nortropinone peut être une autre raison de la non formation du composé **244**. Il a donc été envisagé d’appliquer ces mêmes conditions réactionnelles à partir de l’iodure de 4,4-diméthyl-pipéridone **225** (Figure 163).

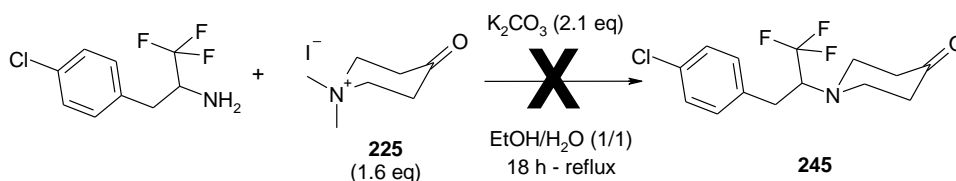


Figure 163 : Conditions réactionnelles appliquées pour la synthèse du composé **245** à partir de la 3-(4-chlorophenyl)-1,1,1-trifluoropropyl-2-amine et de l’iodure de 4,4-diméthyl-pipéridone **225**²¹⁴

Comme dans le cas précédent (Figure 162) le mélange réactionnel obtenu après 18 h de chauffage à reflux était très complexe sans pour autant observer le composé **245**. Ce résultat suggère que la gêne stérique n’est pas le paramètre bloquant pour la synthèse des composés **244** et **245**. Il a donc été décidé de synthétiser le composé **244** à partir d’une amination réductrice entre le 3-(4-chlorophenyl)-1,1,1-trifluoro-propan-2-one et la nortropinone (Figure 164).

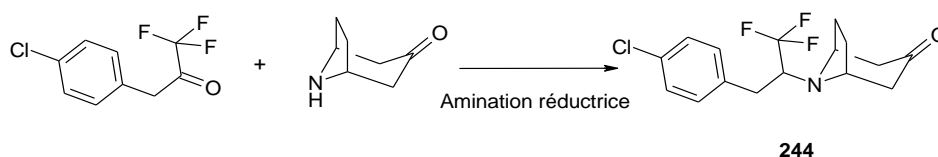


Figure 164 : Stratégie d’amination réductrice envisagée pour la synthèse du composé **244** à partir du 3-(4-chlorophenyl)-1,1,1-trifluoro-2-propanone et de la nortropinone

Cependant, le 3-(4-chlorophenyl)-1,1,1-trifluoro-propan-2-one, commercialement disponible, coûte cher (Enamine, 250mg – 105 euros). Avant de commander ce produit, il a été décidé de synthétiser le composé **246**, analogue du composé **244** avec un groupement méthyle à la place du groupement trifluorométhyle, afin de s’assurer que l’introduction d’un tel groupement en α de l’atome d’azote ne conduit pas à une perte d’affinité pour la protéine. En effet, la structure cristallographique montre que la poche de liaison à proximité de l’atome d’azote est étroite et peut difficilement accepter des substituants volumineux.

Les conditions réactionnelles utilisées pour la synthèse du composé **246** à partir de la 1-(4-chlorophenyl)propan-2-one, commercialement disponible, sont présentées en Figure 165²²⁹.

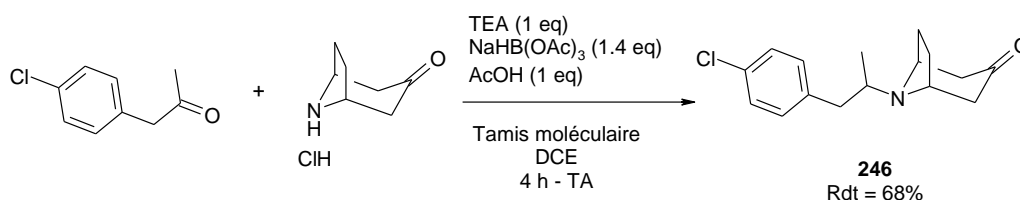


Figure 165 : Conditions réactionnelles d’amination réductrice appliquées pour la synthèse du composé **246** à partir de la 1-(4-chlorophenyl)propan-2-one et de la nortropinone²²⁹

Les conditions d’amination réductrice appliquées ont consisté à utiliser la triéthylamine (NEt₃) comme base, le triacétoxyborohydrure de sodium (NaHB(OAc)₃) comme agent réducteur et l’acide acétique (AcOH) pour augmenter le caractère électrophile de la fonction carbonyle. Cette réaction a été effectuée dans le dichloroéthane (DCE) en présence de tamis moléculaire pour capter l’eau formée. Après 4 h d’agitation à température ambiante, le composé **246** a été isolé avec un rendement de 68%. L’affinité de ce composé **246** pour la protéine EthR₂ a été évaluée par TSA et une diminution significative de l’affinité a été observée comparée à celle obtenue avec le composé de référence **198** sans le groupement méthyle (**246**, ΔT_m = 0.1 °C vs **198**, ΔT_m = 0.6 °C). Le composé **244** n’a donc finalement pas été synthétisé.

La synthèse du composé **249** a été envisagée en deux étapes : formation du composé **247** à partir d’IDABO **199** et du 2-amino-1-(4-chlorophényl)-éthanone²¹⁴ commercialement disponible puis fluoruration^{221, 222} du composé **247** pour conduire au composé **249** (Figure 166).

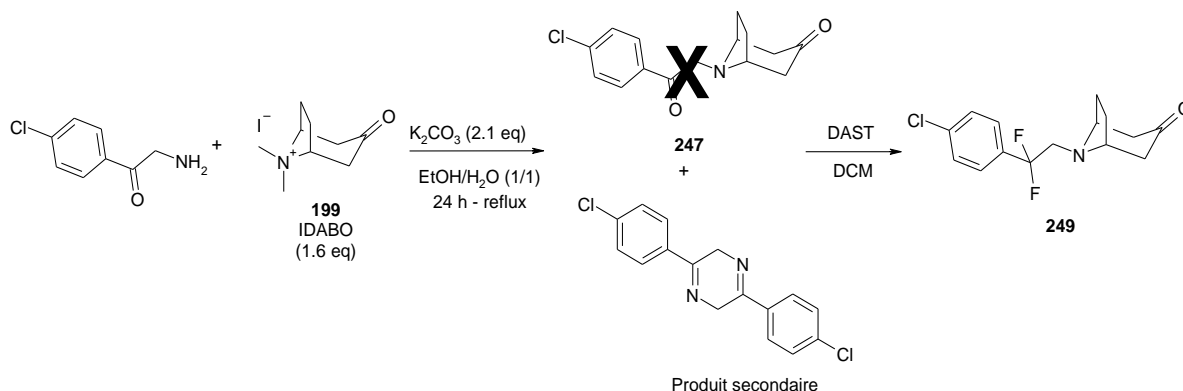


Figure 166 : Stratégie réactionnelle envisagée pour la synthèse du composé **247** à partir du 2-amino-1-(4-chlorophényl)-éthanone et d’IDABO **199**²¹⁴

En appliquant les mêmes conditions réactionnelles²¹⁴ que celles utilisées pour la synthèse des composés **198** à **223**, le composé désiré **247** n’a pas été observé. En revanche, la formation de la dihydropyrimidine issue de la réaction entre deux molécules de 2-amino-1-(4-chlorophényl)-éthanone, a été observé en LC/MS. La synthèse du composé **247** a donc été tentée par réaction de substitution nucléophile entre la nortropinone et la 2-bromo-4'-chloroacétophénone (Figure 167).

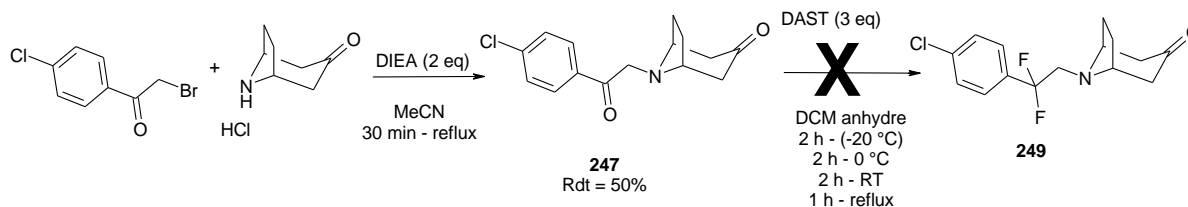


Figure 167 : Schéma réactionnel utilisé pour la synthèse du composé **247** à partir de la 2-bromo-4'-chloroacétophénone et de la nortropinone

En présence de DIEA, utilisée comme base, et après 30 min de chauffage à reflux, le composé **247** a été isolé avec un rendement de 50%. Il a ensuite été engagé dans la réaction de fluoruration en présence de DAST²²², dans le DCM anhydre. Après 2 h d’agitation à -20 °C, le composé désiré **249** n’a pas été observé. Le milieu réactionnel ne s’étant pas dégradé, la réaction a été laissée à 0 °C pendant 2 h. Après ces 2 h, aucune conversion ni dégradation n’ont été observées. En revanche, après 2 h à

température ambiante, le composé **249** n'a pas été observé mais de la dégradation a commencé à apparaître. Cette dégradation a été beaucoup plus importante après 1h de chauffage à reflux. Il a donc été décidé d'inverser l'ordre des deux étapes : d'abord fluorer la fonction carbonyle du produit 2-bromo-4'-chloroacétophénone pour aboutir au composé **248**²³⁰ puis formation du composé **249** par substitution nucléophile de **248** par la nortropinone (Figure 168).

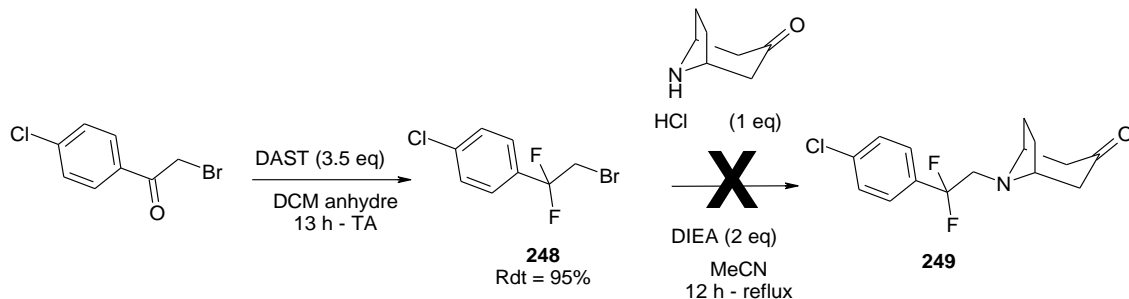


Figure 168 : Schéma réactionnel utilisé pour la synthèse du composé **248** à partir de la 2-bromo-4'-chloroacétophénone²³⁰

Le produit **248** a été obtenu par réaction entre la 2-bromo-4'-chloroacétophénone et le DAST, dans le DCM anhydre²³⁰. Après 13 h d'agitation à température ambiante, le composé **248** a été isolé avec un rendement de 95%. Il a été engagé dans la réaction de substitution nucléophile avec la nortropinone en utilisant exactement les mêmes conditions que celles appliquées pour la synthèse du composé **247**. Cependant, après 12 h de chauffage à reflux, le mélange réactionnel obtenu était très complexe et le composé **249** n'a pas été observé. D'autres conditions réactionnelles sont à l'étude pour parvenir à synthétiser le composé **249** (Figure 169).

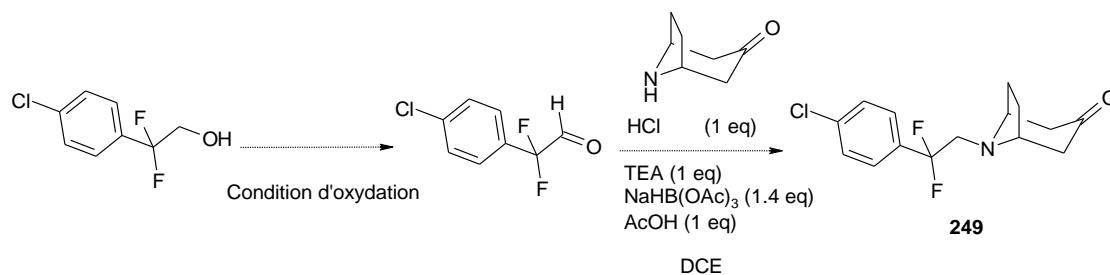


Figure 169 : Stratégie envisagée pour la synthèse du composé **249** à partir du 2-(4-chlorophényl)-2,2-difluoroéthanol

L'une d'entre elles consisterait à oxyder le 2-(4-chlorophényl)-2,2-difluoroéthanol pour obtenir l'aldéhyde correspondant qui pourrait être engagé dans une réaction d'amination réductrice avec la nortropinone pour conduire au composé **249** (

Figure 169).

Conclusion

Lors des travaux réalisés sur la recherche de potentialisateurs de l’activité de l’éthionamide, une nouvelle voie de bioactivation de cet antibiotique, indépendante de la monooxygénase EthA, a été découverte. Cette voie a été révélée par l’identification d’un inhibiteur d’un nouveau répresseur transcriptionnel appelé EthR₂. Cette inhibition entraîne la production d’une oxydo-réductase nommée EthA₂, qui participe à un nouveau processus de bioactivation de l’éthionamide. Dans ces conditions, la sensibilité des souches devenues résistantes à l’éthionamide par mutation dans le gène *ethA* est rétablie. L’objectif de ce travail a été d’identifier de nouveaux inhibiteurs d’EthR₂ selon une approche par fragments.

Un criblage de 960 fragments a permis d’identifier une famille de composés capables de se lier à EthR₂ et de l’empêcher de se fixer au promoteur d’*ethA*₂. Le mode de liaison du hit de référence **198** au domaine de régulation d’EthR₂ a été déterminé par cristallographie. A partir de cette structure cristallographique, un design rationnel a été effectué dans le but d’augmenter l’affinité des composés pour EthR₂ et d’accroître leur aptitude à inhiber l’interaction EthR₂/ADN. Ainsi, une quarantaine de composés ont été synthétisés et évalués dans deux tests biologiques différents. Le composé **198** a montré un $\Delta T_m = 0.6$ °C et une $pIC_{50} = 6.0$ dans ces deux tests.

Le remplacement du groupement 4-chlorophényle par un groupement 4-trifluorométhylphényle (**202**) ou par un groupement 4-iodophényle (**224**) a permis d’améliorer l’affinité des composés pour EthR₂ et a également permis d’augmenter leur capacité à inhiber l’interaction d’EthR₂ avec l’ADN (**202**, $\Delta T_m = 1.8$ °C ; $pIC_{50} = 6.7$ et **224**, $\Delta T_m = 1.5$ °C). De plus, une très bonne corrélation a été observée entre l’affinité pour EthR₂ et l’inhibition de l’interaction EthR₂/ADN validant ainsi le mode d’action de nos composés.

Cependant, aucun des composés synthétisés n’a été capable de potentialiser l’activité de l’éthionamide sur *Mycobacterium tuberculosis*. Ceci pourrait être dû au fait que les analogues présentent une très faible perméabilité bactérienne n’étant ainsi pas capables de cibler EthR₂ dans la bactérie. Deux hypothèses expliquant cette faible perméabilité ont été formulées : la présence d’un centre électrophile dû à la fonction carbonyle et/ou le caractère basique de la molécule dû à l’atome d’azote protonable. Des groupements bioisostères de la fonction carbonyle ont donc été introduits. Toutes les modifications envisagées ont toutefois conduit à des composés incapables de potentialiser l’activité bactéricide de l’éthionamide. Afin de diminuer le pKa de la molécule, il a été décidé d’introduire des atomes de fluor à proximité de l’atome d’azote. A l’heure actuelle, aucun des composés envisagés avec des atomes de fluor en position β de l’atome d’azote n’a pu être synthétisé. Cette dernière hypothèse n’a donc pas encore été vérifiée.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Le premier projet développé au cours de cette thèse a consisté en l'identification, via un criblage à haut débit, de molécules capables de moduler l'interaction protéique CD81/CLDN-1 empêchant ainsi l'entrée du virus de l'hépatite C (VHC) dans les hépatocytes. A partir du criblage de 14400 molécules drug-like, 4 composés capables d'inhiber l'infection virale (sur le modèle cellulaire VHCcc) ainsi que l'entrée virale (sur le modèle cellulaire VHCpp) de façon dose dépendante avec des IC_{50} de l'ordre du micromolaire ont été identifiés et sélectionnés. Ces 4 composés présentent un noyau thiéno[2,3-c]pyrazole substitué en position 1 par un méthyle, en position 3 par un phényle et en position 5 par une fonction amide elle-même reliée par l'atome d'azote, via une chaîne propyle, à une amine protonable (Figure 170).

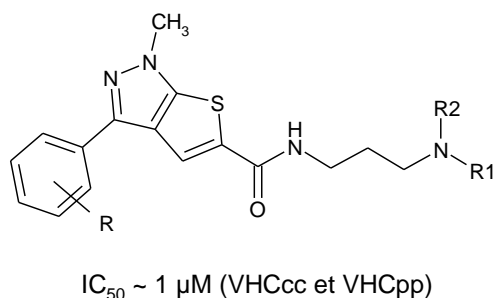


Figure 170 : Structure générale des 4 hits identifiés à l'issue du criblage des 14400 molécules

Différentes modifications structurales autour du composé de référence ont été effectuées. 70 analogues ont été synthétisés et leur aptitude à inhiber l'infection et l'entrée virales ont été évaluées. Ces modifications ont permis d'aboutir au composé **132** qui est 6 fois plus actif que le composé de référence ($IC_{50} = 0.3 \mu\text{M}$ sur VHCcc et $IC_{50} = 0.8 \mu\text{M}$ sur VHCpp). Cette molécule **132** (Figure 171) pourra désormais être utilisée comme outil pharmacologique afin non seulement de mieux comprendre le mécanisme d'entrée du VHC dans les hépatocytes impliquant le complexe CD81/CLDN-1 mais aussi de valider ce complexe protéique comme cible prometteuse dans la lutte contre le VHC.

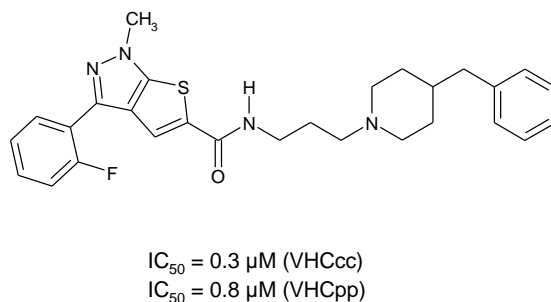


Figure 171 : Structure du composé **132** optimisé pouvant être utilisé comme outil pharmacologique

Cependant, le processus d'optimisation de telles molécules, présentant dès le départ des masses molaires élevées, n'a pas permis une amélioration efficace des composés rendant difficile l'accès à un candidat préclinique avec des propriétés physico-chimiques appropriées. C'est pour cette raison que pour la suite de nos recherches nous nous sommes orientés vers une approche utilisant des molécules plus simples, appelées fragments.

Afin d'enrichir la librairie de fragments de notre laboratoire avec des petites molécules possédant un carbone tétrasubstitué, le concept de fragments privilégiés a été introduit. Il consiste à utiliser une molécule rigide respectant la règle des 3, possédant un caractère tridimensionnel et pouvant être fonctionnalisée dans les trois directions de l'espace. 14 fragments originaux possédant un

Conclusion Générale

noyau 1,4-benzodiazepine-2,5-dione et 30 ayant un noyau spirohydantoïne ont ainsi été synthétisés à partir de voies réactionnelles développées sous irradiation micro-ondes (Figure 172).

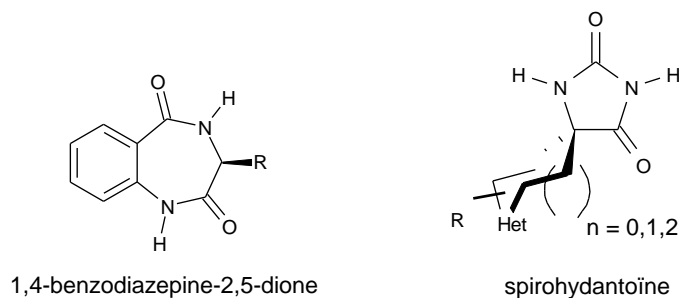


Figure 172 : Noyaux privilégiés 1,4-benzodiazepine-2,5-dione et spirohydantoin

Les structures tridimensionnelles de ces 44 fragments synthétisés ont été analysées et cette étude a permis de montrer que ces composés adoptaient des conformations moins linéaires ou moins planes que la plupart des fragments présents dans les chimiothèques commercialement disponibles. Par ailleurs, la solubilité aqueuse des 30 fragments comportant le noyau spirohydantoin a été mesurée et l'ensemble de ces fragments a montré une solubilité supérieure à 0.1 mM et le plus souvent proche du millimolaire.

Afin d'évaluer le potentiel de ces fragments privilégiés à occuper l'espace chimique, une librairie de spirohydantoin fonctionnalisées par des agents alkylants commercialement disponibles a été générée. Cette librairie virtuelle de 500 000 molécules a été criblée *in silico* sur la protéine MDM2 et 51 hits identifiés comme capables d'interagir avec cette cible ont été identifiés et sélectionnés. La synthèse de ces 51 hits est actuellement en cours et la mesure de leur activité *in vitro* permettra de valider l'intérêt de cette stratégie associée au design de fragments privilégiés pour la découverte de petites molécules capables de moduler des interactions protéine-protéine.

La dernière partie de cette thèse a consisté à appliquer cette approche par fragments pour la découverte d'inhibiteurs du répresseur transcriptionnel EthR₂ afin de potentialiser l'activité bactéricide de l'éthionamide sur les souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à cet antituberculeux. L'éthionamide est une prodrogue, utilisée dans le traitement de seconde intention contre la tuberculose, et qui a besoin d'être bioactivée dans la bactérie pour acquérir son activité bactéricide. Nous avons récemment mis en évidence, une nouvelle voie de bioactivation de l'éthionamide mettant en jeu une oxydoréductase mycobactérienne appelée EthA₂. L'expression de cette dernière est sous contrôle du répresseur transcriptionnel EthR₂ et nous avons pu montrer que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ce répresseur pouvait conduire à la re-sensibilisation des bactéries à l'éthionamide. Dans ce contexte, il a été décidé d'identifier de nouveaux inhibiteurs d'EthR₂ au travers d'une approche par fragments.

Le criblage de la librairie de fragments de notre laboratoire sur la protéine EthR₂ a permis d'identifier la molécule **198** capable non seulement de stabiliser EthR₂ ($\Delta T_m = 0.5$ °C) mais aussi d'empêcher sa fixation à l'ADN ($pIC_{50} = 6.0$). Cette molécule **198** présente un noyau tropinone dont l'atome d'azote est substitué par un groupement 4-chlorophénylyle. De plus, son mode de liaison avec EthR₂ a pu être déterminé par cristallographie.

Conclusion Générale

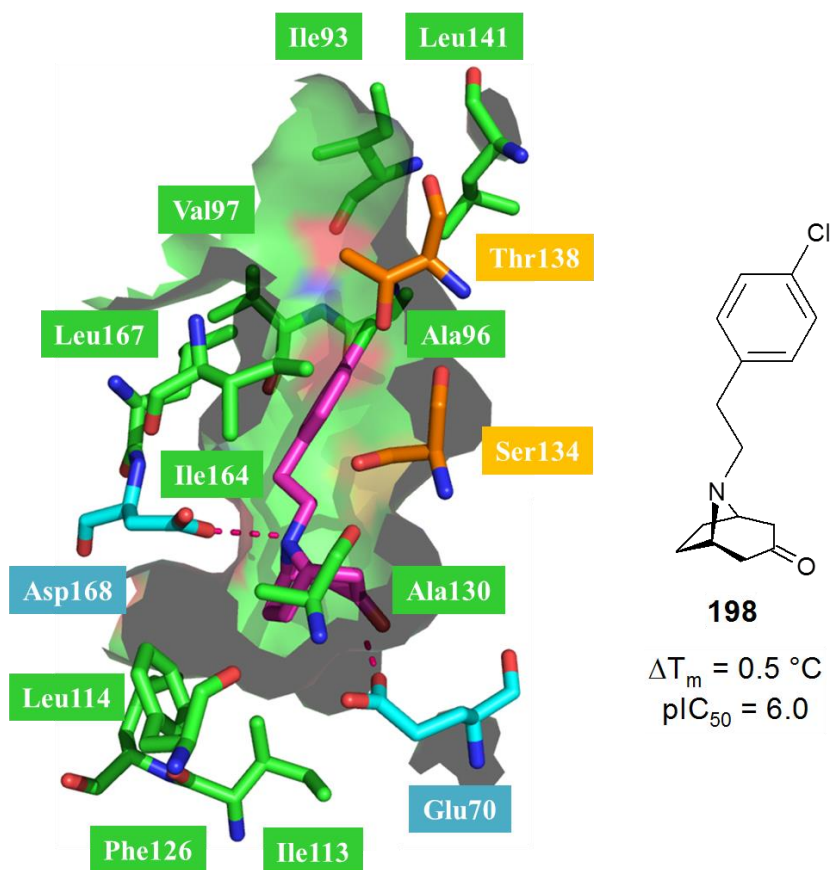


Figure 173 : Mode de liaison du composé **198** avec EthR₂ obtenu par cristallographie

Cette structure cristallographique révèle deux interactions majeures : une liaison ionique entre l'atome d'azote du composé **198** et le résidu Asp168 et une liaison hydrogène entre la fonction cétoné du noyau tropinone de **198** et le résidu Glu70. De plus, le pont du noyau tropinone occupe le bas de la poche hydrophobe d'EthR₂ délimitée par les résidus hydrophobes Ile113, Leu114 et Phe126. A partir de cette structure tridimensionnelle, un design rationnel d'une quarantaine d'analogues a été réalisé afin d'améliorer l'affinité du composé **198** pour EthR₂ et d'augmenter sa capacité à inhiber l'interaction entre EthR₂ et son opérateur ADN. Ce design rationnel a notamment porté sur des modifications autour du cycle phényle dans le but d'explorer la région hydrophobe délimitée par les résidus Ile93, Ala96, Val97, Leu141, Ile164 et Leu167 et également interagir avec les résidus polaires Ser134 et Thr138.

L'introduction de groupements polaires tels qu'un noyau pyridine (**211**) ou 2-chloroaniline à la place du groupement 4-chlorophényle n'a pas permis d'améliorer l'affinité des composés pour EthR₂. En revanche, l'introduction d'atomes de brome (**223**), d'iode (**224**) ou d'un groupement trifluorométhyle (**202**) à la place de l'atome de chlore a abouti à une augmentation de l'affinité ainsi qu'une meilleure capacité à empêcher la fixation d'EthR₂ à l'ADN ($\Delta T_m = 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$; $pIC_{50} = 6.1$, $\Delta T_m = 1.5 \text{ }^\circ\text{C}$ et $\Delta T_m = 1.8 \text{ }^\circ\text{C}$; $pIC_{50} = 6.7$ respectivement). Cette optimisation a permis de mettre en évidence une corrélation entre l'affinité des composés pour la protéine et leur capacité à inhiber l'interaction de la protéine avec EthR₂ (Figure 174). Cette corrélation permet de valider le mode d'action de nos composés.

Conclusion Générale

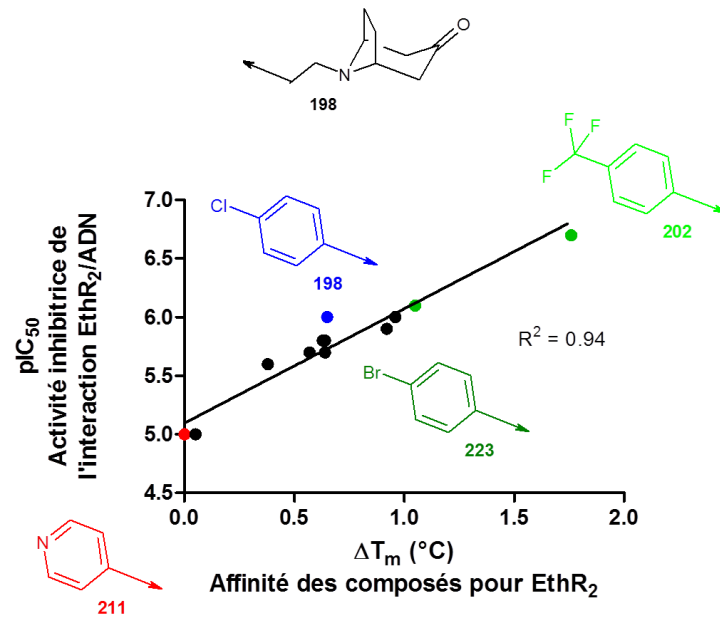


Figure 174 : Corrélation entre l'affinité des composés pour la protéine EthR₂ (ΔT_m en °C) et la capacité des composés à empêcher la fixation d'EthR₂ à son opérateur ADN (pIC₅₀)

Le mode de liaison du composé **202** obtenu par modélisation moléculaire est présenté en Figure 175. Il révèle que les deux interactions clés avec les résidus Glu70 et Asp168 peuvent être conservées. Par ailleurs, le groupement trifluorométhyle permet d'occuper plus efficacement le haut de la poche hydrophobe et ainsi interagir avec les résidus hydrophobes Ile93, Ala96, Val97, Leu141 et Leu163 ce qui pourrait expliquer le gain d'affinité observé avec ce composé **202**.

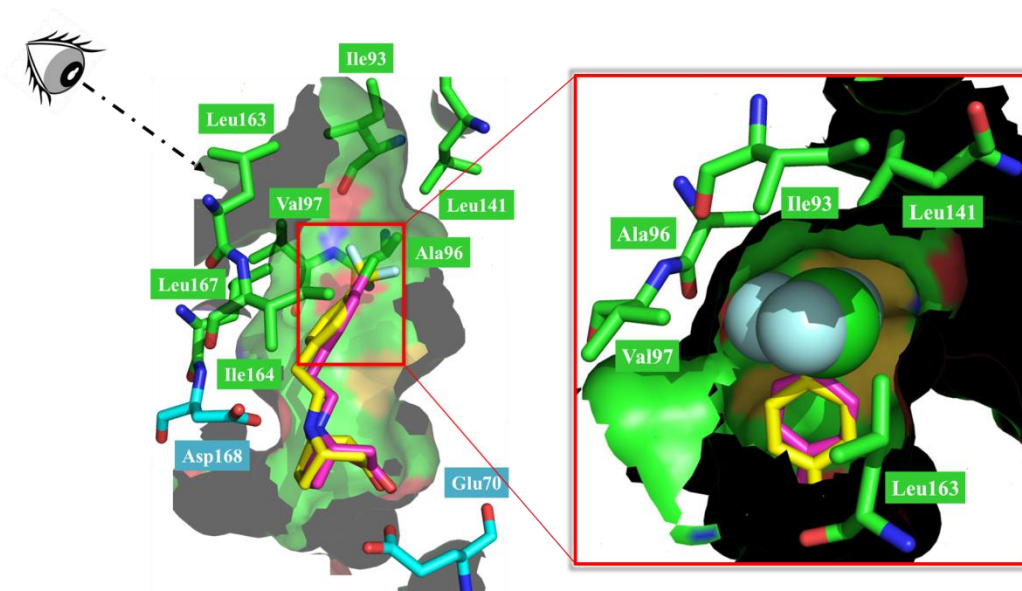


Figure 175 : Superposition dans la poche de liaison d'EthR₂ du composé de référence 198 (couleur magenta) obtenu par cristallographie et du composé 202 (couleur jaune) obtenu par modélisation moléculaire

Néanmoins, aucun des composés synthétisés n'a été capable de potentialiser l'activité de l'éthionamide sur la bactérie. Nous avons donc fait l'hypothèse que cela pouvait être dû à la très faible

Conclusion Générale

perméabilité de nos composés à cause de la présence d'un centre électrophile réactif et/ou du caractère basique de la molécule. Des groupements bioisostères de la fonction carbonyle ont donc été introduits mais aucun des analogues synthétisés n'a été capable de potentialiser *in vitro* l'activité de l'éthionamide. Afin de diminuer le pKa de la molécule de référence, il a été envisagé d'introduire des atomes de fluor à proximité de l'atome d'azote du noyau nortropinone. Plusieurs voies de synthèse ont été testées pour aboutir aux composés présentant deux ou trois atomes de fluor, mais aucune ne s'est encore révélée fructueuse. Des travaux sont actuellement en cours pour synthétiser ces produits afin de pouvoir les tester sur la bactérie et ainsi confirmer l'hypothèse qu'une diminution de la basicité des composés pourrait améliorer leur perméabilité bactérienne.

Bibliographie

Bibliographie

1. Lozano, R.; Naghavi, M.; Foreman, K.; Lim, S.; Shibuya, K.; Aboyans, V.; Abraham, J.; Yeh, P. H.; Yip, P.; Zabetian, A.; Zheng, Z. J.; Lopez, A. D.; Murray, C. J.; AlMazroa, M. A.; Memish, Z. A. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **2012**, *380*, 2095-128.
2. Hajarizadeh, B.; Grebely, J.; Dore, G. J. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2013**, *10*, 553-62.
3. Guerra, J.; Garenne, M.; Mohamed, M. K.; Fontanet, A. HCV burden of infection in Egypt: results from a nationwide survey. *J Viral Hepat* **2012**, *19*, 560-7.
4. Nerrienet, E.; Pouillot, R.; Lachenal, G.; Njouom, R.; Mfoupouendoun, J.; Bilong, C.; Mauciere, P.; Pasquier, C.; Ayouba, A. Hepatitis C virus infection in cameroon: A cohort-effect. *J Med Virol* **2005**, *76*, 208-14.
5. Alter, H. J.; Houghton, M. Clinical Medical Research Award. Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. *Nat Med* **2000**, *6*, 1082-6.
6. Lee, M. H.; Yang, H. I.; Yuan, Y.; L'Italien, G.; Chen, C. J. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* **2014**, *20*, 9270-80.
7. Thomas, D. L. Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. *Nat Med* **2013**, *19*, 850-8.
8. Cox, A. L.; Netski, D. M.; Mosbrugger, T.; Sherman, S. G.; Strathdee, S.; Ompad, D.; Vlahov, D.; Chien, D.; Shyamala, V.; Ray, S. C.; Thomas, D. L. Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* **2005**, *40*, 951-8.
9. Lauer, G. M.; Walker, B. D. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **2001**, *345*, 41-52.
10. Gill, K.; Ghazinian, H.; Manch, R.; Gish, R. Hepatitis C virus as a systemic disease: reaching beyond the liver. *Hepatol Int* **2016**, *10*, 415-23.
11. Cacoub, P.; Comarmond, C.; Domont, F.; Savey, L.; Desbois, A. C.; Saadoun, D. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Ther Adv Infect Dis* **2016**, *3*, 3-14.
12. Thomas, D. L.; Astemborski, J.; Rai, R. M.; Anania, F. A.; Schaeffer, M.; Galai, N.; Nolt, K.; Nelson, K. E.; Strathdee, S. A.; Johnson, L.; Laeyendecker, O.; Boitnott, J.; Wilson, L. E.; Vlahov, D. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA* **2000**, *284*, 450-6.
13. Poynard, T.; Bedossa, P.; Opolon, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* **1997**, *349*, 825-32.
14. Sánchez-Quijano, A.; Andreu, J.; Gavilán, F.; Luque, F.; Abad, M. A.; Soto, B.; Muñoz, J.; Aznar, J. M.; Leal, M.; Lissen, E. Influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on the natural course of chronic parenterally acquired hepatitis C. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1995**, *14*, 949-53.
15. El-Serag, H. B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **2012**, *142*, 1264-73.
16. Ansal di, F.; Orsi, A.; Sticchi, L.; Bruzzone, B.; Icardi, G. Hepatitis C virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World J Gastroenterol* **2014**, *20*, 9633-52.
17. Duffy, S.; Shackelton, L. A.; Holmes, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet* **2008**, *9*, 267-76.
18. Smith, D. B.; Bukh, J.; Kuiken, C.; Muerhoff, A. S.; Rice, C. M.; Stapleton, J. T.; Simmonds, P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* **2014**, *59*, 318-27.
19. Scheel, T. K.; Rice, C. M. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med* **2013**, *19*, 837-49.
20. Choo, Q. L.; Kuo, G.; Weiner, A. J.; Overby, L. R.; Bradley, D. W.; Houghton, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **1989**, *244*, 359-62.
21. Moradpour, D.; Penin, F.; Rice, C. M. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* **2007**, *5*, 453-63.
22. Holmes, J. A.; Thompson, A. J. Interferon-free combination therapies for the treatment of hepatitis C: current insights. *Hepat Med* **2015**, *7*, 51-70.

Bibliographie

23. Chevaliez, S.; Pawlotsky, J. M. Virology of hepatitis C virus infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **2012**, *26*, 381-9.
24. Dubuisson, J.; Cosset, F. L. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *J Hepatol* **2014**, *61*, 3-13.
25. Neumann, A. U.; Lam, N. P.; Dahari, H.; Gretch, D. R.; Wiley, T. E.; Layden, T. J.; Perelson, A. S. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **1998**, *282*, 103-7.
26. Poynard, T.; Leroy, V.; Cohard, M.; Thevenot, T.; Mathurin, P.; Opolon, P.; Zarski, J. P. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. *Hepatology* **1996**, *24*, 778-89.
27. Poynard, T.; Marcellin, P.; Lee, S. S.; Niederau, C.; Minuk, G. S.; Ideo, G.; Bain, V.; Heathcote, J.; Zeuzem, S.; Trepo, C.; Albrecht, J. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* **1998**, *352*, 1426-32.
28. McHutchison, J. G.; Gordon, S. C.; Schiff, E. R.; Shiffman, M. L.; Lee, W. M.; Rustgi, V. K.; Goodman, Z. D.; Ling, M. H.; Cort, S.; Albrecht, J. K. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* **1998**, *339*, 1485-92.
29. Feld, J. J.; Hoofnagle, J. H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **2005**, *436*, 967-72.
30. Barth, H. Hepatitis C virus: Is it time to say goodbye yet? Perspectives and challenges for the next decade. *World J Hepatol* **2015**, *7*, 725-37.
31. Diatta, T.; Chavade, D.; Degos, F.; d'Andon, A.; Guillevin, L. [Hepatitis C infection: Therapeutic strategies]. *Presse Med* **2016**.
32. Asselah, T. Sofosbuvir for the treatment of hepatitis C virus. *Expert Opin Pharmacother* **2014**, *15*, 121-30.
33. Gentile, I.; Maraolo, A. E.; Buonomo, A. R.; Zappulo, E.; Borgia, G. The discovery of sofosbuvir: a revolution for therapy of chronic hepatitis C. *Expert Opin Drug Discov* **2015**, *10*, 1363-77.
34. Zeuzem, S.; Dusheiko, G. M.; Salupere, R.; Mangia, A.; Flisiak, R.; Hyland, R. H.; Illeperuma, A.; Svarovskaia, E.; Brainard, D. M.; Symonds, W. T.; Subramanian, G. M.; McHutchison, J. G.; Weiland, O.; Reesink, H. W.; Ferenci, P.; Hézode, C.; Esteban, R.; Investigators, V. Sofosbuvir and ribavirin in HCV genotypes 2 and 3. *N Engl J Med* **2014**, *370*, 1993-2001.
35. Tamori, A.; Enomoto, M.; Kawada, N. Recent Advances in Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C. *Mediators Inflamm* **2016**, *2016*, 1-11.
36. Dabbouseh, N. M.; Jensen, D. M. Future therapies for chronic hepatitis C. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2013**, *10*, 268-76.
37. Zeisel, M. B.; Crouch, E.; Baumert, T. F.; Schuster, C. Host-Targeting Agents to Prevent and Cure Hepatitis C Virus Infection. *Viruses* **2015**, *7*, 5659-85.
38. Zhu, Y.-Z.; Qian, X.-J.; Zhao, P.; Qi, Z.-T. How hepatitis C virus invades hepatocytes: the mystery of viral entry. *World J Gastroenterol* **2014**, *20*, 3457-67.
39. Helle, F.; Dubuisson, J. Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci* **2008**, *65*, 100-12.
40. Fénéant, L.; Levy, S.; Cocquerel, L. CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses* **2014**, *6*, 535-72.
41. Harris, H. J.; Farquhar, M. J.; Mee, C. J.; Davis, C.; Reynolds, G. M.; Jennings, A.; Hu, K.; Yuan, F.; Deng, H.; Hubscher, S. G.; Han, J. H.; Balfe, P.; McKeating, J. A. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* **2008**, *82*, 5007-20.
42. Harris, H. J.; Davis, C.; Mullins, J. G.; Hu, K.; Goodall, M.; Farquhar, M. J.; Mee, C. J.; McCaffrey, K.; Young, S.; Drummer, H.; Balfe, P.; McKeating, J. A. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 21092-102.
43. Zona, L.; Lupberger, J.; Sidahmed-Adrar, N.; Thumann, C.; Harris, H. J.; Barnes, A.; Florentin, J.; Tawar, R. G.; Xiao, F.; Turek, M.; Durand, S. C.; Duong, F. H.; Heim, M. H.; Cosset, F. L.; Hirsch, I.; Samuel, D.; Brino, L.; Zeisel, M. B.; Le Naour, F.; McKeating, J. A.; Baumert, T. F.

Bibliographie

- HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* **2013**, 13, 302-13.
44. McMahon, H. T.; Boucrot, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2011**, 12, 517-33.
45. Farquhar, M. J.; Hu, K.; Harris, H. J.; Davis, C.; Brimacombe, C. L.; Fletcher, S. J.; Baumert, T. F.; Rappoport, J. Z.; Balfe, P.; McKeating, J. A. Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J Virol* **2012**, 86, 4305-16.
46. Xiao, F.; Fofana, I.; Heydmann, L.; Barth, H.; Soulier, E.; Habersetzer, F.; Doffoël, M.; Bukh, J.; Patel, A. H.; Zeisel, M. B.; Baumert, T. F. Hepatitis C virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents. *PLoS Pathog* **2014**, 10, 1-15.
47. Qian, X. J.; Zhu, Y. Z.; Zhao, P.; Qi, Z. T. Entry inhibitors: New advances in HCV treatment. *Emerg Microbes Infect* **2016**, 5, 1-8.
48. Xiao, F.; Fofana, I.; Thumann, C.; Mailly, L.; Alles, R.; Robinet, E.; Meyer, N.; Schaeffer, M.; Habersetzer, F.; Doffoël, M.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Zeisel, M. B.; Baumert, T. F. Synergy of entry inhibitors with direct-acting antivirals uncovers novel combinations for prevention and treatment of hepatitis C. *Gut* **2015**, 64, 483-94.
49. Couturier, C.; Deprez, B. Setting up a bioluminescence resonance energy transfer high throughput screening assay to search for protein/protein interaction inhibitors in mammalian cells. *Front. Endocrinol.* **2012**, 3, 1-13.
50. Bacart, J.; Corbel, C.; Jockers, R.; Bach, S.; Couturier, C. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol J* **2008**, 3, 311-24.
51. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, 46, 3-26.
52. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* **2002**, 45, 2615-23.
53. Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mügge, C.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. The uronium/guanidinium Peptide coupling reagents: finally the true uronium salts. *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, 41, 441-5.
54. Manetti, D.; Ghelardini, C.; Bartolini, A.; Dei, S.; Galeotti, N.; Gualtieri, F.; Romanelli, M. N.; Teodori, E. Molecular simplification of 1,4-diazabicyclo[4.3.0]nonan-9-ones gives piperazine derivatives that maintain high nootropic activity. *J Med Chem* **2000**, 43, 4499-507.
55. Flipo, M.; Desroses, M.; Lecat-Guillet, N.; Villemagne, B.; Blondiaux, N.; Leroux, F.; Piveteau, C.; Mathys, V.; Flament, M. P.; Siepmann, J.; Villeret, V.; Wohlkönig, A.; Wintjens, R.; Soror, S. H.; Christophe, T.; Jeon, H. K.; Locht, C.; Brodin, P.; Déprez, B.; Baulard, A. R.; Willand, N. Ethionamide boosters. 2. Combining bioisosteric replacement and structure-based drug design to solve pharmacokinetic issues in a series of potent 1,2,4-oxadiazole EthR inhibitors. *J Med Chem* **2012**, 55, 68-83.
56. Becher, J.; Jorgensen, P. L.; Pluta, K.; Krake, N. J.; Fält-Hansen, B. Azide Ring-Opening-Ring-Closure Reactions and Tele-substitutions in Vicinal Azidopyrazole-, Pyrrole- and Indolecarboxaldehydes. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2128-34.
57. Brodin, P.; Christophe, T.; No, Z.; Kim, J.; Genovesio, A.; *et al.* Anti-infective compounds. **2010**, WO 2010/003533 A2.
58. Kvitko, Y. Synthesis of derivatives of thieno[2,3-c]pyrazole and thieno[2,3-d]thiazoline. *Chem. Hetero. Comp.* **1969**, 5, 760-1.
59. Bigot, A.; Clerc, F.; Doerflinger, G.; Mignani, S.; Minoux, H. Substituted thieno[2,3-c]pyrazoles and their use as medicinal products. **2005**, US 2005/0026984 A1.
60. Murray, C. W.; Rees, D. C. The rise of fragment-based drug discovery. *Nat Chem* **2009**, 1, 187-92.
61. Gribbon, P.; Sewing, A. High-throughput drug discovery: what can we expect from HTS? *Drug Discov Today* **2005**, 10, 17-22.
62. Macarron, R. Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug Discov Today* **2006**, 11, 277-9.

Bibliographie

63. Jencks, W. P. On the attribution and additivity of binding energies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**, 78, 4046-50.
64. Verlinde, C. L.; Rudenko, G.; Hol, W. G. In search of new lead compounds for trypanosomiasis drug design: a protein structure-based linked-fragment approach. *J Comput Aided Mol Des* **1992**, 6, 131-47.
65. Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **1996**, 274, 1531-4.
66. Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W. Discovering high-affinity ligands for proteins. *Science* **1997**, 278, 497-99.
67. Hajduk, P. J.; Greer, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, 6, 211-9.
68. Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H. A 'rule of three' for fragment-based lead discovery? *Drug Discov Today* **2003**, 8, 876-7.
69. Jhoti, H.; Williams, G.; Rees, D. C.; Murray, C. W. The 'rule of three' for fragment-based drug discovery: where are we now? *Nat Rev Drug Discov* **2013**, 12, 644-5.
70. Lipinski, C.; Hopkins, A. Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature* **2004**, 432, 855-61.
71. Bohacek, R. S.; McMartin, C.; Guida, W. C. The Art and Practice of Structure-Based Drug Design: a molecular modeling perspective. *Med Res Rev* **1996**, 16, 3-50.
72. Blum, L. C.; Raymond, J. L. 970 million druglike small molecules for virtual screening in the chemical universe database GDB-13. *J Am Chem Soc* **2009**, 131, 8732-3.
73. Hann, M. M.; Leach, A. R.; Harper, G. Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery. *J Chem Inf Comput Sci* **2001**, 41, 856-64.
74. Rees, D. C.; Congreve, M.; Murray, C. W.; Carr, R. Fragment-based lead discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, 3, 660-72.
75. Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discov Today* **2004**, 9, 430-1.
76. Scott, D. E.; Coyne, A. G.; Hudson, S. A.; Abell, C. Fragment-based approaches in drug discovery and chemical biology. *Biochemistry* **2012**, 51, 4990-5003.
77. Villemagne, B.; Flipo, M.; Blondiaux, N.; Crauste, C.; Malaquin, S.; Leroux, F.; Piveteau, C.; Villeret, V.; Brodin, P.; Villoutreix, B. O.; Sperandio, O.; Soror, S. H.; Wohlkönig, A.; Wintjens, R.; Deprez, B.; Baulard, A. R.; Willand, N. Ligand efficiency driven design of new inhibitors of Mycobacterium tuberculosis transcriptional repressor EthR using fragment growing, merging, and linking approaches. *J Med Chem* **2014**, 57, 4876-88.
78. Murray, C. W.; Blundell, T. L. Structural biology in fragment-based drug design. *Curr Opin Struct Biol* **2010**, 20, 497-507.
79. Bollag, G.; Tsai, J.; Zhang, J.; Zhang, C.; Ibrahim, P.; Nolop, K.; Hirth, P. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2012**, 11, 873-86.
80. Hayes, D. F.; Bunn Jr, P. A. Venetoclax Approved for CLL. *Cancer Discov* **2016**, 6, 564-64.
81. Baker, M. Fragment-based lead discovery grows up. *Nat Rev Drug Discov* **2013**, 12, 5-7.
82. Boyd, S. M.; de Kloe, G. E. Fragment library design: efficiently hunting drugs in chemical space. *Drug Discov Today Technol* **2010**, 7, 173-80.
83. Chen, H.; Zhou, X.; Wang, A.; Zheng, Y.; Gao, Y.; Zhou, J. Evolutions in fragment-based drug design: the deconstruction-reconstruction approach. *Drug Discov Today* **2015**, 20, 105-13.
84. Köster, H.; Craan, T.; Brass, S.; Herhaus, C.; Zentgraf, M.; Neumann, L.; Heine, A.; Klebe, G. A small nonrule of 3 compatible fragment library provides high hit rate of endothiapepsin crystal structures with various fragment chemotypes. *J Med Chem* **2011**, 54, 7784-96.
85. Law, R.; Barker, O.; Barker, J. J.; Hestekamp, T.; Godemann, R.; Andersen, O.; Fryatt, T.; Courtney, S.; Hallett, D.; Whittaker, M. The multiple roles of computational chemistry in fragment-based drug design. *J Comput Aided Mol Des* **2009**, 23, 459-73.
86. Blomberg, N.; Cosgrove, D. A.; Kenny, P. W.; Kolmodin, K. Design of compound libraries for fragment screening. *J Comput Aided Mol Des* **2009**, 23, 513-25.
87. Morley, A. D.; Pugliese, A.; Birchall, K.; Bower, J.; Brennan, P.; Brown, N.; Chapman, T.; Drysdale, M.; Gilbert, I. H.; Hoelder, S.; Jordan, A.; Ley, S. V.; Merritt, A.; Miller, D.; Swarbrick, M.

Bibliographie

- E.; Wyatt, P. G. Fragment-based hit identification: thinking in 3D. *Drug Discov Today* **2013**, *18*, 1221-7.
88. Keseru, G. M.; Erlanson, D. A.; Ferenczy, G. G.; Hann, M. M.; Murray, C. W.; Pickett, S. D. Design principles for fragment libraries - Maximizing the value of learnings from Pharma fragment based drug discovery (FBDD) programs for use in academia. *J Med Chem* **2016**, *59*, 8189-206.
89. Krier, M.; Bret, G.; Rognan, D. Assessing the scaffold diversity of screening libraries. *J Chem Inf Model* **2006**, *46*, 512-24.
90. Lau, W. F.; Withka, J. M.; Hepworth, D.; Magee, T. V.; Du, Y. J.; Bakken, G. A.; Miller, M. D.; Hendsch, Z. S.; Thanabal, V.; Kolodziej, S. A.; Xing, L.; Hu, Q.; Narasimhan, L. S.; Love, R.; Charlton, M. E.; Hughes, S.; van Hoorn, W. P.; Mills, J. E. Design of a multi-purpose fragment screening library using molecular complexity and orthogonal diversity metrics. *J Comput Aided Mol Des* **2011**, *25*, 621-36.
91. Swain, C. Cambridge MedChem Consulting Home page. http://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/hit_identification/FragmentLibraryProfiles.html (Last updated 27 March **2016**).
92. Hall, R. J.; Mortenson, P. N.; Murray, C. W. Efficient exploration of chemical space by fragment-based screening. *Prog Biophys Mol Biol* **2014**, *116*, 82-91.
93. Hung, A. W.; Ramek, A.; Wang, Y.; Kaya, T.; Wilson, J. A.; Clemons, P. A.; Young, D. W. Route to three-dimensional fragments using diversity-oriented synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 6799-804.
94. Ritchie, T. J.; Macdonald, S. J. The impact of aromatic ring count on compound developability--are too many aromatic rings a liability in drug design? *Drug Discov Today* **2009**, *14*, 1011-20.
95. Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *J Med Chem* **2009**, *52*, 6752-6.
96. Ritchie, T. J.; Ertl, P.; Lewis, R. The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. *Drug Discov Today* **2011**, *16*, 65-72.
97. Ritchie, T. J.; Macdonald, S. J.; Young, R. J.; Pickett, S. D. The impact of aromatic ring count on compound developability: further insights by examining carbo- and hetero-aromatic and -aliphatic ring types. *Drug Discov Today* **2011**, *16*, 164-71.
98. Wilde, F.; Link, A. Advances in the design of a multipurpose fragment screening library. *Expert Opin Drug Discov* **2013**, *8*, 597-606.
99. Sauer, W. H.; Schwarz, M. K. Molecular shape diversity of combinatorial libraries: a prerequisite for broad bioactivity. *J Chem Inf Comput Sci* **2003**, *43*, 987-1003.
100. Ertl, P.; Schuffenhauer, A. Cheminformatics analysis of natural products: lessons from nature inspiring the design of new drugs. *Prog Drug Res* **2008**, *66*, 217, 219-35.
101. Beghyn, T.; Deprez-Poulain, R.; Willand, N.; Folleas, B.; Deprez, B. Natural compounds: leads or ideas? Bioinspired molecules for drug discovery. *Chem Biol Drug Des* **2008**, *72*, 3-15.
102. Feher, M.; Schmidt, J. M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J Chem Inf Comput Sci* **2003**, *43*, 218-27.
103. Ertl, P.; Roggo, S.; Schuffenhauer, A. Natural product-likeness score and its application for prioritization of compound libraries. *J Chem Inf Model* **2008**, *48*, 68-74.
104. Over, B.; Wetzel, S.; Grütter, C.; Nakai, Y.; Renner, S.; Rauh, D.; Waldmann, H. Natural-product-derived fragments for fragment-based ligand discovery. *Nat Chem* **2013**, *5*, 21-8.
105. Vu, H.; Roullier, C.; Campitelli, M.; Trenholme, K. R.; Gardiner, D. L.; Andrews, K. T.; Skinner-Adams, T.; Crowther, G. J.; Van Voorhis, W. C.; Quinn, R. J. Plasmodium gametocyte inhibition identified from a natural-product-based fragment library. *ACS Chem Biol* **2013**, *8*, 2654-9.
106. Yu, B.; Zheng, Y. C.; Shi, X. J.; Qi, P. P.; Liu, H. M. Natural product-derived spirooxindole fragments serve as privileged substructures for discovery of new anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem* **2016**, *16*, 1315-24.
107. Analyticon Discovery Home page. <http://www.ac-discovery.com/content/Products&Technologies/FragmentsFromNature.php> (Last updated 23 May **2016**).

Bibliographie

108. Morgan, K. F.; Hollingsworth, I. A.; Bull, J. A. 2-(Aryl-sulfonyl)oxetanes as designer 3-dimensional fragments for fragment screening: synthesis and strategies for functionalisation. *Chem Commun (Camb)* **2014**, 50, 5203-5.
109. Tran, N. C.; Dhondt, H.; Flipo, M.; Deprez, B.; Willand, N. Synthesis of functionalized 2-isoxazolines as three-dimensional fragments for fragment-based drug discovery. *Tet. Lett.* **2015**, 56.
110. Stotani, S.; Lorenz, C.; Winkler, M.; Medda, F.; Picazo, E.; Ortega Martinez, R.; Karawajczyk, A.; Sanchez-Quesada, J.; Giordanetto, F. Design and synthesis of Fsp3-rich, bis-spirocyclic-based compound libraries for biological screening. *ACS Comb Sci* **2016**, 18, 330-6.
111. Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J Med Chem* **1988**, 31, 2235-46.
112. Welsch, M. E.; Snyder, S. A.; Stockwell, B. R. Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* **2010**, 14, 347-61.
113. Mueller, K. Cambridge MedChem Consulting Home page. http://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/hit_identification/privileged_structures.html (Updated March **2012**).
114. Murray, C. W.; Rees, D. C. Opportunity Knocks: Organic Chemistry for Fragment-Based Drug Discovery (FBDD). *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, 55, 488-92.
115. Keating, T. A.; Armstrong, R. W. A Remarkable Two-Step Synthesis of Diverse 1,4-Benzodiazepine-2,5-diones Using the Ugi Four-Component Condensation. *J Org Chem* **1996**, 61, 8935-8939.
116. Wright, W. B.; Brabander, H. J.; Greenblatt, E. N.; Day, I. P.; Hardy, R. A. Derivatives of 1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-5,11(10H)-dione as anxiolytic agents. *J Med Chem* **1978**, 21, 1087-9.
117. Yaari, Y.; Selzer, M. E.; Pincus, J. H. Phenytoin: mechanisms of its anticonvulsant action. *Ann Neurol* **1986**, 20, 171-84.
118. Decensi, A.; Guarneri, D.; Paoletti, M. C.; Lalanne, J. M.; Merlo, F.; Boccardo, F. Phase II study of the pure non-steroidal antiandrogen nilutamide in prostatic cancer. Italian Prostatic Cancer Project (PONCAP). *Eur J Cancer* **1991**, 27, 1100-4.
119. Matsuda, T.; Okuda, A.; Watanabe, Y.; Miura, T.; Ozawa, H.; Tosaka, A.; Yamazaki, K.; Yamaguchi, Y.; Kurobuchi, S.; Koura, M.; Shibuya, K. Design and discovery of 2-oxochromene derivatives as liver X receptor β -selective agonists. *Bioorg Med Chem Lett* **2015**, 25, 1274-8.
120. Marson, C. M. New and unusual scaffolds in medicinal chemistry. *Chem Soc Rev* **2011**, 40, 5514-33.
121. Basappa; Ananda Kumar, C. S.; Nanjunda Swamy, S.; Sugahara, K.; Rangappa, K. S. Anti-tumor and anti-angiogenic activity of novel hydantoin derivatives: Inhibition of VEGF secretion in liver metastatic osteosarcoma cells. *Bioorg Med Chem* **2009**, 17, 4928-34.
122. Bichard, C. J. F.; Mitchell, E. P.; Wormald, M. R.; Watson, K. A.; Johnson, L. N.; Zographos, S. E.; Koutra, D. D.; Oikonomakos, N. G.; Fleet, G. W. J. Potent inhibitor of glycogen phosphorylase by a spirohydantoin of glucopyranose: First pyranose analogues of hydantocidin. *Tet Lett* **1995**, 36, 2145-8.
123. Peterson, M. J.; Sarges, R.; Aldinger, C. E.; MacDonald, D. P. CP-45,634: a novel aldose reductase inhibitor that inhibits polyol pathway activity in diabetic and galactosemic rats. *Metabolism* **1979**, 28, 456-61.
124. Sarges, R.; Peterson, M. J. Sorbinil: a member of the novel class of spirohydantoin aldose reductase inhibitors. *Metabolism* **1986**, 35, 101-4.
125. O'Brien, M. M.; Schofield, P. J.; Edwards, M. R. Inhibition of human brain aldose reductase and hexonate dehydrogenase by alrestatin and sorbinil. *J Neurochem* **1982**, 39, 810-4.
126. Zheng, Y.; Tice, C. M.; Singh, S. B. The use of spirocyclic scaffolds in drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett* **2014**, 24, 3673-82.
127. Ananthan, S.; Clayton, S. D.; Ealick, S. E.; Wong, G.; Evoniuk, G. E.; Skolnick, P. Synthesis and structure-activity relationships of 3,5-disubstituted 4,5-dihydro-6H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-6-ones at diazepam-sensitive and diazepam-insensitive benzodiazepine receptors. *J Med Chem* **1993**, 36, 479-90.

Bibliographie

128. Wong, G.; Koehler, K. F.; Skolnick, P.; Gu, Z. Q.; Ananthan, S.; Schönholzer, P.; Hunkeler, W.; Zhang, W.; Cook, J. M. Synthetic and computer-assisted analysis of the structural requirements for selective, high-affinity ligand binding to diazepam-insensitive benzodiazepine receptors. *J Med Chem* **1993**, 36, 1820-30.
129. Bakavoli, M.; Davoodnia, A.; Shahnaee, R. Convenient synthesis of some optically active 1,4-benzodiazepin-2,5-diones. *Chines. Chem. Lett.* **2008**, 19, 12-14.
130. Barlind, J. G.; Buckett, L. K.; Crosby, S. G.; Davidsson, Ö.; Emtenäs, H.; Ertan, A.; Jurva, U.; Lemurell, M.; Gutierrez, P. M.; Nilsson, K.; O'Mahony, G.; Petersson, A. U.; Redzic, A.; Wågberg, F.; Yuan, Z. Q. Identification and design of a novel series of MGAT2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, 23, 2721-6.
131. Jadidi, K.; Aryan, R.; Mehrdad, M.; Lügger, T.; Hahn, F. E.; Ng Weng, S. Simple synthesis, structure and ab initio study of 1,4-benzodiazepine-2,5-diones. *J. Mol. Struct.* **2004**, 692, 37-42.
132. Clark, R. L.; Carter, K. C.; Mullen, A. B.; Coxon, G. D.; Owusu-Dapaah, G.; McFarlane, E.; Duong Thi, M. D.; Grant, M. H.; Tettey, J. N.; Mackay, S. P. Identification of the benzodiazepines as a new class of antileishmanial agent. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, 624-7.
133. Loudni, L.; Roche, J.; Potiron, V.; Clarhaut, J.; Bachmann, C.; Gesson, J. P.; Tranoy-Opalinski, I. Design, synthesis and biological evaluation of 1,4-benzodiazepine-2,5-dione-based HDAC inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, 4819-23.
134. Sun, H. H.; Barrow, C. J.; Cooper, R. Benzomalvin D, a new 1,4-benzodiazepine atropisomer. *J. Nat. Prod.* **1995**, 58, 1575-80.
135. Witt, A.; Gustavsson, A.; Bergman, J. Studies toward the synthesis of the benzodiazepine alkaloid auranthine. Synthesis of an acetylated derivative. *J. Heterocyclic Chem.* **2003**, 40, 29-35.
136. Jadidi, K.; Ghahremanzadeh, R.; Asgari, D.; Eslami, P.; Arvin-Nezhad, H. Eco-friendly synthesis of 1,4-benzodiazepine-2,5-diones in the ionic liquid [bmim]Br. *Monatsh Chem* **2008**, 139, 1229-1232.
137. Ding, C. Z.; Batorsky, R.; Bhide, R.; Chao, H. J.; Cho, Y.; Chong, S.; Gullo-Brown, J.; Guo, P.; Kim, S. H.; Lee, F.; Leftheris, K.; Miller, A.; Mitt, T.; Patel, M.; Penhallow, B. A.; Ricca, C.; Rose, W. C.; Schmidt, R.; Slusarchyk, W. A.; Vite, G.; Yan, N.; Manne, V.; Hunt, J. T. Discovery and structure-activity relationships of imidazole-containing tetrahydrobenzodiazepine inhibitors of farnesyltransferase. *J Med Chem* **1999**, 42, 5241-53.
138. Cheng, M. F.; Yu, H. M.; Ko, B. W.; Chang, Y.; Chen, M. Y.; Ho, T. I.; Tsai, Y. M.; Fang, J. M. Practical synthesis of potential endothelin receptor antagonists of 1,4-benzodiazepine-2,5-dione derivatives bearing substituents at the C3-, N1- and N4-positions. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 510-8.
139. Vaidyanathan, G.; Wilson, J. W. Reaction of cyclopropanamines with hypochlorite. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 1815-20.
140. Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. N-Methylamino acids in peptide synthesis. V. The synthesis of N-tert-butylloxycarbonyl,N-methylamino acids by N-methylation. *Can. J. Chem.* **1977**, 55, 906-10.
141. Wysong, C. L.; Yokum, T. S.; Morales, G. A.; Gundry, R. L.; McLaughlin, M. L.; Hammer, R. P. 4-Aminopiperidine-4-carboxylic Acid: A Cyclic alpha,alpha-Disubstituted Amino Acid for Preparation of Water-Soluble Highly Helical Peptides. *J Org Chem* **1996**, 61, 7650-1.
142. Bleicher, K. H.; Wüthrich, Y.; Adam, G.; Hoffmann, T.; Sleight, A. J. Parallel solution- and solid-phase synthesis of spiropyrrolo-pyrroles as novel neurokinin receptor ligands. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, 12, 3073-6.
143. Kiviranta, P. H.; Leppänen, J.; Rinne, V. M.; Suuronen, T.; Kyrylenko, O.; Kyrylenko, S.; Kuusisto, E.; Tervo, A. J.; Järvinen, T.; Salminen, A.; Poso, A.; Wallén, E. A. N-(3-(4-Hydroxyphenyl)-propenoyl)-amino acid tryptamides as SIRT2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, 2448-51.
144. Prevet, H.; Flipo, M.; Roussel, P.; Deprez, B.; Willand, N. Microwave-assisted synthesis of functionalized spirohydantoin as 3-D privileged fragments for scouting the chemical space. *Tet. Lett.* **2016**, 57, 2888-94.
145. Ware, E. The chemistry of the hydantoins. *Chem Rev* **1950**, 46, 403-70.
146. Bucherer, H. T.; Lieb, V. A. Via the formation of substituted hydantoins from aldehydes and ketones. Synthesis of hydantoins. *J. Prakt. Chem* **1934**, 141, 5-43.
147. Chubb, F. L.; Edward, J. T.; Wong, S. C. Simplex Optimization of Yields in the Bucherer-Bergs Reaction. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 2315-20.

Bibliographie

148. Tsang, J. W.; Schmied, B.; Nyfeler, R.; Goodman, M. Peptide sweeteners. 6. Structural studies on the C-terminal amino acid of L-aspartyl dipeptide sweeteners. *J Med Chem* **1984**, *27*, 1663-8.
149. Chattopadhyay, B.; Mukherjee, A. K.; Narendra, N.; Hemantha, H. P.; Sureshbabu, V. V.; Helliwell, M.; Mukherjee, M. Supramolecular architectures in 5,5'-substituted hydantoins: crystal structures and hirshfeld surface analysis. *Crystal Growth & Design* **2010**, *10*, 4476-84.
150. Safari, J.; Gandomi-Ravandi, S.; Javadian, L. Microwave-promoted facile and rapid synthesis procedures for the efficient synthesis of 5,5-disubstituted hydantoins. *Syn. Com.* **2013**, *43*, 3115-20.
151. Rivero, I. A.; Reynoso, E. A.; Ochoa-Teran, A. Microwave-assisted synthesis of cycloalkanespirohydantoins and piperidinespirohydantoins as precursors of restricted alpha-amino acids. *Arkivoc* **2011**, 260-71.
152. Stella, V.; Higuchi, T. Esters of hydantoic acids as prodrugs of hydantoins. *J Pharm Sci* **1973**, *62*, 962-7.
153. Kuenemann, M. A.; Bourbon, L. M.; Labbé, C. M.; Villoutreix, B. O.; Sperandio, O. Which three-dimensional characteristics make efficient inhibitors of protein-protein interactions? *J Chem Inf Model* **2014**, *54*, 3067-79.
154. Klein, C.; Vassilev, L. T. Targeting the p53-MDM2 interaction to treat cancer. *Br J Cancer* **2004**, *91*, 1415-9.
155. Wang, W.; Hu, Y. Small molecule agents targeting the p53-MDM2 pathway for cancer therapy. *Med Res Rev* **2012**, *32*, 1159-96.
156. Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **1996**, *274*, 948-53.
157. Gonzalez-Lopez de Turiso, F.; Sun, D.; Rew, Y.; Bartberger, M. D.; Beck, H. P.; Canon, J.; Chen, A.; Chow, D.; Correll, T. L.; Huang, X.; Julian, L. D.; Kayser, F.; Lo, M. C.; Long, A. M.; McMinn, D.; Oliner, J. D.; Osgood, T.; Powers, J. P.; Saiki, A. Y.; Schneider, S.; Shaffer, P.; Xiao, S. H.; Yakowec, P.; Yan, X.; Ye, Q.; Yu, D.; Zhao, X.; Zhou, J.; Medina, J. C.; Olson, S. H. Rational design and binding mode duality of MDM2-p53 inhibitors. *J Med Chem* **2013**, *56*, 4053-70.
158. Estrada-Ortiz, N.; Neochoritis, C. G.; Dömling, A. How To Design a Successful p53-MDM2/X Interaction Inhibitor: A Thorough Overview Based on Crystal Structures. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 757-72.
159. Vaupel, A.; Bold, G.; De Pover, A.; Stachyra-Valat, T.; Lisztwan, J. H.; Hergovich-Lisztwan, J.; Kallen, J.; Masuya, K.; Furet, P. Tetra-substituted imidazoles as a new class of inhibitors of the p53-MDM2 interaction. *Bioorg Med Chem Lett* **2014**, *24*, 2110-4.
160. Rew, Y.; Sun, D.; Gonzalez-Lopez De Turiso, F.; Bartberger, M. D.; Beck, H. P.; Canon, J.; Chen, A.; Chow, D.; Deignan, J.; Fox, B. M.; Gustin, D.; Huang, X.; Jiang, M.; Jiao, X.; Jin, L.; Kayser, F.; Kopecky, D. J.; Li, Y.; Lo, M. C.; Long, A. M.; Michelsen, K.; Oliner, J. D.; Osgood, T.; Ragains, M.; Saiki, A. Y.; Schneider, S.; Toteva, M.; Yakowec, P.; Yan, X.; Ye, Q.; Yu, D.; Zhao, X.; Zhou, J.; Medina, J. C.; Olson, S. H. Structure-based design of novel inhibitors of the MDM2-p53 interaction. *J Med Chem* **2012**, *55*, 4936-54.
161. Freedman, D. A.; Epstein, C. B.; Roth, J. C.; Levine, A. J. A genetic approach to mapping the p53 binding site in the MDM2 protein. *Mol Med* **1997**, *3*, 248-59.
162. *World Health Organization (WHO) - Global Tuberculosis Report 2015*.
163. Dirlikov, E.; Raviglione, M.; Scano, F. Global Tuberculosis Control: Toward the 2015 Targets and Beyond. *Ann Intern Med* **2015**, *163*, 52-8.
164. Sakula, A. Centenary of the discovery of the tubercle bacillus. *Lancet* **1982**, *1*, 246-51.
165. Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; Tekaiia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **1998**, *393*, 537-44.
166. Angala, S. K.; Belardinelli, J. M.; Huc-Claustre, E.; Wheat, W. H.; Jackson, M. The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **2014**, *49*, 361-99.

Bibliographie

167. Zuber, B.; Chami, M.; Houssin, C.; Dubochet, J.; Griffiths, G.; Daffé, M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol* **2008**, *190*, 5672-80.
168. Kaufmann, S. H.; McMichael, A. J. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med* **2005**, *11*, S33-44.
169. Calmette, A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc R Soc Med* **1931**, *24*, 1481-90.
170. Walker, V.; Selby, G.; Wacogne, I. Does neonatal BCG vaccination protect against tuberculous meningitis? *Arch Dis Child* **2006**, *91*, 789-91.
171. Trunz, B. B.; Fine, P.; Dye, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* **2006**, *367*, 1173-80.
172. Brewer, T. F. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guérin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis* **2000**, *31* Suppl 3, S64-7.
173. Colditz, G. A.; Brewer, T. F.; Berkey, C. S.; Wilson, M. E.; Burdick, E.; Fineberg, H. V.; Mosteller, F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* **1994**, *271*, 698-702.
174. Schatz, A.; Waksman, S. A. Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon Mycobacterium Tuberculosis and Related Organisms. *Pro. Soc. Exp. Biol. and Med.* **1944**, *57*, 244-8.
175. Bernstein, J.; Lott, W. A.; Steinberg, B. A.; Yale, H. L. Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds. *Am Rev Tuberc* **1952**, *65*, 357-64.
176. Maggi, N.; Pasqualucci, C. R.; Ballotta, R.; Sensi, P. Rifampicin: a new orally active rifamycin. *Chemotherapy* **1966**, *11*, 285-92.
177. Kushner, S.; Dalalian, H.; Sanjurjo, J. L.; Bach, F. L.; Safir, S. R.; Smith, V. K.; Williams, J. H. Experimental Chemotherapy of Tuberculosis. II. The Synthesis of Pyrazinamides and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3617-21.
178. Thomas, J. P.; Baughn, C. O.; Wilkinson, R. G.; Shepherd, R. G. A new synthetic compound with antituberculous activity in mice: ethambutol (dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-l-butanol). *Am Rev Respir Dis* **1961**, *83*, 891-3.
179. Winder, F. G.; Collins, P. B. Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. *J Gen Microbiol* **1970**, *63*, 41-8.
180. Heym, B.; Alzari, P. M.; Honoré, N.; Cole, S. T. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, katG, are associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* **1995**, *15*, 235-45.
181. Lei, B.; Wei, C. J.; Tu, S. C. Action mechanism of antitubercular isoniazid. Activation by Mycobacterium tuberculosis KatG, isolation, and characterization of inha inhibitor. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 2520-6.
182. Rawat, R.; Whitty, A.; Tonge, P. J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 13881-6.
183. Marrakchi, H.; Lanéelle, G.; Quémard, A. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology* **2000**, *146* (Pt 2), 289-96.
184. Vilchèze, C.; Morbidoni, H. R.; Weisbrod, T. R.; Iwamoto, H.; Kuo, M.; Sacchetti, J. C.; Jacobs, W. R. Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of Mycobacterium smegmatis. *J Bacteriol* **2000**, *182*, 4059-67.
185. Zhang, Y.; Mitchison, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* **2003**, *7*, 6-21.
186. Mikusová, K.; Slayden, R. A.; Besra, G. S.; Brennan, P. J. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**, *39*, 2484-9.
187. McClure, W. R.; Cech, C. L. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem* **1978**, *253*, 8949-56.

Bibliographie

188. Zumla, A.; Nahid, P.; Cole, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov* **2013**, *12*, 388-404.
189. Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K. S.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W. R. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1994**, *263*, 227-30.
190. Then, R. L. Mechanisms of resistance to trimethoprim, the sulfonamides, and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Rev Infect Dis* **1982**, *4*, 261-9.
191. Almeida, D.; Ioerger, T.; Tyagi, S.; Li, S. Y.; Mdluli, K.; Andries, K.; Grosset, J.; Sacchettini, J.; Nuermberger, E. Mutations in pepQ Confer Low-level Resistance to Bedaquiline and Clofazimine in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**, *60*, 4590-9.
192. Ahuja, S. D.; Ashkin, D.; Avendano, M.; Banerjee, R.; Bauer, M.; Bayona, J. N.; Becerra, M. C.; Benedetti, A.; Burgos, M.; Centis, R.; Chan, E. D.; Chiang, C. Y.; Cox, H.; D'Ambrosio, L.; DeRiemer, K.; Dung, N. H.; Enarson, D.; Falzon, D.; Flanagan, K.; Flood, J.; Garcia-Garcia, M. L.; Gandhi, N.; Granich, R. M.; Hollm-Delgado, M. G.; Holtz, T. H.; Iseman, M. D.; Jarlsberg, L. G.; Keshavjee, S.; Kim, H. R.; Koh, W. J.; Lancaster, J.; Lange, C.; de Lange, W. C.; Leimane, V.; Leung, C. C.; Li, J.; Menzies, D.; Migliori, G. B.; Mishustin, S. P.; Mitnick, C. D.; Narita, M.; O'Riordan, P.; Pai, M.; Palmero, D.; Park, S. K.; Pasvol, G.; Peña, J.; Pérez-Guzmán, C.; Quelapio, M. I.; Ponce-de-Leon, A.; Riekstina, V.; Robert, J.; Royce, S.; Schaaf, H. S.; Seung, K. J.; Shah, L.; Shim, T. S.; Shin, S. S.; Shiraishi, Y.; Sifuentes-Osornio, J.; Sotgiu, G.; Strand, M. J.; Tabarsi, P.; Tupasi, T. E.; van Altena, R.; Van der Walt, M.; Van der Werf, T. S.; Vargas, M. H.; Viikklepp, P.; Westenhouse, J.; Yew, W. W.; Yim, J. J.; MDR-TB, C. G. f. M.-A. o. I. P. D. i. Multidrug resistant pulmonary tuberculosis treatment regimens and patient outcomes: an individual patient data meta-analysis of 9,153 patients. *PLoS Med* **2012**, *9*, e1001300.
193. Cohen, J. Infectious disease. Approval of novel TB drug celebrated--with restraint. *Science* **2013**, *339*, 130.
194. Ryan, N. J.; Lo, J. H. Delamanid: first global approval. *Drugs* **2014**, *74*, 1041-5.
195. Hoagland, D. T.; Liu, J.; Lee, R. B.; Lee, R. E. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *102*, 55-72.
196. Dheda, K.; Barry, C. E.; Maartens, G. Tuberculosis. *Lancet* **2016**, *387*, 1211-26.
197. Field, S. K.; Fisher, D.; Jarand, J. M.; Cowie, R. L. New treatment options for multidrug-resistant tuberculosis. *Ther Adv Respir Dis* **2012**, *6*, 255-68.
198. Furin, J.; Brigden, G.; Lessem, E.; Rich, M.; Vaughan, L.; Lynch, S. Global Progress and Challenges in Implementing New Medications for Treating Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Emerg Infect Dis* **2016**, *22*.
199. Baulard, A. R.; Betts, J. C.; Engohang-Ndong, J.; Quan, S.; McAdam, R. A.; Brennan, P. J.; Loch, C.; Besra, G. S. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 28326-31.
200. DeBarber, A. E.; Mdluli, K.; Bosman, M.; Bekker, L. G.; Barry, C. E. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 9677-82.
201. Wang, F.; Langley, R.; Gulten, G.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *J Exp Med* **2007**, *204*, 73-8.
202. Engohang-Ndong, J.; Baillat, D.; Aumercier, M.; Bellefontaine, F.; Besra, G. S.; Loch, C.; Baulard, A. R. EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator. *Mol Microbiol* **2004**, *51*, 175-88.
203. Dover, L. G.; Corsino, P. E.; Daniels, I. R.; Cocklin, S. L.; Tatituri, V.; Besra, G. S.; Fütterer, K. Crystal structure of the TetR/CamR family repressor *Mycobacterium tuberculosis* EthR implicated in ethionamide resistance. *J Mol Biol* **2004**, *340*, 1095-105.
204. Frénois, F.; Engohang-Ndong, J.; Loch, C.; Baulard, A. R.; Villeret, V. Structure of EthR in a ligand bound conformation reveals therapeutic perspectives against tuberculosis. *Mol Cell* **2004**, *16*, 301-7.
205. Flipo, M.; Desroses, M.; Lecat-Guillet, N.; Dirié, B.; Carette, X.; Leroux, F.; Piveteau, C.; Demirkaya, F.; Lens, Z.; Rucktooa, P.; Villeret, V.; Christophe, T.; Jeon, H. K.; Loch, C.; Brodin, P.; Déprez, B.; Baulard, A. R.; Willand, N. Ethionamide boosters: synthesis, biological activity, and

Bibliographie

- structure-activity relationships of a series of 1,2,4-oxadiazole EthR inhibitors. *J Med Chem* **2011**, *54*, 2994-3010.
206. Willand, N.; Dirié, B.; Carette, X.; Bifani, P.; Singhal, A.; Desroses, M.; Leroux, F.; Willery, E.; Mathys, V.; Déprez-Poulain, R.; Delcroix, G.; Frénois, F.; Aumercier, M.; Loch, C.; Villeret, V.; Déprez, B.; Baulard, A. R. Synthetic EthR inhibitors boost antituberculous activity of ethionamide. *Nat Med* **2009**, *15*, 537-44.
207. Willand, N.; Desroses, M.; Toto, P.; Dirié, B.; Lens, Z.; Villeret, V.; Rucktooa, P.; Loch, C.; Baulard, A.; Deprez, B. Exploring drug target flexibility using in situ click chemistry: application to a mycobacterial transcriptional regulator. *ACS Chem Biol* **2010**, *5*, 1007-13.
208. Vilchèze, C.; Jacobs, W. R. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium tuberculosis: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr* **2014**, *2*, MGM2-0014-2013.
209. Brossier, F.; Veziris, N.; Truffot-Pernot, C.; Jarlier, V.; Sougakoff, W. Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, *55*, 355-60.
210. Vilchèze, C.; Wang, F.; Arai, M.; Hazbón, M. H.; Colangeli, R.; Kremer, L.; Weisbrod, T. R.; Alland, D.; Sacchetti, J. C.; Jacobs, W. R. Transfer of a point mutation in Mycobacterium tuberculosis inhA resolves the target of isoniazid. *Nat Med* **2006**, *12*, 1027-9.
211. Weber, W.; Schoenmakers, R.; Keller, B.; Gitzinger, M.; Grau, T.; Daoud-El Baba, M.; Sander, P.; Fussenegger, M. A synthetic mammalian gene circuit reveals antituberculosis compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 9994-8.
212. Ramos, J. L.; Martínez-Bueno, M.; Molina-Henares, A. J.; Terán, W.; Watanabe, K.; Zhang, X.; Gallegos, M. T.; Brennan, R.; Tobes, R. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* **2005**, *69*, 326-56.
213. Hansch, C.; Fujita, T. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1616-26.
214. Willand, N.; Folléas, B.; Boutillon, C.; Verbraeken, L.; Gesquière, J. C.; Tartar, A.; Deprez, B. Efficient, two-step synthesis of N-substituted nortropinone derivatives. *Tet. Lett.* **2007**, *48*, 5007-11.
215. Njoroge, F. G.; Vibulbhan, B.; Pinto, P.; Chan, T. M.; Osterman, R.; Remiszewski, S.; Del Rosario, J.; Doll, R.; Girijavallabhan, V.; Ganguly, A. K. Highly Regioselective Nitration Reactions Provide a Versatile Method of Functionalizing Benzocycloheptapyridine Tricyclic Ring Systems: Application toward Preparation of Nanomolar Inhibitors of Farnesyl Protein Transferase. *J Org Chem* **1998**, *63*, 445-51.
216. Chen, G.; Cushing, T. D.; Fischer, B.; He, X.; Li, K.; Li, Z.; Mcgee, L. R.; Pattaropong, V.; Faulder, P.; Seganish, J. L.; Shin, Y. Alkynyl Alcohols as Kinase Inhibitors. **2009**, WO 2009/158011 A1.
217. Mityuk, A. P.; Denisenko, A. V.; Dacenko, O. P.; Grygorenko, O. O.; Mykhailiuk, P. K.; Volochnyuk, D. M.; Shishkin, O. V.; Tolmachev, A. A. An Approach to Azabicyclo[*n*;3.1]alkanes by Double Mannich Reaction. *Syn.* **2010**, *3*, 493-7.
218. Brimble, M. A.; Brocke, C. Efficient Synthesis of the Azabicyclo[3.3.1]nonane Ring System in the Alkaloid Methyllycaconitine Using Bis(alkoxymethyl)alkylamines as Aminoalkylating Agents in a Double Mannich Reaction. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2385-96.
219. Meanwell, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *J Med Chem* **2011**, *54*, 2529-91.
220. Abdelazeem, A. H.; Abdelatef, S. A.; El-Saadi, M. T.; Omar, H. A.; Khan, S. I.; McCurdy, C. R.; El-Moghazy, S. M. Novel pyrazolopyrimidine derivatives targeting COXs and iNOS enzymes; design, synthesis and biological evaluation as potential anti-inflammatory agents. *Eur J Pharm Sci* **2014**, *62*, 197-211.
221. Banerjee, A.; Schepmann, D.; Wünsch, B. Synthesis and NMDA receptor affinity of fluorinated dioxadrol analogues. *Bioorg Med Chem* **2010**, *18*, 4095-102.
222. Stasi, L. P.; Rovati, L.; Artusi, R.; Bovino, C.; Colace, F.; Mandelli, S. 4,4-Difluoro-Piperidine-Compounds. **2015**, US2015/0051226 A1.
223. Zhao, Y.; Huang, W.; Zhu, L.; Hu, J. Difluoromethyl 2-pyridyl sulfone: a new gem-difluoroolefination reagent for aldehydes and ketones. *Org Lett* **2010**, *12*, 1444-7.

Bibliographie

224. McGinty, S. J.; Finch, A.; Griffith, R.; Graham, R. M.; Bremner, J. B. Synthesis and biological evaluation of bicyclic and tricyclic substituted nortropane derivatives: discovery of a novel selective alpha1D-adrenergic receptor ligand. *Bioorg Med Chem* **2004**, *12*, 5639-50.
225. Strunz, A. K.; Zweemer, A. J.; Weiss, C.; Schepmann, D.; Junker, A.; Heitman, L. H.; Koch, M.; Wunsch, B. Synthesis and biological evaluation of spirocyclic antagonists of CCR2 (chemokine CC receptor subtype 2). *Bioorg Med Chem* **2015**, *23*, 4034-49.
226. Cavalluzzi, M. M.; Viale, M.; Bruno, C.; Carocci, A.; Catalano, A.; Carrieri, A.; Franchini, C.; Lentini, G. A convenient synthesis of lubeluzole and its enantiomer: evaluation as chemosensitizing agents on human ovarian adenocarcinoma and lung carcinoma cells. *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, *23*, 4820-3.
227. Katritzky, A. R.; Cai, C.; Singh, S. K. Efficient microwave access to polysubstituted amidines from imidoylbenzotriazoles. *J Org Chem* **2006**, *71*, 3375-80.
228. Hagmann, W. K. The many roles for fluorine in medicinal chemistry. *J Med Chem* **2008**, *51*, 4359-69.
229. Abdel-Magid, A. F.; Mehrman, S. J. A review on the use of sodium triacetoxyborohydride in the reductive amination of ketones and aldehydes. *Org. Process Res. & Dev.* **2006**, *10*, 971-1031.
230. Loiseleur, O.; Jeanguenat, A.; Mondiere, R. Pyridine-2-carboxamides as nematocides. **2015**, WO2015/7626 A1.

Partie expérimentale

I. Chemistry

Solvents for synthesis, analysis and purification were purchased as analytical grade from commercial suppliers and used directly without further purification. Other chemical reagents were purchased from Acros, Aldrich, Fluka, Merck, Maybridge, Fluorochem, TCI or Alfa Aesar as reagent grade and used without further purification.

Microwave-assisted synthesis

Microwave-assisted chemical reactions were conducted on a CEM Discover™ synthesis system or a Biotage® Initiator+ microwave synthesizer. Progress of all reactions was routinely monitored by thin layer chromatography (TLC) and/or by High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (HPLC-MS). TLC was performed using Merck commercial aluminum sheets coated with silica gel 60 F₂₅₄. Visualization was achieved by fluorescence quenching under UV light at 254 nm, and stained by one of the following reagents: solution of KMnO₄, ninhydrin solution or molybdene.

Analysis

HPLC-MS analysis was performed on two different HPLC-MS systems:

- ➔ LC-MS Waters Alliance Micromass ZQ 2000 (**Waters-1**) system was equipped with a Waters 2747 sample manager, a Waters 2695 separations module, a Waters 2996 photodiode array detector (200-800 nm) and a Waters Micromass ZQ2000 detector (scan 100-800).
- ➔ LC-MS Waters 3100 Mass Detectors (**Waters-2**) system was equipped with a Waters 2767 sample manager, a Waters 515 HPLC pump, a Waters Systems Fluidics Organizer, a Waters 2545 Binary Gradient Module, a Waters 2487 Dual λ Absorbance (215 nm and 254 nm) detector and a Waters 3100 Mass detectors.

XBridge C18 column (3.5 μ m particle size, dimensions 50 mm x 4.6 mm) was used for HPLC analysis. The injection volume was 20 μ L. A mixture of water and acetonitrile was used as mobile phase in gradient-elution. The pH of the mobile phase was adjusted with HCOOH and NH₄OH to form a buffer solution at pH 3.8 or pH 9.2. The analysis time was 5 minutes (at a flow rate at 2 mL/min), 10 minutes (at a flow rate at 1 mL/min) or 30 minutes (at a flow rate at 1 mL/min). Purity (%) was determined by reversed phase HPLC, using UV detection (215 nm), and all isolated compounds showed purity greater than 95%.

HRMS analysis was performed on a LCT Premier XE Micromass, using a C18 X-Bridge 3.5 μ m particle size column, dimensions 50 mm * 4.6 mm. A gradient starting from 98% H₂O 5 mM

Partie expérimentale

Ammonium Formate pH=3.8 and reaching 100% CH₃CN 5 mM Ammonium Formate pH=3.8 within 3 min at a flow rate of 1 mL/min was used.

NMR spectra were recorded on a Bruker DRX-300 spectrometer. The results were calibrated to signals from the solvent as an internal reference [e.g. 5.32 (residual CD₂Cl₂) and 53.84 (CD₂Cl₂) ppm, 2.50 (residual DMSO-d₆) and 39.52 (DMSO-d₆) ppm for ¹H and ¹³C NMR spectra, respectively]. Chemical shifts (δ) are in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane (TMS). The assignments were made using one-dimensional (1D) ¹H and ¹³C spectra and two-dimensional (2D) HSQC-DEPT, COSY and HMBC spectra. NMR coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz), and splitting patterns are indicated as follows:

s	Singlet	dd	Doublet of doublet
brs	Broad singlet	ddd	Double of doublet of doublet
d	Doublet	dt	Doublet of triplet
t	Triplet	qd	Quartet of doublet
q	Quartet	qt	Quartet of triplet
quin	Quintet	m	multiplet
sex	Sextet	δ	Chemical shift
sep	Septet	J	Coupling constant

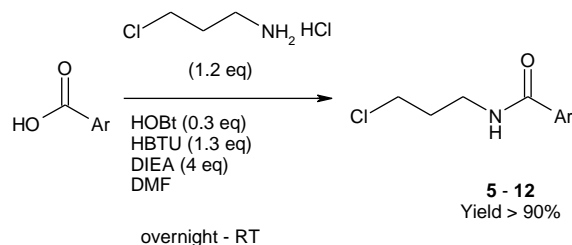
Purification

Purifications were conducted by several methods: recrystallization, flash chromatography or preparative HPLC. Flash chromatography purifications were performed on prepacked columns: Reveleris[®] flash cartridges (20–40 μm, Grace[®]) under pressure by an Interchim Puriflash[®] 430 instrument. Preparative HPLC were performed using one of these two systems. The first is a Varian ProStar system using an Omnisphere 10 μm C₁₈ column (250 mm x 41.4 mm) Dynamax from Varian, Inc. Mobile phase is a mixture of H₂O (0.1 % of formic acid) and CH₃CN (0.1% of formic acid) and a flow rate of 80 mL/min was used. Products were detected by UV absorption at 215 nm and/or 254 nm. The second is Waters-2 system using a XBridge[™] Prep C18 5μm OBD[™], dimensions 50 mm x 250 mm column. Mobile phase is a gradient mixture of CH₃CN and water in ammonium formate buffer at pH 9.2 or pH 3.8. Flow rate at 80 mL/min was used. Products were detected by UV absorption and/or by MS.

II. Chapter I: synthesis of compounds 1 to 137

Synthesis of the final products 13 to 26

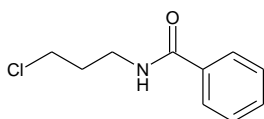
Intermediates 5 to 12



General procedure for the synthesis of the intermediates 5 to 12

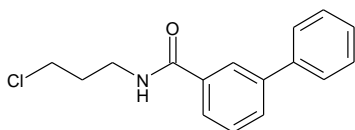
3-Chloro-propylamine hydrochloride (1.2 eq) was added to a solution of the appropriate commercially available carboxylic acid (1 eq), HOBt (0.3 eq), HBTU (1.3 eq) and DIEA (4 eq) in DMF on molecular sieves ($C = 0.5 \text{ M}$). The reaction mixture was stirred at RT overnight. DMF was then evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated $\text{NaHCO}_3 \text{ aq}$ (3x), $\text{HCl}_{\text{aq}} 1 \text{ N}$ (3x) and brine (1x). The organic phase was then dried over MgSO_4 and evaporated to give the chlorinated products (**5** to **12**) which were used without further purification in the next step.

N-(3-chloropropyl)benzamide (**5**)



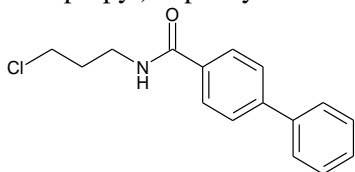
Yellow oil
 139 mg – 100%
 $t_R = 2.70 \text{ min}$ (run 5 min)
 MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 198$
 Purity (215 nm) 98%

N-(3-chloropropyl)-3-phenyl-benzamide (**6**)



Brown oil
 415 mg – 100%
 $t_R = 2.92 \text{ min}$ (run 5 min)
 MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 274$
 Purity (215 nm) 97%

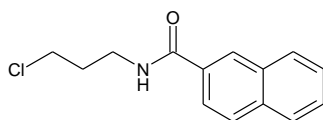
N-(3-chloropropyl)-4-phenyl-benzamide (**7**)



White solid
 192 mg – 100%
 $t_R = 3.13 \text{ min}$ (run 5 min)
 MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 274$
 Purity (215 nm) 98%

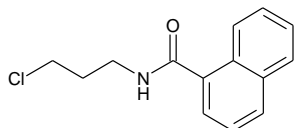
Partie expérimentale

N-(3-chloropropyl)naphthalene-2-carboxamide (**8**)



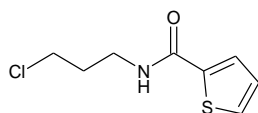
Brown oil
359 mg – 96%
 $t_R = 2.70$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 248$
Purity (215 nm) 96%

N-(3-chloropropyl)naphthalene-1-carboxamide (**9**)



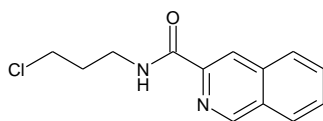
Brown oil
390 mg – 100%
 $t_R = 2.62$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 248$
Purity (215 nm) 96%

N-(3-chloropropyl)thiophene-2-carboxamide (**10**)



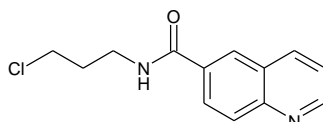
Brown oil
284 mg – 93%
 $t_R = 2.40$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 204$
Purity (215 nm) 97%

N-(3-chloropropyl)isoquinoline-3-carboxamide (**11**)



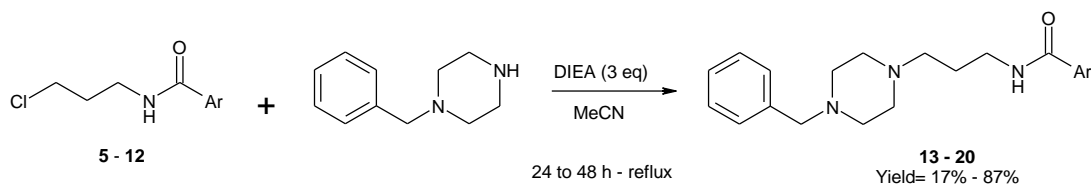
Brown oil
341 mg – 92%
 $t_R = 2.77$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 249$
Purity (215 nm) 98%

N-(3-chloropropyl)isoquinoline-6-carboxamide (**12**)



Brown oil
360 mg – 96%
 $t_R = 2.07$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 249$
Purity (215 nm) 95%

Final products **13** to **20**



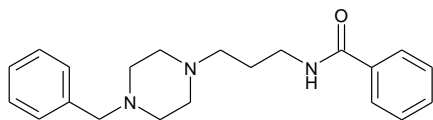
General procedure for the synthesis of the final compounds **13** to **20**

1-Benzylpiperazine (1.1 eq) was added to a solution of the appropriate chlorinated compound (**5** to **12**, 1 eq) in MeCN (C = 0.5 M). The reaction mixture was refluxed for 24 to 48 hours. At the end, the solution was cooled down to RT and MeCN was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ (3x) and brine (1x). The organic phase was

Partie expérimentale

dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The residue was purified either by preparative HPLC (Waters-2, $\text{MeCN}/(\text{H}_2\text{O}-\text{HCO}_2^-\text{NH}_4^+ \text{pH } 9.2)$, 10/90 to 100/0, 30 min) or by precipitation in MeCN to give the desired product (**13** to **20**).

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]benzamide (**13**)



Purified by preparative HPLC

Beige solid

50 mg – 18%

$t_R = 3.45$ min (run 10 min)

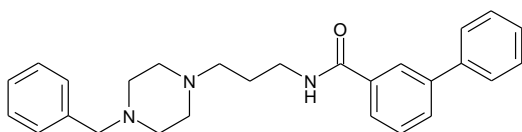
MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 338$

Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.35 (brs, NH), 7.90-7.87 (m, 2H), 7.58-7.52 (m, 1H), 7.49-7.44 (m, 2H), 7.39-7.28 (m, 5H), 3.57-3.51 (m, 4H), 2.68 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.76-2.41 (m, 8H), 1.85 (quint, $J = 6.3$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 167.0, 137.9, 134.9, 131.1, 129.1, 128.3, 128.2, 127.1, 127.1, 62.7, 57.4, 53.0, 52.2, 40.0, 24.1

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-3-phenylbenzamide (**14**)



Purified by preparative HPLC

Brown oil

187 mg – 56%

$t_R = 3.93$ min (run 10 min)

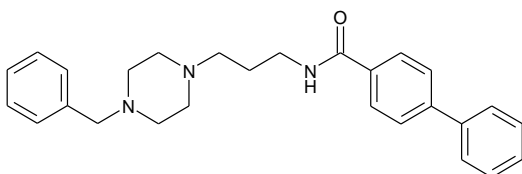
MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 414$

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.33 (brs, NH), 8.14 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.88 (dt, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.79-7.70 (m, 3H), 7.56-7.48 (m, 3H), 7.44-7.38 (m, 1H), 7.36-7.25 (m, 5H), 3.57 (dd, $J = 6.6$ Hz, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.37 (s, 2H), 2.82-2.72 (m, 6H), 2.54 (br s, 4H), 2.0-1.9 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 167.1, 141.3, 140.4, 137.5, 135.4, 129.8, 129.1, 128.9, 128.8, 128.2, 127.7, 127.2, 126.1, 125.8, 62.1, 56.4, 52.5, 51.4, 39.2, 23.9

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-4-phenylbenzamide (**15**)



Purified by precipitation in MeCN

White solid

43 mg – 20%

$t_R = 4.50$ min (run 10 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 274$

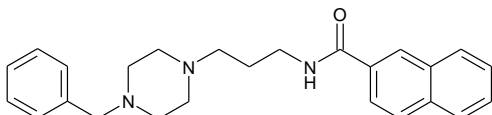
Purity (215 nm) 95%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.45 (brs, NH), 7.94-7.92 (m, 2H), 7.72-7.64 (m, 4H), 7.56-7.51 (m, 2H), 7.47-7.41 (m, 1H), 7.33-7.22 (m, 5H), 3.6-3.56 (m, 2H), 3.53 (s, 2H), 2.60 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.72-2.36 (m, 8H), 1.81 (quint, $J = 5.8$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 166.5, 143.7, 140.1, 138.3, 133.9, 129.1, 128.9, 128.1, 127.9, 127.6, 127.2, 127.0, 126.9, 63.0, 58.6, 53.5, 53.1, 41.1, 24.1

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]naphthalene-2-carboxamide (**16**)



Purified by preparative HPLC

White solid

88 mg – 28%

$t_R = 3.68$ min (run 5 min)

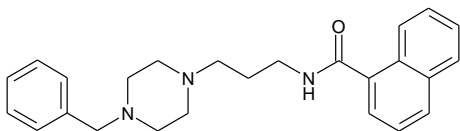
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 388$

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.43 (s, 1H), 8.36 (brs, NH), 8.05-7.91 (m, 4H), 7.65-7.57 (m, 2H), 7.37-7.26 (m, 5H), 3.63-3.57 (m, 2H), 3.54 (s, 2H), 2.84-2.74 (m, 6H), 2.62 (brs, 4H), 2.0-1.91 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 167.2, 137.5, 134.7, 132.7, 132.1, 129.2, 128.9, 128.3, 128.1, 127.7, 127.4, 127.3, 127.2, 126.6, 124.1, 62.3, 56.5, 52.5, 51.5, 39.3, 24.0

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]naphthalene-1-carboxamide (**17**)



Purified by precipitation in MeCN

White solid

67 mg – 22%

$t_R = 3.57$ min (run 10 min)

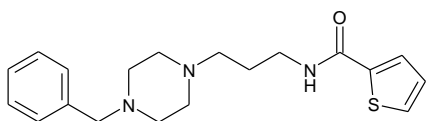
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 388$

Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.40-8.36 (m, 1H), 8.24 (brs, NH), 8.0-7.94 (m, 2H), 7.67-7.63 (m, 1H), 7.59-7.49 (m, 3H), 7.33-7.2 (m, 5H), 3.63 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.24 (s, 2H), 2.59 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.55-2.38 (m, 4H), 2.25-2.1 (m, 4H), 1.88-1.77 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 168.9, 138.3, 135.3, 133.8, 130.2, 130.1, 129.0, 128.2, 128.1, 126.9, 126.7, 126.2, 125.7, 125.0, 124.8, 62.7, 57.8, 53.0, 52.8, 40.5, 24.5

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]thiophene-2-carboxamide (**18**)



Purified by preparative HPLC

White solid

208 mg – 87%

$t_R = 3.02$ min (run 10 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 344$

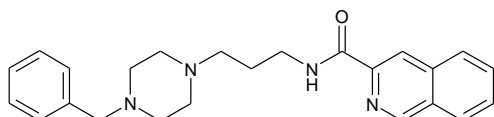
Purity (215 nm) 99%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.06 (brs, NH), 7.73 (dd, $J = 3.8$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.50 (dd, $J = 5.0$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.36-7.3 (m, 5H), 7.11 (dd, $J = 5.0$ Hz, $J = 3.8$ Hz, 1H), 3.65-3.48 (m, 4H), 2.88-2.83 (m, 6H), 2.69 (brs, 4H), 1.96 (quint, $J = 6.1$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.1, 139.7, 137.1, 129.7, 129.2, 128.3, 128.0, 127.6, 127.4, 62.1, 55.4, 52.2, 50.6, 38.1, 23.9

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]isoquinoline-3-carboxamide (**19**)



Purified by precipitation in MeCN

White solid

92 mg – 35%

$t_R = 3.55$ min (run 10 min)

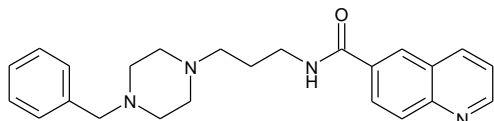
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 389$

Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.81 (brs, NH), 8.39-8.35 (m, 1H), 8.29-8.22 (m, 2H), 7.97-7.94 (m, 1H), 7.87-7.81 (m, 1H), 7.71-7.67 (m, 1H), 7.33-7.22 (m, 5H), 3.61 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.52 (s, 2H), 2.63-2.46 (m, 10H), 1.84 (quint, $J = 6.3$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 164.2, 150.5, 146.6, 138.8, 137.3, 129.9, 129.7, 129.2, 129.0, 128.1, 127.8, 127.7, 126.9, 118.8, 62.9, 57.2, 53.4, 53.2, 38.9, 26.2

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]quinoline-6-carboxamide (**20**)



Purified by precipitation in MeCN

White solid

46 mg – 17%

$t_R = 2.87$ min (run 10 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 389$

Purity (215 nm) 96%

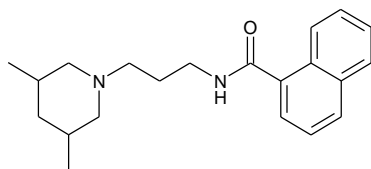
$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 9.01 (dd, $J = 4.2$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 8.70 (brs, NH), 8.38-8.33 (m, 2H), 8.2-8.13 (m, 2H), 7.54 (dd, $J = 4.2$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 1H), 7.35-7.23 (m, 5H), 3.61 (m, 2H), 3.45 (s, 2H), 2.64-2.49 (m, 10H), 1.86-1.79 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 166.3, 151.8, 149.4, 138.4, 136.7, 133.1, 129.7, 129.0, 128.1, 127.8, 127.5, 127.4, 127.0, 121.8, 63.0, 58.7, 53.5, 53.2, 41.3, 24.0

Partie expérimentale

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 167.2, 134.6, 132.7, 132.0, 128.9, 128.0, 127.6, 127.5, 127.4, 126.5, 124.1, 59.8, 56.1, 40.9, 38.8, 29.6, 23.8, 18.9

N-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]naphthalene-1-carboxamide (**23**)



Purified by precipitation in MeCN

White solid

123 mg – 42%

$t_{\text{R}} = 3.40$ min (run 10 min)

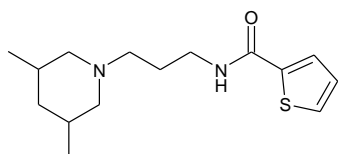
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 325$

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.4-8.36 (m, 1H), 8.14 (brs, NH), 7.97-7.9 (m, 2H), 7.68 (dd, $J = 7.0$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.64-7.46 (m, 3H), 3.64-3.53 (m, 2H), 3.14 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.85 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.08-1.68 (m, 7H), 0.85 (d, $J = 6.1$ Hz, 5H), 0.69 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 0.65-0.54 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 169.4, 134.7, 133.7, 130.3, 130.2, 128.2, 126.7, 126.2, 125.7, 125.1, 124.7, 59.5, 55.7, 40.7, 38.4, 29.4, 24.0, 18.8

N-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]thiophene-2-carboxamide (**24**)



Purified by preparative HPLC

Colorless oil

143 mg – 71%

$t_{\text{R}} = 2.70$ min (run 10 min)

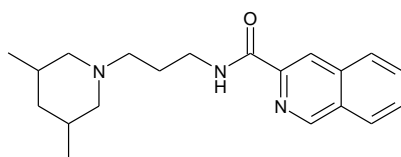
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 281$

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.47 (brs, NH), 7.82-7.67 (dd, $J = 3.7$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 5.0$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1H), 7.11 (dd, $J = 5.0$ Hz, $J = 3.7$ Hz, 1H), 3.55-3.49 (m, 2H), 3.23-3.27 (m, 2H), 2.92 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.09-1.84 (m, 7H), 1.04 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H) 0.93 (d, $J = 6.9$ Hz, 5H), 0.77-0.65 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.2, 140.0, 129.7, 128.1, 127.7, 59.1, 55.2, 40.4, 37.7, 29.1, 23.6, 18.7

N-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]isoquinoline-3-carboxamide (**25**)



Purified by preparative HPLC

White solid

203 mg – 80%

$t_{\text{R}} = 3.43$ min (run 10 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 326$

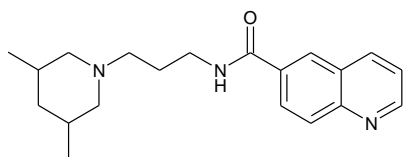
Purity (215 nm) 98%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.82 (brs, NH), 8.38-8.35 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.28-8.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.16-8.12 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.95-7.92 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.84-7.78 (m, 1H), 7.69-7.63 (m, 1H), 3.61 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.2-3.12 (m, 2H), 2.77 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.06-1.72 (m, 7H), 1.02 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 0.90 (d, $J = 6.7$, 5H), 0.72-0.59 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 164.6, 150.1, 146.6, 137.4, 130.1, 129.5, 129.3, 127.8, 127.7, 118.7, 59.9, 55.9, 41.1, 38.1, 29.6, 25.1, 19.0

N-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]quinoline-6-carboxamide (**26**)



Purified by precipitation in MeCN

White solid

199 mg – 75%

$t_R = 2.67$ min (run 10 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 326$

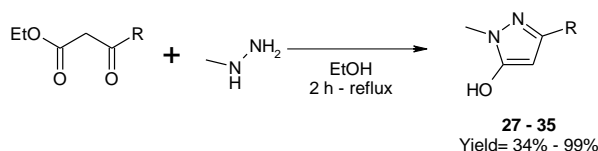
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.99-8.97 (m, 1H), 8.81 (brs, NH), 8.62-8.55 (m, 1H), 8.33-8.26 (m, 2H), 8.15-8.12 (m, 1H), 7.49 (q, $J = 4.1$ Hz, 1H), 3.64-3.59 (m, 2H), 3.27 (d, $J = 10.8$ Hz, 2H), 2.94 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.13-1.83 (m, 7H), 1.01-0.92 (m, 6H), 0.77-0.65 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 166.6, 151.8, 149.4, 137.0, 132.4, 129.4, 127.8, 127.7, 127.6, 121.7, 59.3, 55.5, 40.6, 38.3, 29.3, 23.5, 18.8

Synthesis of the final products **1**, **2**, **77** to **93**

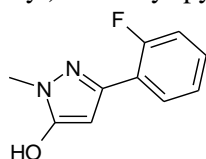
Intermediates **27** to **36**



General procedure for the synthesis of the intermediates **27** to **35**

The appropriate β -keto-ester (1 eq) and methylhydrazine (1 eq) were dissolved in ethanol ($C = 0.8$ M). The reaction mixture was refluxed for 2 hours. It was cooled to 0°C and the precipitate was filtered off, washed with EtOH and dried under vacuum to afford the desired product (**27** to **35**).

5-(2-Fluorophenyl)-2-methyl-pyrazol-3-ol (**27**)



White solid

5.1 g – 82%

$t_R = 1.95$ min (run 5 min)

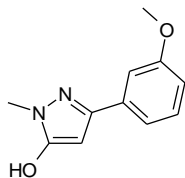
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 193$

Purity (215 nm) 99%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 11.06 (s, OH), 7.87 (ddd, $J = 7.7$ Hz, $J = 2$ Hz, 1H), 7.35-7.14 (m, 3H), 5.74 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 3.58 (s, 3H)

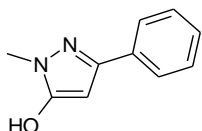
5-(3-Methoxyphenyl)-2-methyl-pyrazol-3-ol (**28**)



White solid
1.8 g – 82%
 $t_R = 2.3$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 205$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.99 (s, OH), 7.23 (m, 3H), 6.83-6.79 (m, 1H), 5.77 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.55 (s, 3H)

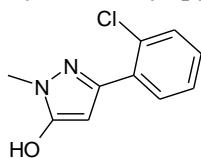
2-Methyl-5-phenyl-pyrazol-3-ol (**29**)



White solid
2.8 g – 82%
 $t_R = 2.22$ min (run 5min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 175$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.9 (brs, OH), 7.67 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 5.77 (s, 1H), 3.55 (s, 3H)

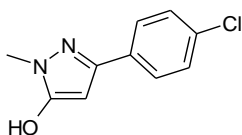
5-(2-Chlorophenyl)-2-methyl-pyrazol-3-ol (**30**)



White solid
315 mg – 34%
 $t_R = 2.57$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 209$
Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 11.03 (brs, OH), 7.76 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.36 - 7.27 (m, 2H) 5.89 (s, 1H), 3.59 (s, 3H)

5-(4-Chlorophenyl)-2-methyl-pyrazol-3-ol (**31**)

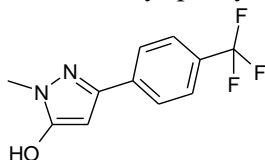


White solid
900 mg – 98%
 $t_R = 4.23$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 209$
Purity (215 nm) 97%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 11.0 (brs, OH), 7.66 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.4 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 5.89 (s, 1H), 3.59 (s, 3H)

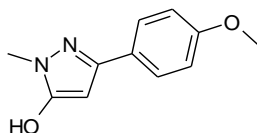
2-Methyl-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]pyrazol-3-ol (**32**)



White solid
920 mg – 99%
 $t_R = 2.85$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 243$
Purity (215 nm) 90%

No NMR was carried out due to the purity < 95%. Product will be purified at the final step.

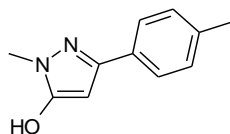
5-(4-Methoxyphenyl)-2-methyl-pyrazol-3-ol (**33**)



Orange solid
2.1 g – 99%
 $t_R = 2.43$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 205$
Purity (215 nm) 85%

No NMR was carried out due to the purity < 95%. Product will be purified at the final step.

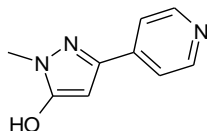
2-Methyl-5-(p-tolyl)pyrazol-3-ol (**34**)



Yellow solid
900 mg – 99%
 $t_R = 2.55$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 189$
Purity (215 nm) 91%

No NMR was carried out due to the purity < 95%. Product will be purified at the final step.

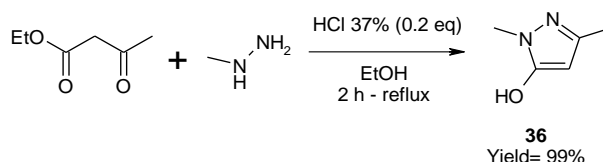
2-Methyl-5-(4-pyridyl)pyrazol-3-ol (**35**)



Orange solid
1.16 g – 65%
 $t_R = 1.98$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 176$
Purity (215 nm) 82%

No NMR was carried out due to the purity < 95%. Product will be purified at the final step.

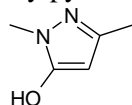
Partie expérimentale



Synthesis of the 2,5-dimethylpyrazol-3-ol (**36**)

To a solution of ethyl 3-oxobutanoate (1 eq) and methylhydrazine (1 eq) in ethanol ($C = 0.8 \text{ M}$), a solution of HCl 37% (0.2 eq) was added slowly. The reaction mixture was refluxed for 2 hours. It was cooled to $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and the precipitate was filtered off, washed with EtOH and dried under vacuum to give the desired compound **36**.

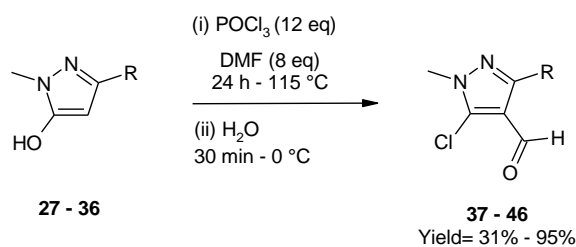
2,5-Dimethylpyrazol-3-ol (**36**)



White solid
1.12 g – 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 5.45 (s, 1H), 3.50 (s, 3H), 2.12 (s, 3H)

Intermediates 37 to 46

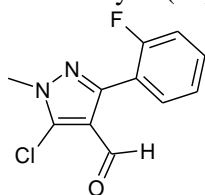


General procedure for the synthesis of the intermediates **37** to **46**

Phosphoryl trichloride (7 eq) was dissolved in DMF (3 eq). This solution was stirred at $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes. At $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a solution of the appropriate compound **27** to **36** (1 eq) in DMF (5 eq) and phosphoryl trichloride (5 eq) were successively added and the reaction mixture was refluxed overnight. The solution was cooled down to $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and water was carefully added. The resulting solution was extracted with EtOAc (3x). The combined organic layers were washed with brine (1x) dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo* to afford the desired compound (**37** to **46**). The residues (**37**, **39** to **42** and **44** to **46**) were used without further purification in the next step whereas the residues **38** and **43** were purified by flash chromatography.

Partie expérimentale

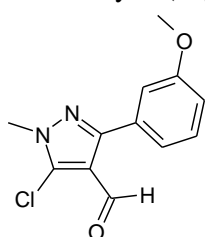
5-Chloro-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-pyrazole-4-carbaldehyde (**37**)



Brown solid
5.5 g – 87%
 $t_R = 2.85$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 239$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 9.71 (d, $J = 2$ Hz, 1H), 7.58 - 7.51 (m, 2H), 7.37 - 7.29 (m, 2H), 3.93 (s, 3H)

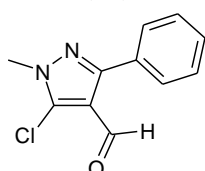
5-Chloro-3-(3-methoxyphenyl)-1-methyl-pyrazole-4-carbaldehyde (**38**)



Purified by flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 7/3
White solid
677 mg – 31%
 $t_R = 4.93$ min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 251$
Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 9.84 (s, 1H), 7.42 - 7.31 (m, 3H), 7.05 - 7.02 (m, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.80 (s, 3H)

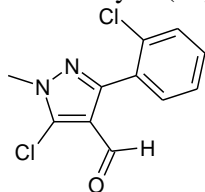
5-Chloro-1-methyl-3-phenyl-pyrazole-4-carbaldehyde (**39**)



Brown oil
2.9 g – 83%
 $t_R = 2.87$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 221$
Purity (215 nm) 100%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 9.84 (s, 1H), 7.77-7.73 (m, 2H), 7.49-7.46 (m, 2H), 3.91 (s, 3H)

5-Chloro-3-(2-chlorophenyl)-1-methyl-pyrazole-4-carbaldehyde (**40**)

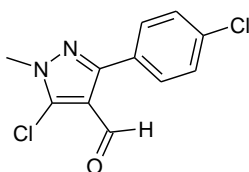


Brown oil
336 mg – 87%
 $t_R = 2.98$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 255$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 9.73 (s, 1H), 7.54 - 7.51 (m, 1H), 7.78 - 7.37 (m, 3H), 3.95 (s, 3H)

Partie expérimentale

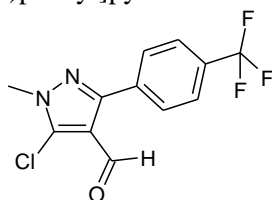
5-Chloro-3-(4-chlorophenyl)-1-methyl-pyrazole-4-carbaldehyde (**41**)



Brown solid
1.3 g – 92%
 $t_R = 13.7$ min (run 20 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 255$
Purity (215 nm) 89%

No NMR was carried out due to the purity < 95%. Product will be purified at the final step.

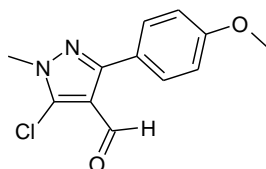
5-Chloro-1-methyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenyl]pyrazole-4-carbaldehyde (**42**)



Brown oil
1.0 g – 87%
 $t_R = 3.25$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 289$
Purity (215 nm) 95%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 9.96 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.74 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 3.97 (s, 3H)

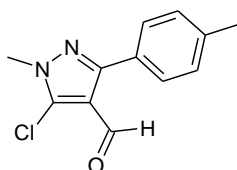
5-chloro-3-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-pyrazole-4-carbaldehyde (**43**)



Purified by flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 9/1
White solid
1.3 g – 50%
 $t_R = 2.98$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 251$
Purity (215 nm) 99%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 9.92 (s, 1H), 7.74 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.0 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.87 (s, 3H)

5-Chloro-1-methyl-3-(p-tolyl)pyrazole-4-carbaldehyde (**44**)



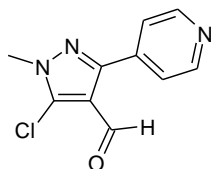
Brown solid
1.1 g – 95%
 $t_R = 3.08$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 235$
Purity (215 nm) 95%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 9.93 (s, 1H), 7.64 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.93 (s,

Partie expérimentale

3H), 2.43 (s, 3H)

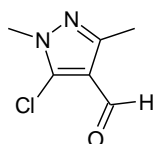
5-Chloro-1-methyl-3-(4-pyridyl)pyrazole-4-carbaldehyde (45)



Brown solid
1.3 g – 93%
 $t_R = 2.38$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 222$
Purity (215 nm) 95%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 9.98 (s, 1H), 8.96 (dd, $J = 4.5$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 2H), 7.81 (dd, $J = 4.5$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 2H), 3.97 (s, 3H)

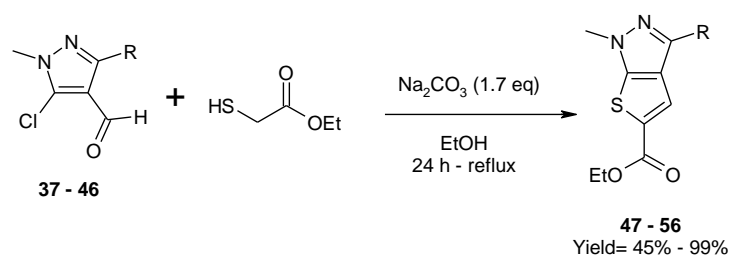
5-Chloro-1,3-dimethyl-pyrazole-4-carbaldehyde (46)



Yellow solid
976 mg – 63%
 $t_R = 1.85$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 159$
Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 9.77 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.34 (s, 3H)

Intermediates 47 to 56

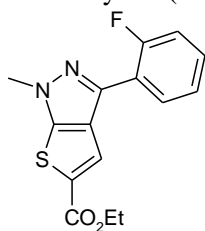


General procedure for the synthesis of the intermediates 47 to 56

To a solution of sodium carbonate (1.7 eq) and ethyl thioglycolate (1 eq) in ethanol ($C = 0.5$ M), the corresponding compound **37 to 46** (1 eq) was added and the reaction mixture was stirred at reflux for 24 hours. The solution was cooled to RT and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with water (3x) and brine (1x). The organic phase was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum to give the desired compound (**47 to 56**) which was used without further purification in the next step.

Partie expérimentale

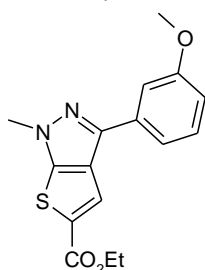
Ethyl 3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylate (**47**)



White solid
4.6 g – 65%
 $t_R = 3.62$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 305$
Purity (215 nm) 100%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 7.94 (dt, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 7.51 - 7.29 (m, 3H), 4.31 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

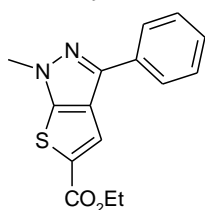
Ethyl 3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylate (**48**)



Yellow solid
835 mg – 98%
 $t_R = 3.45$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 317$
Purity (215 nm) 99%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.15 (s, 1H), 7.56 (dt, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.43 – 7.42 (m, 1H), 7.40 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.97 (ddd, $J = 7.8$ Hz, $J = 2.2$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H), 4.33 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

Ethyl 1-methyl-3-phenyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylate (**49**)

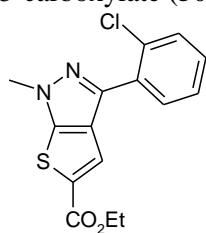


White solid
1.9 g – 51%
 $t_R = 5.74$ min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 287$
Purity (215 nm) 98%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.20 (s, 1H), 7.98 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.48 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.38 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.33 (q, $J = 7$ Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 1.33 (t, $J = 7$ Hz, 3H)

Partie expérimentale

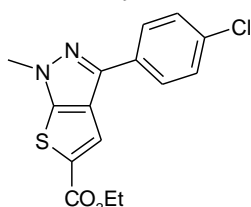
Ethyl 3-(2-chlorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylate (**50**)



Orange solid
190 mg – 45%
 $t_R = 3.47$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 321$
Purity (215 nm) 95%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 7.83 (s, 1H), 7.70 - 7.66 (m, 1H), 7.56 - 7.52 (m, 1H), 7.42 - 7.38 (m, 2H), 4.36 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 1.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

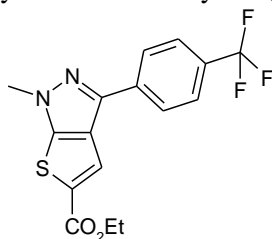
Ethyl 3-(4-chlorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylate (**51**)



Brown oil
 $t_R = 18.97$ min (run 30 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 321$
Purity (215 nm) 85%

No NMR was carried out due to the purity < 95%. Product will be purified at the final step.

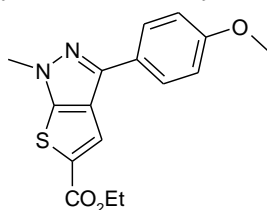
Ethyl 1-methyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylate (**52**)



Brown solid
1.2 g – 98%
 $t_R = 3.67$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 355$
Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.09 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 8.04 (s, 1H), 7.74 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.39 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 1.42 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)

Ethyl 3-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylate (**53**)

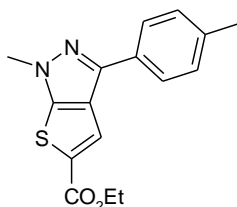


Brown solid
1.8 g – 98%
 $t_R = 3.27$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 317$
Purity (215 nm) 99%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.02 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.03 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 4.39 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 1.43 (t, $J = 76.8$ Hz, 3H)

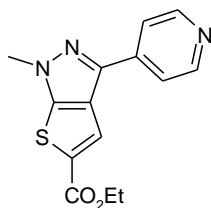
Ethyl 1-methyl-3-(p-tolyl)thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylate (**54**)



White solid
1.2 g – 87%
 $t_R = 3.57$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 301$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.03 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.38 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 1.41 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)

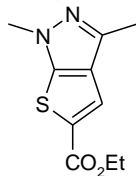
Ethyl 1-methyl-3-(4-pyridyl)thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylate (**55**)



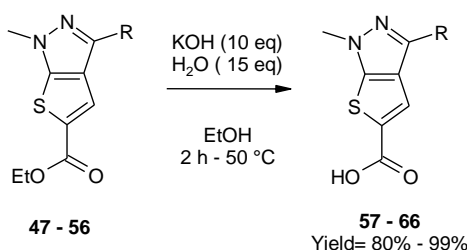
Brown solid
921 mg – 49%
 $t_R = 2.90$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 288$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.68 (dd, $J = 4.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 2H), 8.05 (s, 1H), 7.82 (dd, $J = 4.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 2H), 4.39 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.07 (s, 3H), 1.42 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H)

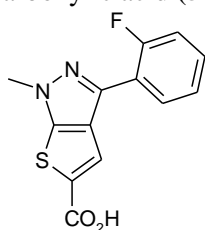
Ethyl 1,3-dimethylthieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylate (**56**)



Orange solid
1.4 mg – 99%
 $t_R = 2.63$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 225$
Purity (215 nm) 95%

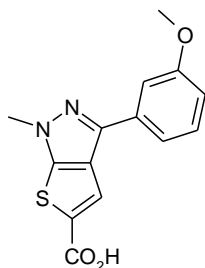
Intermediates **57** to **66**General procedure for the synthesis of the intermediates **57** to **66**

The appropriate compound **47** to **56** (1 eq) was dissolved in ethanol (C = 0.5 M). Potassium hydroxide (10 eq) and water (15 eq) were added to the solution and the reaction mixture was heated at 50 °C for 2 hours. The solution was cooled down to 0 °C, acidified to pH~1-2 with concentrated HCl (37%) and the product was extracted with EtOAc (3x). The combined organic layers were washed with brine (1x), dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue (**57** to **66**) was used without further purification in the next step.

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid (**57**)

White solid
 3.6 g – 90%
 $t_R = 2.63$ min (run 5 min)
 MS [M+H]⁺ $m/z = 277$
 Purity (215 nm) 100%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 13.32 (brs, OH), 7.94 (td, $J = 8$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 7.49 - 7.29 (m, 3H), 4.05 (s, 3H)

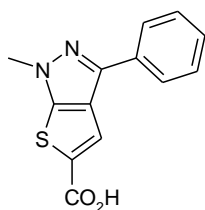
3-(3-Methoxyphenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid (**58**)

Yellow solid
 668 mg – 88%
 $t_R = 2.54$ min (run 5 min)
 MS [M+H]⁺ $m/z = 289$
 Purity (215 nm) 100%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 13.3 (brs, OH), 8.07 (s, 1H), 7.54 (dt, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.42 - 7.41 (m, 1H), 7.39 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.95 (ddd, $J = 8.1$ Hz, $J = 0.6$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 1H), 4.03 (s, 3H), 3.83 (s, 3H)

Partie expérimentale

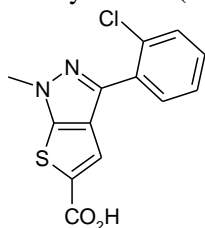
1-Methyl-3-phenyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid (**59**)



White solid
1.4 g – 82%
 $t_R = 2.60$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 259$
Purity (215 nm) 100%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 13.30 (brs, OH), 8.13 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.47 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.37 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.02 (s, 3H)

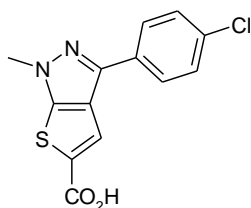
3-(2-Chlorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid (**60**)



Yellow solid
155 g – 80%
 $t_R = 2.67$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 293$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 13.3 (brs, OH), 7.71 (s, 1H), 7.69 - 7.66 (m, 1H), 7.63 - 7.60 (m, 1H), 7.49 - 7.42 (m, 2H), 4.05 (s, 3H)

3-(4-Chlorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid (**61**)

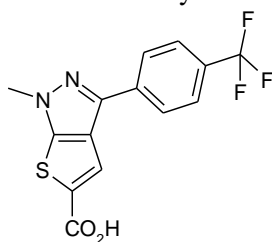


White solid
203 g – 80%
 $t_R = 4.73$ min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 293$
Purity (215 nm) 95%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 13.45 (brs, OH), 8.09 (s, 1H), 7.98 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.01 (s, 3H)

Partie expérimentale

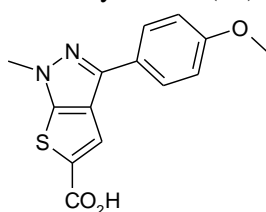
1-Methyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid (**62**)



White solid
562 mg – 80%
 $t_R = 2.93$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 327$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 13.31 (brs, OH), 8.19 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.06 (s, 3H)

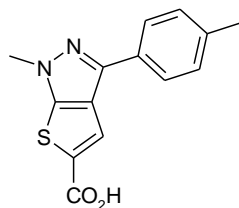
3-(4-Methoxyphenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid (**63**)



White solid
1.4 g – 86%
 $t_R = 2.63$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 289$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 13.25 (brs, OH), 8.08 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.80 (s, 3H)

1-Methyl-3-(p-tolyl)thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid (**64**)

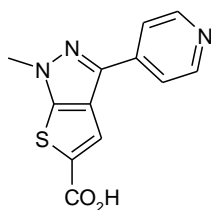


White solid
842 g – 81%
 $t_R = 2.8$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 273$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 13.25 (brs, OH), 8.09 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 2.34 (s, 3H)

Partie expérimentale

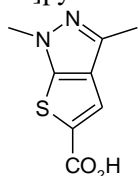
1-Methyl-3-(4-pyridyl)thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid (**65**)



Brown solid
743 g – 92%
 $t_R = 2.12$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 260$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.63 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 8.20 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 7.30 - 7.23 (brs, NH pyridinium), 4.06 (s, 3H)

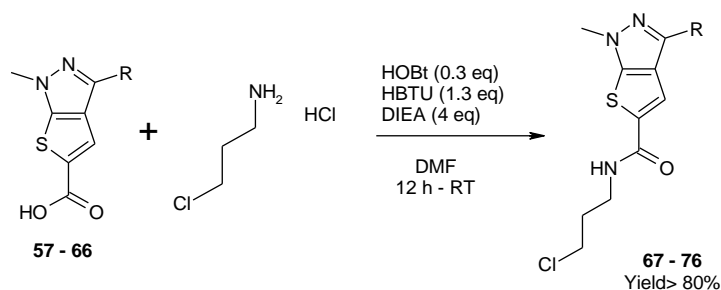
1,3-Dimethylthieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid (**66**)



White solid
509 mg – 80%
 $t_R = 1.62$ min (run 5min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 197$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 7.74 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 2.35 (s, 3H)

Intermediates **67** to **76**

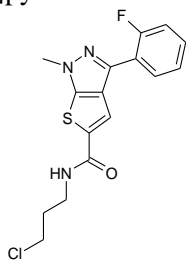


General procedure for the synthesis of the intermediates **67** to **76**

3-Chloro-propylamine hydrochloride (1.2 eq) was added to a solution of the corresponding carboxylic acid (**57** to **66**, 1 eq), HOBT (0.3 eq), HBTU (1.3 eq) and DIEA (4 eq) in DMF on molecular sieves ($C = 0.5$ M). The reaction mixture was stirred at RT overnight. DMF was then evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated NaHCO_3 aq (3x), HCl_{aq} 1 N (3x) and brine (1x). The organic phase was then dried over MgSO_4 and concentrated to dryness to give the desired product (**67** to **76**) which was used without further purification in the next step.

Partie expérimentale

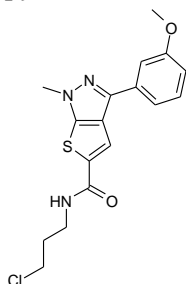
N-(3-chloropropyl)-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**67**)



Brown solid
878 mg – 99%
 $t_R = 3.12$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 352$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.72 (t, $J = 6.5$ Hz, NH), 7.96 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.91 (td, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.50 - 7.29 (m, 3H), 4.03 (s, 3H), 3.70 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.37 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.98 (quint, 2 H, $J = 6.5$ Hz, 2H)

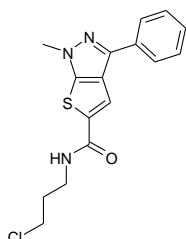
N-(3-chloropropyl)-3-(3-methoxyphenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**68**)



Brown oil
420 mg – 96%
 $t_R = 3.10$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 365$
Purity (215 nm) 100%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.67 (t, 0.9 H, $J = 6$ Hz, NH), 8.19 (s, 1H), 7.50 - 7.39 (m, 3H), 7.00 - 6.96 (m, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.72 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.40 (q, $J = 6$ Hz, 2H), 1.99 (quint, $J = 6$ Hz, 2H)

N-(3-chloropropyl)-1-methyl-3-phenyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**69**)

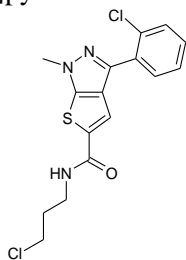


White solid
400 mg – 80%
 $t_R = 3.12$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 334$
Purity (215 nm) 100%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.64 (t, $J = 6.4$ Hz, NH), 8.22 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.50 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.39 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.72 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.40 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.99 (quint, $J = 6.4$ Hz, 2H)

Partie expérimentale

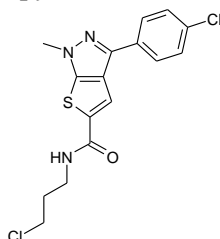
3-(2-Chlorophenyl)-*N*-(3-chloropropyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**70**)



Brown oil
160 mg – 99%
 $t_R = 3.12$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 368$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 7.70 - 7.67 (m, 1H), 7.55 - 7.52 (m, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.40 - 7.37 (m, 2H), 6.29 (brs, NH), 4.05 (s, 3H), 3.67 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.59 (q, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.11 (quint, $J = 6.4$ Hz, 2H)

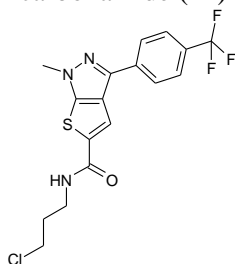
3-(4-Chlorophenyl)-*N*-(3-chloropropyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**71**)



Brown solid
180 g – 89%
 $t_R = 3.28$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 368$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 7.87 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.64 (s, 1H), 7.46 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.33 (brs, NH), 4.02 (s, 3H), 3.70 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.62 (td, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.14 (quint, $J = 6.2$ Hz, 2H)

N-(3-chloropropyl)-1-methyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**72**)

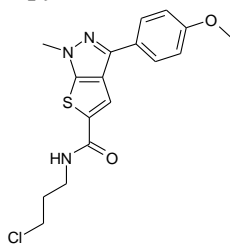


Brown oil
600 mg – 90%
 $t_R = 3.37$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 402$
Purity (215 nm) 95%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.69 (t, $J = 5.8$ Hz, NH), 8.23 (s, 1H), 8.09 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.85 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.73 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.4 - 3.3 (m, 2H), 2.0 (quint, $J = 6.2$ Hz, 2H)

Partie expérimentale

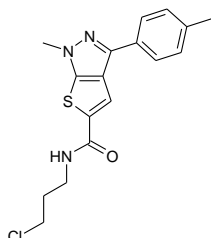
N-(3-chloropropyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1-methylthieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**73**)



Brown oil
200 mg – 92%
 $t_R = 3.05$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 364$
Purity (215 nm) 80%

No NMR was carried out due to the purity < 95%. Product will be purified at the final step.

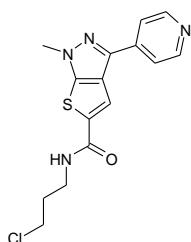
N-(3-chloropropyl)-1-methyl-3-(*p*-tolyl)thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**74**)



Brown oil
975 mg – 91%
 $t_R = 3.20$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 348$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.63 (t, $J = 5.8$ Hz, NH), 8.20 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.72 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.39 (td, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.99 (tt, $J = 6.3$ Hz, 2H)

N-(3-chloropropyl)-1-methyl-3-(4-pyridyl)thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**75**)

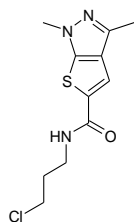


Brown solid
150 mg – 90%
 $t_R = 4.2$ min (run 10min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 335$
Purity (215 nm) 90%

No NMR was carried out due to the purity < 95%. Product will be purified at the final step.

Partie expérimentale

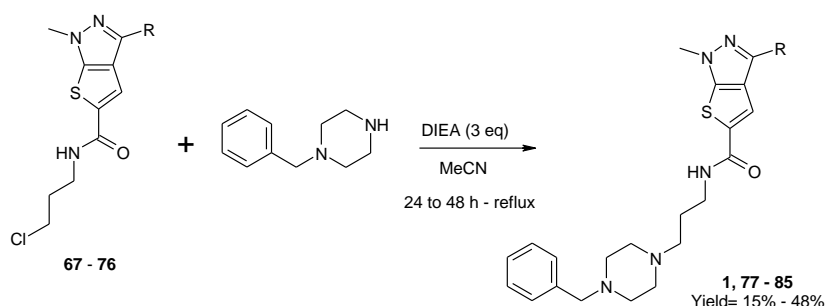
N-(3-chloropropyl)-1,3-dimethyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**76**)



Orange oil
 275 mg – 99%
 $t_R = 2.23$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 272$
 Purity (215 nm) 85%

No NMR was carried out due to the purity < 95%. Product will be purified at the final step.

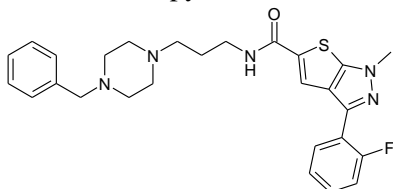
Final products **1** to **85**



General procedure for the synthesis of the final products **1**, **77** to **85**

1-Benzylpiperazine (1.1 eq) was added to a solution of the appropriate chlorinated compound (**67** to **76**, 1 eq) in MeCN (C = 0.5 M). The reaction mixture was refluxed for 24 to 48 hours. At the end, the solution was cooled to RT and MeCN was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ (3x) and brine (1x). The organic phase was dried over MgSO_4 and evaporated *in vacuo*. The residue was purified either by preparative HPLC (Waters-2, MeCN/ $(\text{H}_2\text{O}-\text{HCO}_2\text{NH}_4^+$ pH 9.2), 10/90 to 100/0, 30 min) or by precipitation in MeCN to give the desired compound (**1**, **77** to **85**).

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**1**)



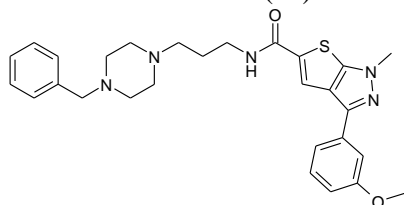
Purified by preparative HPLC
 White solid
 93 mg – 34%
 $t_R = 5.0$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 492$
 Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.28 (brs, NH), 8.03 (td, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.44 - 7.38 (m, 1H), 7.37 - 7.20 (m, 7H), 4.05 (s, 3H), 3.56 - 3.51 (m, 2H), 3.43 (s, 2H), 2.78 - 2.74 (m, 4H), 2.76 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.64 - 2.56 (m, 4H), 1.89 (quint, $J = 6.1$ Hz, 2H)

Partie expérimentale

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.8, 159.8 (d, $J = 253$ Hz), 146.5, 138.6, 137.8, 137.7 (d, $J = 3$ Hz), 129.7 (d, $J = 8$ Hz), 129.2 (d, $J = 3$ Hz), 129.0, 128.3, 128.2, 127.2, 124.6 (d, $J = 4.5$ Hz), 120.7 (d, $J = 16$ Hz), 119.1 (d, $J = 13.5$ Hz), 116.1 (d, $J = 22$ Hz), 62.2, 56.6, 52.7, 51.6, 39.3, 38.5, 23.9

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-3-(3-methoxyphenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**77**)

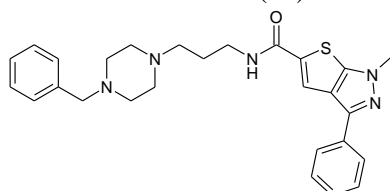


Purified by preparative HPLC
White solid
141 mg – 44%
 $t_R = 5.59$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 504$
Purity (215 nm) 98%

^1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.34 (brs, NH), 7.75 (s, 1H), 7.57 - 7.16 (m, 8H) 6.93 (ddd, $J = 2.3$ Hz, $J = 1$ Hz, 1H), 4.03 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.58 – 3.52 (m, 2H), 3.31 (s, 2H), 2.60 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.58 - 2.51 (m, 8H), 1.80 (quint, $J = 6.1$ Hz, 2H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.8, 159.8, 146.5, 138.6, 137.8, 137.7, 129.7, 129.2, 129.0, 128.3, 128.2, 127.2, 124.6, 120.7, 119.1, 116.1, 62.4, 62.2, 56.6, 52.7, 51.6, 39.3, 38.5, 23.9

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-3-(3-methoxyphenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**78**)

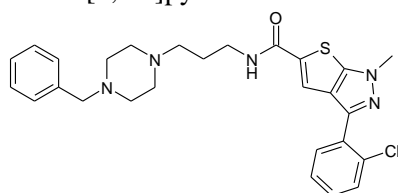


Purified by preparative HPLC
White solid
110 mg – 35%
 $t_R = 4.55$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 474$
Purity (215 nm) 100%

^1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.31 (brs, NH), 8.05 (s, 1H), 7.99 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, 2H), 7.49 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.41 - 7.37 (m, 1H), 7.36 - 7.23 (m, 5H), 4.03 (s, 3H), 3.55 - 3.51 (m, 2H), 3.45 (s, 2H), 2.84 – 2.80 (m, 4H), 2.82 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.65 - 2.60 (m, 4H), 1.94 (quint, $J = 6.4$ Hz, 2H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.7, 146.9, 143.6, 138.0, 137.8, 133.0, 129.0, 128.9, 128.2, 128.0, 127.2, 127.0, 126.1, 118.2, 62.3, 56.3, 52.6, 51.5, 38.9, 38.2, 23.9

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-3-(2-chlorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**79**)



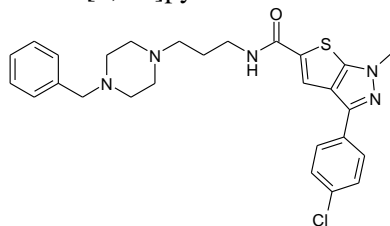
Purified by preparative HPLC
White solid
99 mg – 41%
 $t_R = 4.5$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 508$
Purity (215 nm) 95%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.44 (brs, NH), 7.76 - 7.73 (m, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.57 - 7.54 (m, 1H), 7.44 - 7.22 (m, 5H), 7.19 - 7.15 (m, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.52 (q, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.21 (s, 2H), 2.65 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.58 - 2.41 (m, 8H), 1.82 (quint, $J = 6.0$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 167.8, 162.5, 145.9, 142.0, 138.2, 138.1, 132.4, 132.2, 131.6, 130.2, 129.7, 129.1, 128.2, 127.1, 127.0, 118.5, 62.4, 57.8, 53.1, 52.5, 40.4, 38.3, 23.9

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-3-(4-chlorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**80**)



Purified by preparative HPLC

White solid

60 mg – 48%

$t_R = 5.35$ min (run 10 min)

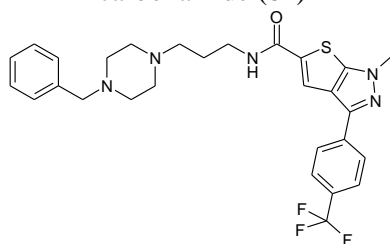
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 508$

Purity (215 nm) 96%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.41 (brs, NH), 7.94 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.36 - 7.22 (m, 5H), 4.04 (s, 3H), 3.58 - 3.52 (m, 2H), 3.42 (s, 2H), 2.77 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.75 - 2.54 (m, 8H), 1.91 (quint, $J = 6.3$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.5, 159.7, 146.7, 143.6, 138.2, 137.7, 128.9, 128.2, 127.4, 127.1, 126.4, 125.8, 117.9, 114.3, 62.4, 57.0, 52.9, 52.2, 39.8, 38.4, 23.8

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-1-methyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**81**)



Purified by preparative HPLC

White solid

240 mg – 41%

$t_R = 5.27$ min (run 10 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 542$

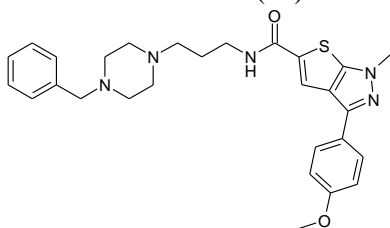
Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.44 (brs, NH), 8.29 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.38 - 7.26 (m, 5H), 4.05 (s, 3H), 3.56 - 3.51 (m, 2H), 3.54 (s, 2H), 3.05 - 2.90 (m, 4H), 2.98 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.78 - 2.67 (m, 4H), 2.05 (quint, $J = 6.9$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.8, 147.1, 142.1, 138.6, 137.4, 136.5, 129.3 (q, $J = 32$ Hz), 129.0, 128.3, 127.4, 127.3, 126.1, 125.7 (q, $J = 4$ Hz), 124.4 (q, $J = 272$ Hz), 118.4, 62.1, 55.0, 52.2, 50.5, 38.5, 38.0, 23.5

Partie expérimentale

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-3-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**82**)

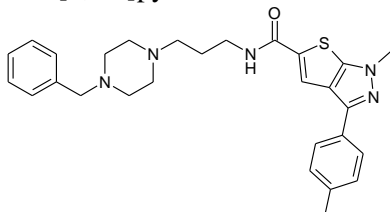


Purified by preparative HPLC
 Yellow solid
 54 mg – 36%
 $t_R = 4.55$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 504$
 Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.36 (brs, NH), 7.91 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.35 - 7.25 (m, 3H), 7.25 - 7.20 (m, 2H), 7.03 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.55 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.28 (s, 2H), 2.76 - 2.48 (m, 8H), 2.70 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 1.86 (quint, $J = 5.8$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.5, 159.7, 146.7, 143.6, 138.2, 137.7, 128.9, 128.2, 127.4, 127.1, 126.4, 125.8, 117.9, 114.3, 62.5, 57.6, 55.4, 52.7, 52.5, 40.2, 38.2, 24.0

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-1-methyl-3-(*p*-tolyl)thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**83**)

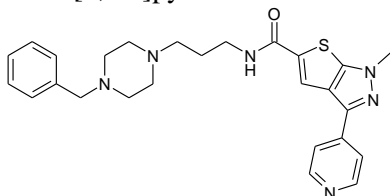


Purified by preparative HPLC
 White solid
 141 mg – 15%
 $t_R = 4.9$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 488$
 Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.39 (brs, NH), 8.07 (s, 1H), 7.88 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.36 - 7.24 (m, 7H), 4.02 (s, 3H), 3.57 - 3.51 (m, 2H), 3.47 (s, 2H), 2.84 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.87 - 2.72 (m, 4H), 2.72 - 2.60 (m, 4H), 2.42 (s, 3H), 1.96 (quint, $J = 6.3$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.9, 146.6, 143.8, 138.1, 137.8, 137.7, 130.2, 129.6, 129.0, 128.3, 127.2, 126.8, 125.9, 118.4, 62.3, 56.2, 52.6, 51.5, 39.0, 38.3, 23.8, 21.1

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-1-methyl-3-(4-pyridyl)thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**84**)



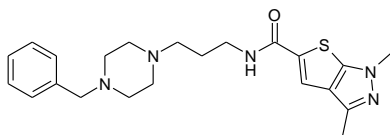
Purified by precipitation in MeCN
 White solid
 18 mg – 15%
 $t_R = 4.7$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 475$
 Purity (215 nm) 96%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.70 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 8.38 (brs, NH), 7.85 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.35 - 7.23 (m, 3H), 7.23 - 7.16 (m, 2H), 4.09 (s, 3H), 3.57 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.35 (s, 2H), 2.68 - 2.44 (m, 8H), 2.61 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 1.81 (quint, $J = 6.1$ Hz, 2H)

Partie expérimentale

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.0, 150.5, 147.0, 140.8, 140.1, 139.5, 138.5, 128.8, 128.1, 127.2, 126.9, 120.3, 116.6, 62.8, 58.6, 53.5, 52.1, 41.2, 38.6, 24.2

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-1,3-dimethyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**85**)



Purified by preparative HPLC

Brown oil

54 mg – 24%

$t_R = 3.07$ min (run 10 min)

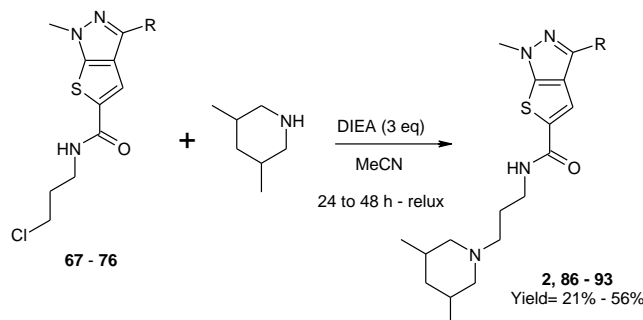
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 412$

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.36 (brs, NH), 7.64 (s, 1H), 7.36-7.27 (m, 5H), 3.89 (s, 3H), 3.57 (s, 2H), 3.54-3.49 (m, 2H), 2.80 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.84-2.62 (m, 8H), 2.47 (s, 3H), 1.92 (quint, $J = 6.2$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.85, 145.93, 141.38, 137.71, 136.50, 129.06, 128.83, 128.29, 127.27, 117.27, 62.54, 56.30, 52.60, 51.61, 39.01, 37.84, 23.88, 12.78

Final products 2, 86 to 93

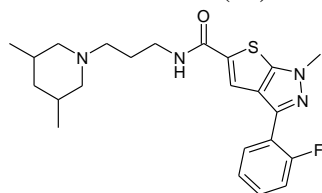


General procedure for the synthesis of the final products 2, 86 to 93

3,5-Dimethylpiperidine (1.1 eq) was added to a solution of the appropriate chlorinated compound (**67** to **76**, 1 eq) in MeCN ($C = 0.5$ M). The reaction mixture was refluxed for 24 to 48 hours. At the end, the solution was cooled to RT and MeCN was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ (3x) and brine (1x). The organic phase was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The residue was purified either by preparative HPLC (Waters-2, MeCN/ $(\text{H}_2\text{O}-\text{HCO}_2\text{NH}_4^+$ pH 9.2), 10/90 to 100/0, 30 min) or by precipitation in MeCN to give the desired compound (**2, 86 to 93**).

Partie expérimentale

N-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**86**)

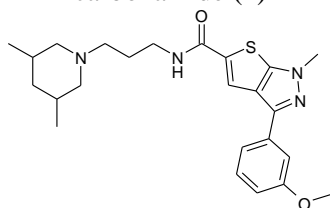


Purified by preparative HPLC
 White solid
 58 mg – 26%
 $t_R = 5.75$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 429$
 Purity (215 nm) 100%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.64 (brs, NH), 8.02 - 7.96 (m, 2H), 7.42 - 7.34 (m, 1H), 7.29 - 7.24 (m, 1H), 7.23 - 7.18 (m, 1H), 4.0 (s, 3H), 3.51 (brs, 2H), 3.27 (dd, $J = 10$ Hz, $J = 2$ Hz, 2H), 2.95 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.08 - 1.99 (m, 4H), 1.99 - 1.82 (m, 4H), 1.05 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 0.92 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H), 0.70 (q, $J = 11.9$ Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 163, 159.8 (d, $J = 247$ Hz), 146.5, 138.7, 137.7, 129.7 (d, $J = 10.7$ Hz), 129.1 (d, $J = 3$ Hz), 128.5, 124.4 (d, $J = 3$ Hz), 120.7 (d, $J = 14.8$ Hz), 119.8 (d, $J = 12.1$ Hz), 116.0 (d, $J = 22$ Hz), 59.1, 55.2, 40.5, 38.4, 38, 29, 23.5, 18.8, 18.5

N-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**2**)

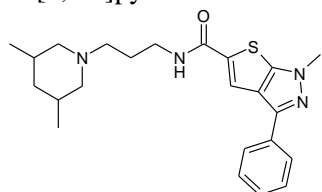


Purified by preparative HPLC
 White solid
 127 mg – 52%
 $t_R = 5.67$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 441$
 Purity (215 nm) 95%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.80 (brs, NH), 7.97 (s, 1H), 7.52 - 7.48 (m, 2H), 7.42 - 7.36 (m, 1H), 6.93 (ddd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.3$ Hz, $J = 1$ Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.56 - 3.51 (m, 2H), 3.17 - 3.13 (m, 2H), 2.78 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.05 - 1.80 (m, 5H), 1.70 (t, $J = 11.3$ Hz, 2H), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H), 0.67 (q, $J = 11.6$ Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 168, 160.2, 146.9, 143.4, 138.6, 134.4, 129.8, 127, 118.5, 117.7, 113.4, 111, 60.5, 57, 55.3, 41.2, 39.7, 38.3, 30.4, 23.5, 19.1, 19.0

N-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]-1-methyl-3-phenyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**87**)



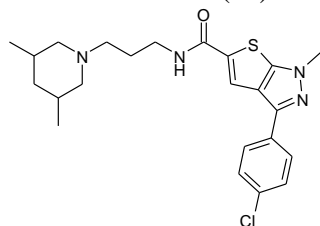
Purified by preparative HPLC
 White solid
 110 mg – 43%
 $t_R = 4.65$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 411$
 Purity (215 nm) 100%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.76 (brs, NH), 8.14 (s, 1H), 7.97 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 2H), 7.49 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.38 (tt, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H), 4.03 (s, 3H), 3.58 - 3.52 (m, 2H), 3.25 - 3.21 (m, 2H), 2.89 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.06 - 1.95 (m, 4H), 1.91 - 1.79 (m, 3H), 1.06 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 0.94 (d, $J = 6.6$ Hz, 5H), 0.71 (q, $J = 13.1$ Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.8, 146.9, 143.5, 138.2, 133.0, 128.8, 128.0, 127.1, 125.9, 118.3, 59.7, 56.0, 40.8, 38.8, 38.3, 29.8, 23.5, 19.0, 18.7

3-(4-Chlorophenyl)-*N*-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**88**)

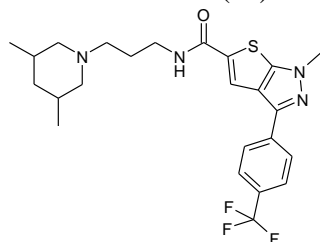


Purified by preparative HPLC
White solid
62 mg – 56%
 $t_R = 2.98$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 445$
Purity (215 nm) 96%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.81 (brs, NH), 7.85 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.59 (s, 1H), 7.46 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.59 - 3.54 (m, 2H), 3.07 - 3.03 (m, 2H), 2.61 - 2.57 (m, 2H), 2.00 - 1.78 (m, 5H), 1.49 (t, $J = 11.0$ Hz, 2H), 1.00 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 5H), 0.67 (q, $J = 12.7$ Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.1, 147.0, 142.2, 139.1, 133.6, 131.8, 129.1, 127.2, 126.6, 116.4, 61.9, 59.3, 42.1, 41.6, 38.4, 31.9, 23.8, 19.5

N-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]-1-methyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**89**)



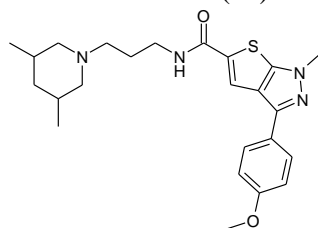
Purified by precipitation in MeCN
White solid
159 mg – 31%
 $t_R = 5.38$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 479$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.85 (brs, NH), 8.02 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.73 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.62 (s, 1H), 4.05 (s, 3H), 3.56 (q, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.06 - 3.03 (m, 2H), 2.58 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 1.86 - 1.75 (m, 5H), 1.48 (t, $J = 11.2$ Hz, 2H), 0.91 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H), 0.67 (q, $J = 14.2$ Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162, 147, 141.8, 139.6, 136.7, 129.4 (q, $J = 32$ Hz), 126.9, 126, 125.7 (q, $J = 4$ Hz), 124.4 (q, $J = 272$ Hz), 116.1, 61.8, 59.3, 42.1, 41.7, 38.5, 31.9, 23.8, 19.4

Partie expérimentale

N-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]-3-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**90**)

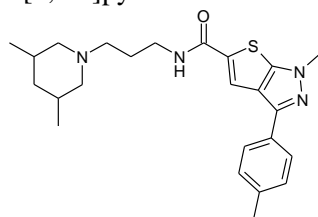


Purified by preparative HPLC
 White solid
 60 mg – 45%
 $t_R = 4.55$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 441$
 Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.76 (brs, NH), 7.90 (s, 1H), 7.86 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.01 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.57 - 3.51 (m, 2H), 3.18 - 3.12 (m, 2H), 2.75 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 1.99 - 1.81 (m, 5H), 1.68 (t, $J = 11.3$ Hz, 2H), 1.02 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 0.93 (d, $J = 6.9$ Hz, 5H), 0.69 (q, $J = 11.3$ Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.6, 159.7, 146.8, 143.5, 138.1, 127.3, 126.5, 125.8, 117.8, 114.2, 60.6, 57.4, 55.3, 41.4, 39.9, 38.2, 30.6, 23.7, 19.2

N-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]-1-methyl-3-(*p*-tolyl)thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**91**)

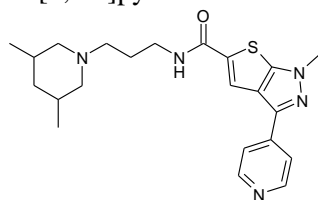


Purified by precipitation in MeCN
 White solid
 355 mg – 44%
 $t_R = 2.87$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 425$
 Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.83 (brs, NH), 7.78 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.29 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.56 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.06 - 3.03 (m, 2H), 2.58 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 1.93 - 1.75 (m, 5H), 1.48 (t, $J = 10.8$ Hz, 2H), 1.01 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 0.92 (d, $J = 6.3$ Hz, 5H), 0.66 (q, $J = 12.6$ Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.1, 146.7, 143.6, 138.6, 138.1, 130.3, 129.5, 126.5, 125.7, 116.7, 61.9, 59.4, 42.1, 41.8, 38.3, 31.8, 23.8, 21.0, 19.5, 19.3

N-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]-1-methyl-3-(4-pyridyl)thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**92**)



Purified by preparative HPLC
 White solid
 24 mg – 23%
 $t_R = 3.63$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 412$
 Purity (215 nm) 99%

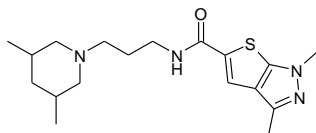
$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.87 (brs, NH), 8.67 (dd, $J = 4.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 2H), 8.30 (s, 1H), 7.85 (dd, $J = 4.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.57 - 3.49 (m, 2H), 3.30 - 3.22 (m, 2H), 2.95 (t, $J = 6.8$

Partie expérimentale

Hz, 2H), 2.16 - 1.98 (m, 4H), 1.93 - 1.86 (m, 1H), 1.90 (t, $J = 11.7$ Hz, 2H), 1.08 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 0.95 (d, $J = 6.8$ Hz, 5H), 0.74 (q, $J = 12.0$ Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.7, 150.3, 147.2, 140.8, 140.0, 139.5, 127.7, 120.0, 118.0, 59.3, 55.0, 40.6, 38.6, 38.4, 29.5, 23.4, 18.9, 18.6

N-[3-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)propyl]-1,3-dimethyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**93**)



Purified by preparative HPLC

White solid

40 mg – 21%

$t_R = 2.9$ min (run 10 min)

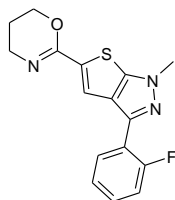
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 349$

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.63 (brs, NH), 7.69 (s, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.53-3.48 (m, 2H), 3.23-3.19 (m, 2H), 2.86 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.06-1.93 (m, 4H), 1.88-1.78 (m, 3H), 1.04 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 0.93 (d, $J = 6.5$ Hz, 5H), 0.76-0.64 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 163.0, 145.9, 141.4, 136.6, 128.9, 117.5, 59.6, 55.8, 40.8, 38.4, 37.8, 29.6, 23.6, 18.9, 12.5

2-[3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazol-5-yl]-5,6-dihydro-4H-1,3-oxazine (**94**)



Purified by preparative HPLC

White solid

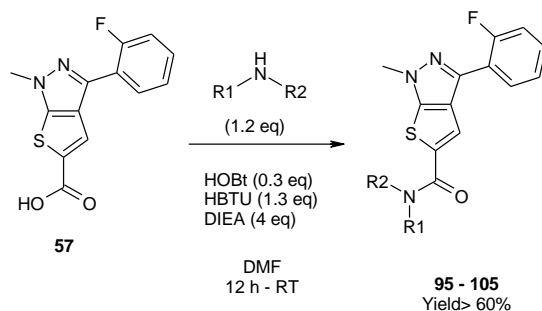
20 mg – 10%

$t_R = 2.2$ min (run 5 min)

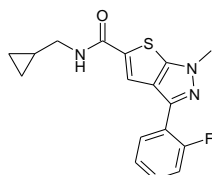
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 316$

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ (ppm) 7.91 (td, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.45-7.27 (m, 4H), 4.33 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.44 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.9 (quint, $J = 5.5$ Hz, 2H)

Synthesis of the final products 95 to 106**Final products 95 to 105****General procedure for the synthesis of the final products 95 to 105**

The corresponding amine (1.2 eq) was added to a solution of 3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid **57** (1 eq), HOBt (0.3 eq), HBTU (1.3 eq) and DIEA (4 eq) in DMF on molecular sieves ($C = 0.5 \text{ M}$). The reaction mixture was stirred at RT overnight. DMF was then evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated NaHCO_3 aq (3x), HCl_{aq} 1 N (3x) and brine (1x). The organic phase was then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The residue was purified either by preparative HPLC (Waters-2, MeCN/ $(\text{H}_2\text{O}-\text{HCO}_2\text{NH}_4^+$ pH 9.2), 10/90 to 100/0, 30 min) or precipitation in MeCN to give the desired compound (**95** to **105**).

***N*-(cyclopropylmethyl)-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxamide (**95**)**

Purified by precipitation in MeCN

White solid

155 mg – 94%

 $t_R = 2.88 \text{ min}$ (run 5 min)MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 330$

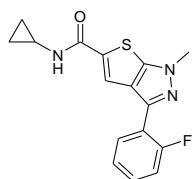
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.00 (td, $J = 7.5 \text{ Hz}$, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H), 7.59 (d, $J = 3.7 \text{ Hz}$, 1H), 7.43-7.36 (m, 1H), 7.30-7.19 (m, 2H), 6.26 (brs, NH), 4.05 (s, 3H), 3.3 (dd, $J = 5.7$, $J = 6.8$, 2H), 1.15-1.03 (m, 1H), 0.62-0.56 (m, 2H), 0.33-0.28 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.3, 159.5 (d, $J = 254 \text{ Hz}$), 146.5, 138.5, 137.1, 129.7 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$), 129.0 (d, $J = 4 \text{ Hz}$), 128.1, 124.5 (d, $J = 4 \text{ Hz}$), 120.5 (d, $J = 14.9 \text{ Hz}$), 118.6 (d, $J = 13.7 \text{ Hz}$), 116.0 (d, $J = 21.2 \text{ Hz}$), 44.9, 38.4, 10.7, 3.30

Partie expérimentale

N-cyclopropyl-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**96**)

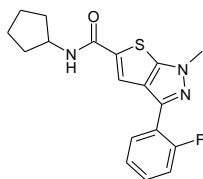


Purified by precipitation in MeCN
 White solid
 97 mg – 77%
 $t_R = 5.0$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 316$
 Purity (215 nm) 98%

1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.00 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 7.42 - 7.34 (m, 1H), 7.29 - 7.24 (m, 1H), 7.23 - 7.16 (m, 1H), 6.43 (brs, NH), 4.04 (s, 3H), 4.03 - 3.93 (sex, $J = 3.6$ Hz, 1H), 0.90 - 0.83 (m, 2H), 0.70 - 0.65 (m, 2H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 163.7, 159.6 (d, $J = 248.4$ Hz), 146.5, 138.6, 136.8 (d, $J = 3.4$ Hz), 129.7 (d, $J = 8.7$ Hz), 129.0 (d, $J = 4.6$ Hz), 128.1, 124.6 (d, $J = 3.3$ Hz), 120.4 (d, $J = 13.4$ Hz), 118.9 (d, $J = 14.4$ Hz), 115.9 (d, $J = 22.0$ Hz), 38.6, 23.0, 6.5

N-cyclopentyl-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**97**)

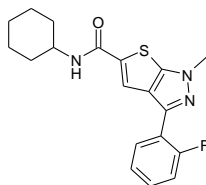


Purified by precipitation in MeCN
 White solid
 158 mg – 92%
 $t_R = 3.03$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 344$
 Purity (215 nm) 100%

1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.00 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.43 - 7.65 (m, 1H), 7.30 - 7.18 (m, 2H), 6.07 (d, $J = 6.5$ Hz, NH), 4.35 (sex, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.04 (s, 3H), 2.14 - 2.1 (m, 2H), 1.8 - 1.63 (m, 4H), 1.58 - 1.48 (m, 2H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.0, 159.7 (d, $J = 249.7$ Hz), 146.6, 138.6, 137.4 (d, $J = 4.7$ Hz), 129.7 (d, $J = 7.8$ Hz), 129.0 (d, $J = 4.7$ Hz), 128.1, 124.5 (d, $J = 3.1$ Hz), 120.5 (d, $J = 12.5$ Hz), 118.4 (d, $J = 12.5$ Hz), 115.9 (d, $J = 21.8$ Hz), 51.9, 38.4, 33.1, 23.8

N-cyclohexyl-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**98**)



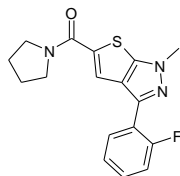
Purified by precipitation in MeCN
 White solid
 159 mg – 89%
 $t_R = 3.18$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 358$
 Purity (215 nm) 100%

1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.97 (td, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.4 - 7.33 (m, 1H), 7.27 - 7.17 (m, 2H), 5.97 (d, $J = 7.7$ Hz, NH), 4.01 (s, 3H), 3.95 - 3.83 (m, 1H), 2.04 - 1.99 (m, 2H), 1.8 - 1.78 (m, 2H), 1.69 - 1.62 (m, 1H), 1.5 - 1.3 (m, 5H)

Partie expérimentale

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 161.4, 159.7 (d, $J = 247.8$ Hz), 146.4, 138.5, 137.5 (d, $J = 3.5$ Hz), 129.6 (d, $J = 8.6$ Hz), 129.0 (d, $J = 3.5$ Hz), 128.1, 124.5 (d, $J = 3.5$ Hz), 120.5 (d, $J = 13.8$ Hz), 118.3 (d, $J = 13.8$ Hz), 115.9 (d, $J = 22.4$ Hz), 49.1, 38.4, 33.2, 25.5, 25

[3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazol-5-yl]-pyrrolidin-1-yl-methanone (**99**)

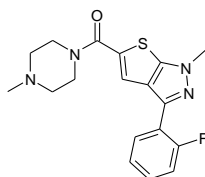


Purified by precipitation in MeCN
White solid
154 mg – 94%
 $t_{\text{R}} = 2.68$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 330$
Purity (215 nm) 99%

^1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.00 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.43 - 7.36 (m, 1H), 7.3 - 7.18 (m, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.85 - 3.65 (m, 4H), 2.04 - 1.97 (m, 4H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 161.8, 159.8 (d, $J = 248.6$ Hz), 146.3, 138.7 (d, $J = 3.1$ Hz), 138.6, 129.6 (d, $J = 9$ Hz), 129.1 (d, $J = 4.5$ Hz), 128.7, 124.5 (d, $J = 3$ Hz), 120.9 (d, $J = 15$ Hz), 120.6 (d, $J = 12$ Hz), 116 (d, $J = 22.5$ Hz), 48.8, 47.6, 38.5, 26.8, 23.9

[3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazol-5-yl]-
(4-methylpiperazin-1-yl)methanone (**100**)

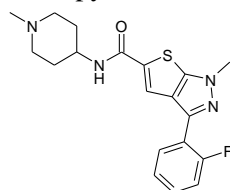


Purified by preparative HPLC
White solid
129 mg – 64%
 $t_{\text{R}} = 2.95$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 359$
Purity (215 nm) 100%

^1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.99 (td, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.43 - 7.6 (m, 2H), 7.3 - 7.19 (m, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.88 (t, $J = 5.06$ Hz, 4H), 2.62 (t, $J = 5.2$ Hz, 4H), 2.4 (s, 3H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 163.3, 159.8 (d, $J = 246.1$ Hz), 146.0, 138.4, 134.4 (d, $J = 3.3$ Hz), 129.7 (d, $J = 8.7$ Hz), 129.0 (d, $J = 5.2$ Hz), 127.8, 124.5 (d, $J = 3.6$ Hz), 120.8 (d, $J = 14.8$ Hz), 120.5 (d, $J = 13.6$ Hz), 116.0 (d, $J = 21.9$ Hz), 54.3, 45.0, 44.7, 38.5

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-N-(1-methyl-4-piperidyl)thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxamide (**101**)



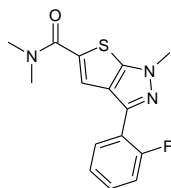
Purified by preparative HPLC
White solid
100 mg – 60%
 $t_{\text{R}} = 4.53$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 373$
Purity (215 nm) 98%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.00 (td, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.43 - 7.35 (m, 1H), 7.30 - 7.25 (m, 1H), 7.24 - 7.18 (m, 1H), 6.57 (d, $J = 8$ Hz, NH), 4.04 (s, 3H), 4.03 - 3.93 (m, 1H), 3.00 - 2.97 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.29 (td, $J = 12$ Hz, $J = 2.8$ Hz, 2H), 2.07 - 2.03 (m, 2H), 1.76 (qd, $J = 11.8$ Hz, $J = 3.8$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 161.8, 159.9 (d, $J = 247.8$ Hz), 146.5, 138.6, 137.2 (d, $J = 3$ Hz), 129.8 (d, $J = 8.3$ Hz), 129.0 (d, $J = 4.2$ Hz), 128.1, 124.6 (d, $J = 3.7$ Hz), 120.5 (d, $J = 14.1$ Hz), 118.8 (d, $J = 11.5$ Hz), 116.0 (d, $J = 21.6$ Hz), 54.2, 46.5, 45.3, 38.5, 31.6

3-(2-Fluorophenyl)-*N,N*,1-trimethyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**102**)

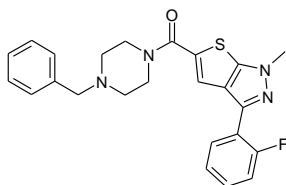


Purified by precipitation in MeCN
White solid
153 mg – 99%
 $t_R = 2.5$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 304$
Purity (215 nm) 100%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.99 (td, $J = 7.5$, $J = 1.6$, 1H), 7.47 (d, $J = 3.9$, 1H), 7.43 - 7.35 (m, 1H), 7.30 - 7.18 (m, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.23 (brs, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 164.1, 159.7 (d, $J = 246.3$ Hz), 146.1, 138.5, 136.1 (d, $J = 2.4$ Hz), 129.7 (d, $J = 7.2$ Hz), 129.1 (d, $J = 3.6$ Hz), 128.2, 124.5 (d, $J = 2.4$ Hz), 121.3 (d, $J = 14.4$ Hz), 120.6 (d, $J = 13.2$ Hz), 116.0 (d, $J = 22.9$ Hz), 38.4, 20.4

(4-Benzylpiperazin-1-yl)-[3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazol-5-yl]methanone (**103**)



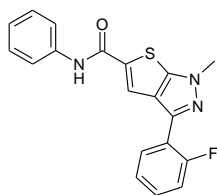
Purified by preparative HPLC
White solid
100 mg – 62%
 $t_R = 4.65$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 435$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.00 (td, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.44 - 7.34 (m, 6H), 7.33 - 7.18 (m, 3H), 4.05 (s, 3H), 3.82 (t, $J = 5.0$ Hz, 4H), 3.58 (s, 2H), 2.54 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 163.1, 159.8 (d, $J = 252.4$ Hz), 146.0, 138.3, 138.1, 134.9 (d, $J = 3.3$ Hz), 129.7 (d, $J = 8.2$ Hz), 129.1, 129.0, 128.3, 127.9, 127.1, 124.6 (d, $J = 3.3$ Hz), 120.6 (d, $J = 16.6$ Hz), 118.8 (d, $J = 11.5$ Hz), 116.0 (d, $J = 24.9$ Hz), 62.7, 53.0, 45.7, 38.5

Partie expérimentale

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-*N*-phenyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**104**)

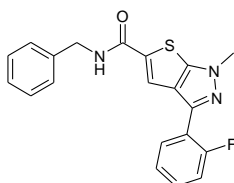


Purified by precipitation in MeCN
White solid
100 mg – 61%
 $t_R = 3.17$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 352$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.02 (td, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.93 (brs, NH), 7.44 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.67 - 7.64 (m, 2H), 7.44 - 7.36 (m, 3H), 7.30 - 7.16 (m, 3H), 4.06 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 160.7, 159.9 (d, $J = 246$ Hz), 146.8, 138.8, 137.8, 137.0 (d, $J = 2.5$ Hz), 129.8 (d, $J = 8.6$ Hz), 129.0, 128.9, 128.1, 124.6 (d, $J = 3.3$ Hz), 124.4, 120.3 (d, $J = 13.3$ Hz), 120.2, 119.6 (d, $J = 13.8$ Hz), 115.7 (d, $J = 22.1$ Hz), 38.5

N-benzyl-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**105**)

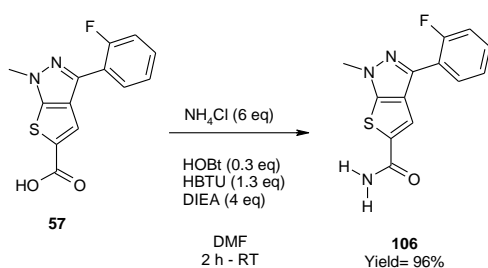


Purified by precipitation in MeCN
White solid
71 mg – 61%
 $t_R = 3.05$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 366$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.00 (td, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.41 - 7.3 (m, 6H), 7.29 - 7.16 (m, 2H), 6.51 (brs, NH), 4.63 (d, $J = 5.82$ Hz, 2H), 4.05 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.4, 159.7 (d, $J = 249.4$ Hz), 146.6, 138.6, 138.4, 136.6 (d, $J = 3.1$ Hz), 129.7 (d, $J = 8.7$ Hz), 129.0 (d, $J = 4.1$ Hz), 128.6, 127.9 (d, $J = 24$ Hz), 127.8, 127.4, 124.5 (d, $J = 3.1$ Hz), 120.4 (d, $J = 13.3$ Hz), 119.0 (d, $J = 13.8$ Hz), 116.0 (d, $J = 22.0$ Hz), 43.9, 38.4

Final product **106**



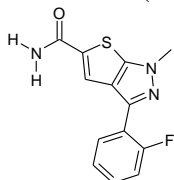
Synthesis of the 3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**106**)

Ammonium chloride (6 eq) was added to a solution of 3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxylic acid **57** (1 eq), HOBt (0.3 eq), HBTU (1.3 eq) and DIEA (4 eq) in DMF on molecular sieves ($C = 0.5$ M). The reaction mixture was stirred at RT for 2 hours. DMF was then

Partie expérimentale

evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated NaHCO_3 aq (3x), HCl aq 1 N (3x) and brine (1x). The organic phase was then dried over MgSO_4 and concentrated to dryness to give 3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxamide (**106**) as an orange oil (53 mg, 96%).

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxamide (**106**)



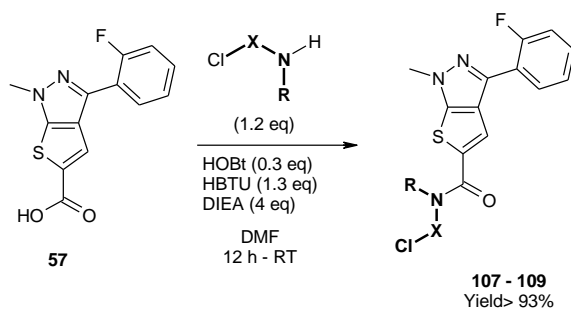
Orange oil
53 mg – 96%
 $t_R = 2.7$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 276$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.13 (s, NH), 7.95 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.90 (td, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.51 - 7.30 (m, 3H + NH), 4.03 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 164.5, 159.6 (d, $J = 236.9$ Hz), 141.3, 138.4, 137.8, 129.7 (d, $J = 8.6$ Hz), 129.1 (d, $J = 3.4$ Hz), 128.3, 124.5 (d, $J = 3.4$ Hz), 120.6 (d, $J = 13.5$ Hz), 118.6, 116.0 (d, $J = 21.7$ Hz), 38.4, 36.6

Synthesis of the final products 110 to 112 and 115

Intermediates 107 to 109

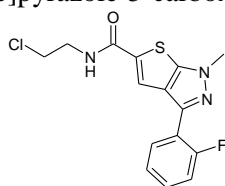


General procedure for the synthesis of the intermediates 107 to 109

The corresponding chlorinated amine (1.2 eq) was added to a solution of 3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid **57** (1 eq), HOBt (0.3 eq), HBTU (1.3 eq) and DIEA (4 eq) in DMF on molecular sieves ($C = 0.5$ M). The reaction mixture was stirred at RT overnight. DMF was then evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated NaHCO_3 aq (3x), HCl aq 1 N (3x) and brine (1x). The organic phase was then dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo* to give the desired (**107** to **109**) product which was used without further purification in the next step.

Partie expérimentale

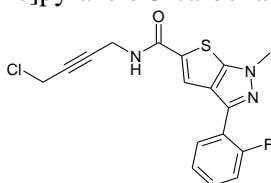
N-(2-chloroethyl)-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**107**)



Brown oil
126 mg – 93%
 $t_R = 3.05$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 338$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.94 (t, $J = 5.9$ Hz, NH), 8.00 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.92 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.51 - 7.30 (m, 3H), 4.03 (s, 3H), 3.73 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.57 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H)

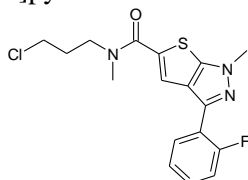
N-(4-chlorobut-2-ynyl)-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**108**)



Yellow oil
267 mg – 99%
 $t_R = 4.72$ min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 461$
Purity (215 nm) 85%

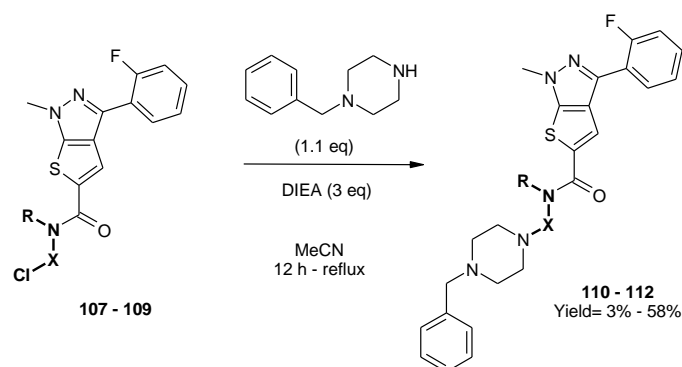
No NMR was carried out due to the purity < 95%. Product will be purified at the final step.

N-(3-chloropropyl)-3-(2-fluorophenyl)-*N*,1-dimethyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**109**)



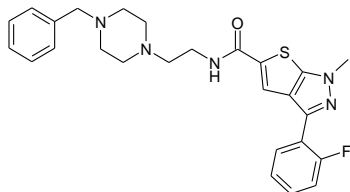
Brown oil
145 mg – 99%
 $t_R = 3.2$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 366$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.01 (td, $J = 7.8$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.44 - 7.36 (m, 1H), 7.31 - 7.19 (m, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.73 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.66 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.31 (brs, 3H), 2.19 (quint, $J = 6.6$ Hz, 2H)

Final products **110** to **112** and **115**General procedure for the synthesis of the final products **110** to **112**

1-Benzylpiperazine (1.1 eq) was added to a solution of the appropriate chlorinated compound (**107** to **109**) (1 eq) in MeCN (C = 0.5 M). The reaction mixture was refluxed for 12 hours. The solution was allowed to come back to RT and MeCN was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ (3x) and brine (1x). The organic phase was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The residue was purified either by preparative HPLC (Waters-2, MeCN/($\text{H}_2\text{O}-\text{HCO}_2^-\text{NH}_4^+$ pH 9.2), 10/90 to 100/0, 30 min) or by precipitation in MeCN to give the desired compound (**110** to **112**).

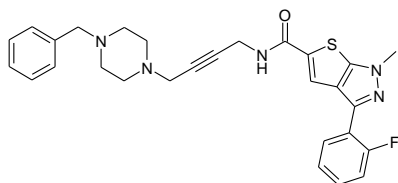
N-[2-(4-benzylpiperazin-1-yl)ethyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**110**)



Purified by preparative HPLC
 Yellow oil
 5 mg – 3%
 $t_R = 3.18 \text{ min}$ (run 5 min)
 MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 478$
 Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.02 (td, $J = 8.1 \text{ Hz}$, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H), 7.6 (d, $J = 3.8 \text{ Hz}$, 1H), 7.46 - 7.22 (m, 8H), 6.9 (brs, NH), 4.05 (s, 3H), 3.54 - 3.49 (m, 4H), 2.64 (t, $J = 5.8 \text{ Hz}$, 2H), 2.64 (brs, 8H)

N-[4-(4-benzylpiperazin-1-yl)but-2-ynyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**111**)



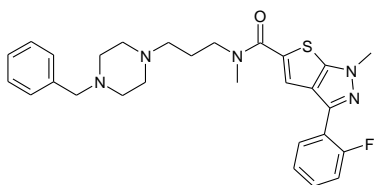
Purified by preparative HPLC
 White solid
 182 mg – 58%
 $t_R = 4.03 \text{ min}$ (run 10 min)
 MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 502$
 Purity (215 nm) 99%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.01 (td, $J = 8.7$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.43 - 7.18 (m, 8H), 7.08 (t, $J = 5$ Hz, NH), 4.28 - 4.25 (m, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.60 (s, 2H), 3.33 (t, $J = 2.0$ Hz, 2H), 2.68 - 2.55 (m, 8H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.2, 159.7 (d, $J = 249$ Hz), 146.6, 138.7, 137.0, 136.2 (d, $J = 3.6$ Hz), 129.7 (d, $J = 8.6$ Hz), 129.4, 129.0 (d, $J = 3.9$ Hz), 128.3, 128.2, 127.4, 124.6 (d, $J = 3.2$ Hz), 120.4 (d, $J = 13.4$ Hz), 119.7 (d, $J = 13.9$ Hz), 116.0 (d, $J = 22$ Hz), 80.8, 78.3, 62.4, 52.5, 51.2, 46.8, 38.5, 29.8

N-[3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl]-3-(2-fluorophenyl)-*N*,1-dimethyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**112**)



Purified by preparative HPLC

White solid

60 mg – 25%

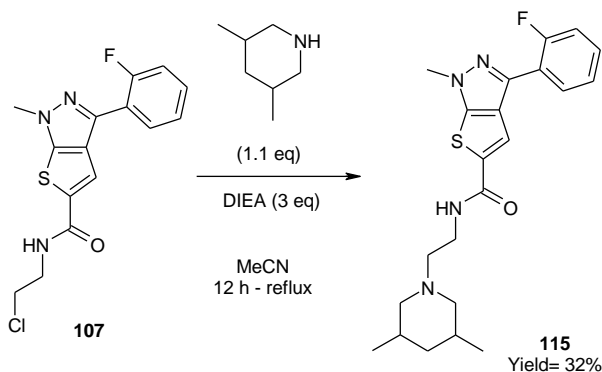
$t_R = 5.78$ min (run 10 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 506$

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.01 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.49 (d $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.44 - 7.19 (m, 8H), 4.06 (s, 3H), 3.63 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.27 (brs, 3H), 2.68 - 2.57 (m, 10H), 1.94 (quint, $J = 7.3$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 164.0, 159.8 (d, $J = 248.4$ Hz), 146.0, 138.5, 137.2, 136.4, 129.7 (d, $J = 8.6$ Hz), 129.3, 129.0 (d, $J = 3.6$ Hz), 128.3, 128.2, 127.3, 124.6 (d, $J = 3.6$ Hz), 120.6 (d, $J = 13.6$ Hz), 119.2 (d, $J = 13.3$ Hz), 116.0 (d, $J = 22.3$ Hz), 62.2, 54.9, 52.3, 51.8, 47.7, 38.5, 25.1, 22.3

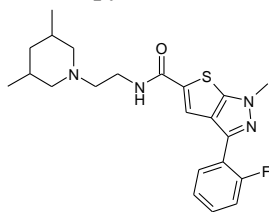


Synthesis of the *N*-[2-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)ethyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**115**)

3,5-Dimethylpiperidine (1.1 eq) was added to a solution of *N*-(2-chloroethyl)-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**107**, 1 eq) in MeCN ($C = 0.5$ M). The reaction mixture was refluxed for 12 hours. The solution was cooled to RT and MeCN was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ (3x) and brine (1x). The organic phase was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The residue was purified by precipitation in MeCN to give *N*-[2-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)ethyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**115**) as a white solid (71 mg, 32%).

Partie expérimentale

N-[2-(3,5-dimethyl-1-piperidyl)ethyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**115**)

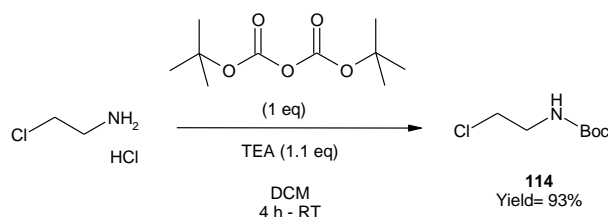


White solid
71 mg – 32%
 $t_R = 3.88$ min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 415$
Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.00 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.58 - 7.55 (m, 1H), 7.44 - 7.37 (m, 1H), 7.31 - 7.18 (m, 2H), 6.89 (brs, NH), 4.05 (s, 3H), 3.53 - 3.47 (m, 2H), 2.9 - 2.85 (m, 2H), 2.56 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 1.80 - 1.50 (m, 5H), 1.04 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 0.89 (d, $J = 6.4$ Hz, 5H), 0.65 - 0.52 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.3, 159.7 (d, $J = 247.6$ Hz), 146.4, 138.5, 137.1 (d, $J = 3.1$ Hz), 129.7 (d, $J = 7.9$ Hz), 129.0 (d, $J = 4.5$ Hz), 128.1, 124.5 (d, $J = 3.4$ Hz), 120.5 (d, $J = 15.8$ Hz), 118.9 (d, $J = 14.7$ Hz), 116.0 (d, $J = 22.5$ Hz), 61.2, 56.4, 42.2, 38.4, 36.7, 31.3, 19.3

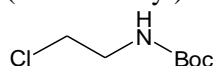
Intermediate **114**



Synthesis of the tert-butyl *N*-(2-chloroethyl)carbamate (**114**)

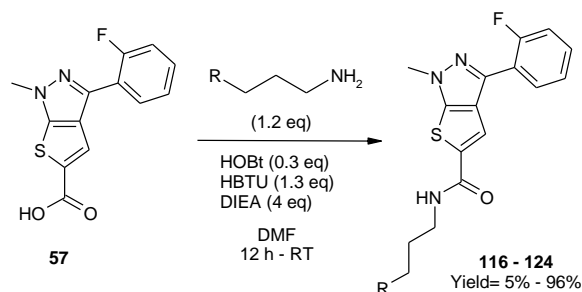
TEA (1.1 eq) was added to a solution of 2-chloroethanaminehydrochloride (1 eq) in DCM ($C = 1$ M). The solution was stirred at RT. Then, a solution of tert-butoxycarbonyl tert-butyl carbonate (1 eq) in DCM ($C = 1$ M) was added and the reaction mixture was stirred at RT for 4 hours. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in EtOAc, washed with HCl_{aq} 1 N (3x) and brine (1x). The organic phase was then dried over MgSO_4 and concentrated to dryness to give tert-butyl *N*-(2-chloroethyl)carbamate (**114**) as a yellow oil (835 mg, 93%) which was used without further purification in the next step.

Tert-butyl *N*-(2-chloroethyl)carbamate (**114**)



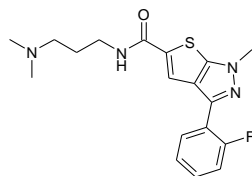
Yellow oil
835 mg – 93%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ (ppm) 7.06 (brs, NH), 3.55 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.21 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.38 (s, 9H)

Synthesis of the final products 116 to 137**Final products 116 to 125****General procedure for the synthesis of the final products 116 to 124**

The corresponding chlorinated amine (1.2 eq) was added to a solution of 3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid **57** (1 eq), HOBt (0.3 eq), HBTU (1.3 eq) and DIEA (4 eq) in DMF on molecular sieves (C = 0.5 M). The reaction mixture was stirred at RT overnight. DMF was then evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated NaHCO_3 aq (3x), HCl_{aq} 1N (3x) and brine (1x). The organic phase was then dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified either by preparative HPLC (Waters-2, MeCN/($\text{H}_2\text{O-HCO}_2\text{-NH}_4^+$ pH 9.2), 10/90 to 100/0, 30 min) or by precipitation in MeCN to give the desired compound (**116 to 124**).

N-[3-(dimethylamino)propyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxamide (**116**)



Purified by preparative HPLC

White solid

127 mg – 80%

$t_R = 4.43$ min (run 10 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 361$

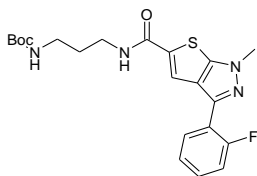
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.40 (brs, NH), 8.02 - 7.97 (m, 2H), 7.42 - 7.34 (m, 1H), 7.28 - 7.19 (m, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.55 - 3.49 (m, 2H), 3.06 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.71 (s, 6H), 2.08 (quint, $J = 7.1$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 163.2, 159.7 (d, $J = 251.4$ Hz), 144.5, 138.8, 137.1, 129.7 (d, $J = 8.9$ Hz), 129.0, 128.4, 124.6, 120.6 (d, $J = 14.3$ Hz), 120.1 (d, $J = 13.9$ Hz), 116.1 (d, $J = 23.7$ Hz), 35.0, 42.7, 36.9, 29.6, 24.3

Partie expérimentale

Tert-butyl *N*-[3-[[3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carbonyl]amino]propyl]carbamate (**117**)



Purified by preparative HPLC

White solid

90 mg – 52%

$t_R = 3.17$ min (run 5 min)

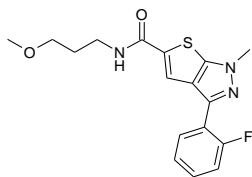
MS $[M+H]^+$ $m/z = 433$

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.00 (td, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.41 - 7.34 (m, 1H), 7.29 - 7.15 (m, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.49 (dt, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.27 (dt $J = 6.1$ Hz, 2H), 1.72 (tt, $J = 6.2$ Hz, 2H), 1.49 (s, 9H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 176.3, 162.5, 159.8 (d, $J = 259.6$ Hz), 149.1, 146.4, 138.6, 129.6 (d, $J = 8.8$ Hz), 129.0 (d, $J = 4.4$ Hz), 128.2, 124.5 (d, $J = 3.3$ Hz), 120.4, 119.0 (d, $J = 14.3$ Hz), 116.0 (d, $J = 21.9$ Hz), 79.6, 38.4, 37.1, 35.8, 30.0, 28.1

3-(2-Fluorophenyl)-*N*-(3-methoxypropyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**118**)



Purified by preparative HPLC

White solid

110 mg – 79%

$t_R = 5.05$ min (run 10 min)

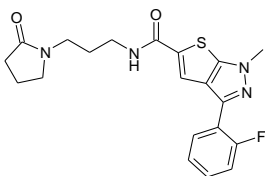
MS $[M+H]^+$ $m/z = 348$

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.02 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.42 - 7.35 (m, 1H), 7.30 - 7.25 (m, 1H), 7.25 - 7.18 (m, 1H), 7.0 (brs, NH), 4.04 (s, 3H), 3.59 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.55 (q, $J = 6.3$ Hz, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.43 (s, 3H), 1.90 (quint, $J = 6.3$ Hz, $J = 5.7$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.2, 159.9 (d, $J = 248.3$ Hz), 146.4, 138.5, 137.2 (d, $J = 3.5$ Hz), 129.7 (d, $J = 8.7$ Hz), 129.0 (d, $J = 4.5$ Hz), 128.1, 124.6 (d, $J = 3.6$ Hz), 120.5 (d, $J = 12.6$ Hz), 118.6 (d, $J = 15.2$ Hz), 116.0 (d, $J = 22$ Hz), 72.1, 58.7, 39.1, 38.5, 29.0

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-*N*-[3-(2-oxopyrrolidin-1-yl)propyl]thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**119**)



Purified by preparative HPLC

White solid

193 mg – 96%

$t_R = 3.82$ min (run 10 min)

MS $[M+H]^+$ $m/z = 401$

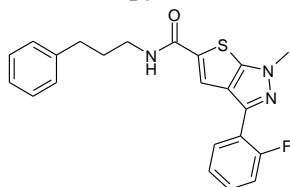
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.00 (td, $J = 8.1$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.78 (brs, NH), 7.76 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.43 - 7.35 (m, 1H), 7.29 - 7.20 (m, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.45 - 3.34 (m, 6H), 2.45 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 2.13 - 2.02 (m, 2H), 1.81 - 1.73 (m, 2H)

Partie expérimentale

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 176.2, 162.3, 159.6 (d, $J = 245.8$ Hz), 146.5, 138.6, 137.5 (d, $J = 3.1$ Hz), 129.6 (d, $J = 8.1$ Hz), 129.0 (d, $J = 4.5$ Hz), 128.2, 124.5 (d, $J = 3.6$ Hz), 120.5 (d, $J = 13.5$ Hz), 119.2 (d, $J = 13.5$ Hz), 116.0 (d, $J = 21.6$ Hz), 47.4, 39.5, 38.4, 35.6, 30.9, 26.3, 18.0

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-*N*-(3-phenylpropyl)thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**120**)

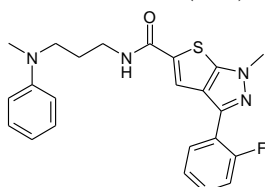


Purified by precipitation in MeCN
White solid
114 mg – 58%
 $t_{\text{R}} = 5.28$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 394$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.00 (td, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.41 - 7.36 (m, 1H), 7.34 - 7.17 (m, 7H), 6.11 (brs, NH), 4.04 (s, 3H), 3.48 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.75 (t, $J = 7.38$ Hz, 2H), 1.97 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.4, 159.8 (d, $J = 247.7$ Hz), 146.5, 141.7, 138.5, 137.0 (d, $J = 3.2$ Hz), 129.7 (d, $J = 8.3$ Hz), 129.0 (d, $J = 3.7$ Hz), 128.4, 128.3, 128.1, 126.0, 124.5 (d, $J = 2.8$ Hz), 120.4 (d, $J = 12.9$ Hz), 118.7 (d, $J = 13.7$ Hz), 115.9 (d, $J = 22.1$ Hz), 39.8, 38.4, 33.4, 31.2

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-*N*-[3-(*N*-methylanilino)propyl]thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**121**)



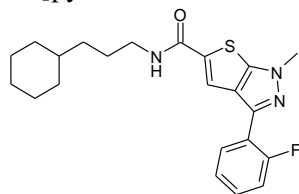
Purified by preparative HPLC
White solid
191 mg – 90%
 $t_{\text{R}} = 5.25$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 423$
Purity (215 nm) 100%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.99 (td, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.44 - 7.36 (m, 1H), 7.30 - 7.19 (m, 4H), 6.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.40 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.46 (brs, NH), 4.04 (s, 3H), 3.55 - 3.45 (m, 4H), 2.97 (s, 3H), 1.98 - 1.89 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.7, 159.7 (d, $J = 248.7$ Hz), 149.1, 146.5, 138.6, 136.8 (d, $J = 2.3$ Hz), 129.7 (d, $J = 8.4$ Hz), 129.3, 129.0 (d, $J = 4$ Hz), 128.1, 124.5 (d, $J = 3.1$ Hz), 120.4 (d, $J = 13.6$ Hz), 119.0 (d, $J = 13.6$ Hz), 117.2, 116.0 (d, $J = 22.4$ Hz), 113.1, 51.0, 38.7, 38.4, 38.3, 26.7

Partie expérimentale

N-(3-cyclohexylpropyl)-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**122**)

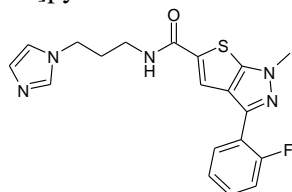


Purified by precipitation in MeCN
 White solid
 59 mg – 49%
 $t_R = 7.0$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 400$
 Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.01 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.42 – 7.36 (m, 1H), 7.30 – 7.25 (m, 1H), 7.24 – 7.18 (m, 1H), 6.28 (brs, NH), 4.04 (s, 3H), 3.41 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.77 – 1.60 (m, 8H), 1.30 – 1.78 (m, 5H), 0.98 – 0.87 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.3, 159.8 (d, $J = 244.1$ Hz), 146.4, 138.5, 137.3 (d, $J = 3.1$ Hz), 139.7 (d, $J = 8.4$ Hz), 129.0 (d, $J = 4.1$ Hz), 128.1, 124.5 (d, $J = 3.1$ Hz), 120.5 (d, $J = 13.4$ Hz), 118.5 (d, $J = 14.0$ Hz), 116.0 (d, $J = 21.7$ Hz), 40.5, 38.5, 37.4, 34.7, 33.3, 27.3, 26.6, 26.4

3-(2-Fluorophenyl)-*N*-(3-imidazol-1-ylpropyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**123**)

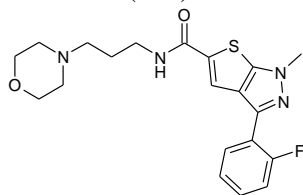


Purified by preparative HPLC
 White solid
 64 mg – 42%
 $t_R = 4.6$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 384$
 Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 8.72 (t, $J = 5.6$ Hz, NH), 7.96 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 7.92 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.66 (t, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.51 – 7.44 (m, 1H), 7.43 – 7.36 (m, 1H), 7.36 – 7.30 (m, 1H), 7.22 (t, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.90 (t, $J = 1.4$ Hz, 1H), 4.04 (s, 3H), 4.03 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.22 (dd, $J = 5.6$ Hz, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.97 (quint, $J = 6.8$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.4, 159.6 (d, $J = 248.4$ Hz), 146.3, 138.4 (d, $J = 5.6$ Hz), 138.1, 137.8, 130.7 (d, $J = 8.4$ Hz), 129.4 (d, $J = 4.7$ Hz), 128.9, 128.3, 125.4 (d, $J = 3.4$ Hz), 120.4 (d, $J = 14.1$ Hz), 119.8, 119.5 (d, $J = 13.1$ Hz), 116.7 (d, $J = 22.5$ Hz), 44.2, 38.9, 37.1, 31.2

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-*N*-(3-morpholinopropyl)thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**124**)



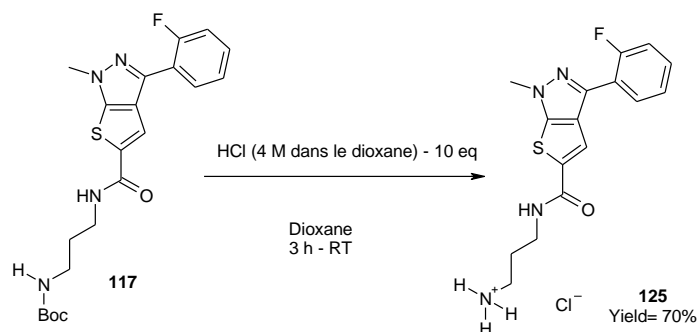
Purified by preparative HPLC
 White solid
 8 mg – 5%
 $t_R = 4.67$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 403$
 Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.01 (td + brs, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H + NH), 7.77 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.44 – 7.37 (m, 1H), 7.31 – 7.27 (m, 1H), 7.26 – 7.20 (m, 1H), 4.06 (s, 3H), 3.84 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H),

Partie expérimentale

3.55 (q, $J = 5.2$ Hz, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.75 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.73 - 2.69 (m, 4H), 1.92 (quint, $J = 6.5$ Hz, 2H)

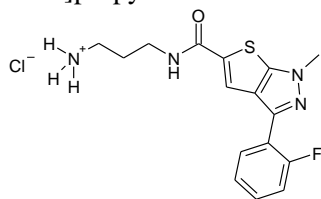
^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.6, 159.8 (d, $J = 247.9$ Hz), 146.5, 138.6, 137.5 (d, $J = 3.1$ Hz), 129.8 (d, $J = 8.7$ Hz), 129.1 (d, $J = 4$ Hz), 128.2, 124.6 (d, $J = 3.4$ Hz), 120.6 (d, $J = 12$ Hz), 119.0 (d, $J = 17$ Hz), 116.1 (d, $J = 22$ Hz), 65.9, 57.4, 53.3, 39.0, 38.5, 23.7



3-[[3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carbonyl]amino]propylammonium chloride (125)

At RT, tert-butyl-*N*-[3-[[3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carbonyl]amino]propyl]carbamate (**117**) was dissolved in dioxane (2 mL). A solution of HCl 4 M in dioxane (10 eq) was slowly added. The reaction mixture was stirred at RT for 3 hours. The solid was filtered off and washed with petroleum ether to afford 3-[[3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carbonyl]amino]propylammonium chloride (**125**) as a white solid (44 mg, 70%).

3-[[3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carbonyl]amino]propylammonium chloride (**125**)



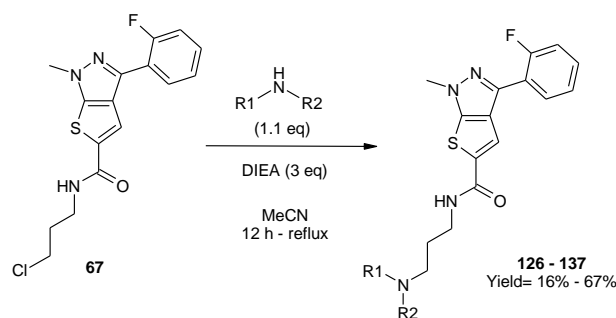
White solid
44 mg – 70%
 $t_R = 4.02$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 333$
Purity (215 nm) 98%

^1H -NMR (DMSO-d_6): δ (ppm) 8.91 (t, $J = 5.4$ Hz, NH), 8.01 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 7.91 (td, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.50 - 7.29 (m, 3H), 4.03 (s, 3H), 3.32 (dt, $J = 6.0$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 2H), 2.83 (dt, $J = 6.0$ Hz = 6.0 Hz, $J = 4.1$ Hz, 2H), 1.82 (tt, $J = 6.5$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 2H)

^{13}C -NMR (DMSO-d_6): δ (ppm) 162.6, 159.5 (d, $J = 247.7$ Hz), 146.2, 138.2 (d, $J = 2.3$ Hz), 138.1, 130.6 (d, $J = 7.9$ Hz), 129.4 (d, $J = 4.5$ Hz), 128.3, 125.3 (d, $J = 3.4$ Hz), 120.4 (d, $J = 13.6$ Hz), 119.8 (d, $J = 11.3$ Hz), 116.6 (d, $J = 21.5$ Hz), 38.9, 37.2, 36.8, 27.8

Partie expérimentale

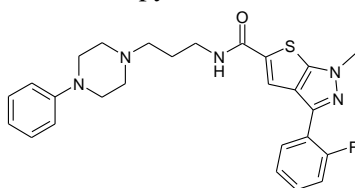
Final products **126** to **137**



General procedure for the synthesis of the final products **126** to **137**

The appropriate amine (1.1 eq) was added to a solution of *N*-(3-chloropropyl)-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**67**) (1 eq) in MeCN (*C* = 0.5 M). The reaction mixture was refluxed for 12 hours. It was allowed to come back to RT and MeCN was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, washed with saturated $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ (3x) and brine (1x). The organic phase was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The residue was purified either by preparative HPLC (Waters-2, MeCN/ $(\text{H}_2\text{O}-\text{HCO}_2^-\text{NH}_4^+ \text{pH } 9.2)$, 10/90 to 100/0, 30 min) or by precipitation in MeCN to give the desired compound (**126** to **137**).

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-*N*-[3-(4-phenylpiperazin-1-yl)propyl]thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**126**)



Purified by preparative HPLC

White solid

31 mg – 16%

t_R = 6.02 min (run 10 min)

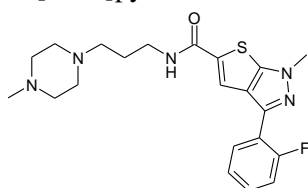
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 478

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.28 (brs, NH), 7.97 - 7.91 (m, 1H), 7.58 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.27 - 7.21 (m, 2H), 7.20 - 7.12 (m, 2H), 6.92 - 6.84 (m, 3H), 6.50 - 6.43 (m, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.59 (q, J = 5.6 Hz, 2H), 3.32 (t, J = 4.9 Hz, 4H), 2.72 (t, J = 5.0 Hz, 4H), 2.66 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 1.89 (quint, J = 5.8 Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.2, 159.5 (d, J = 247.5 Hz), 151.3, 146.4, 137.4, 137.8 (d, J = 3.9 Hz), 129.6 (d, J = 8.3 Hz), 129.1, 128.6 (d, J = 4.8 Hz), 128.0, 124.3 (d, J = 3.3 Hz), 120.2 (d, J = 13.3 Hz), 119.2, 118.4 (d, J = 14.4 Hz), 116.0 (d, J = 21.6 Hz), 115.6, 59.1, 53.8, 48.8, 41.5, 38.4, 24.0

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-*N*-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl]thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**127**)



Purified by preparative HPLC

White solid

135 mg – 57%

t_R = 4.39 min (run 10 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = 416

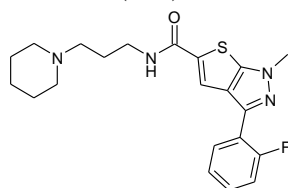
Purity (215 nm) 100%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.21 (t, $J = 6.3$ Hz, NH), 7.98 (td, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.8 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.38 - 7.30 (m, 1H), 7.26 - 7.21 (m, 1H), 7.20 - 7.13 (m, 1H), 4.0 (s, 3H), 3.46 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.79 - 2.65 (m, 8H), 2.66 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.84 (quint, $J = 6.8$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.8, 159.7 (d, $J = 245.3$ Hz), 146.5, 138.5, 137.7 (d, $J = 3$ Hz), 129.7 (d, $J = 7.8$ Hz), 129.0 (d, $J = 4.5$ Hz), 128.3, 124.7 (d, $J = 3$ Hz), 120.5 (d, $J = 13.5$ Hz), 119.3 (d, $J = 12.6$ Hz), 116.0 (d, $J = 22$ Hz), 55.9, 53.1, 51.2, 44.1, 38.9, 38.5, 24.9

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-*N*-[3-(1-piperidyl)propyl]thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide
(128)

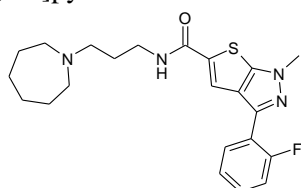


Purified by preparative HPLC
White solid
143 mg - 67%
 $t_R = 4.84$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 401$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.72 (brs, NH), 8.08 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.98 (td, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.40 - 7.32 (m, 1H), 7.28 - 7.23 (m, 1H), 7.22 - 7.16 (m, 1H), 4.0 (s, 3H), 3.49 (brs, 2H), 3.04 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.98 (brs, 4H), 2.09 (quint, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.85 (quint, $J = 5.6$ Hz, 4H), 1.59 (brs, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 163.3, 159.7 (d, $J = 259$ Hz), 146.5, 138.7, 137.4 (d, $J = 3.2$ Hz), 129.7 (d, $J = 8.1$ Hz), 129.1 (d, $J = 4$ Hz), 128.5, 124.5 (d, $J = 3.7$ Hz), 120.5 (d, $J = 14.6$ Hz), 120.2 (d, $J = 12.8$ Hz), 116.1 (d, $J = 22$ Hz), 54.2, 52.9, 38.4, 37.2, 23.5, 22.8, 22.3

N-[3-(azepan-1-yl)propyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (129)



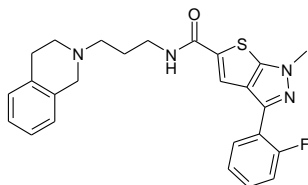
Purified by preparative HPLC
White solid
110 mg - 37%
 $t_R = 3.52$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 415$
Purity (215 nm) 95%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.71 (bs, NH), 8.03 - 7.98 (m, 2H), 7.43 - 7.35 (m, 1H), 7.29 - 7.19 (m, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.52 (brs, 2H), 3.07 - 2.99 (m, 6H), 2.06 - 1.99 (2H), 1.85 (brs, 4H), 1.70 (brs, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 163.1, 159.7 (d, $J = 249.1$ Hz), 146.5, 138.7, 137.5 (d, $J = 3.2$ Hz), 129.6 (d, $J = 7.1$ Hz), 129.0 (d, $J = 4.3$ Hz), 128.4, 124.5 (d, $J = 3.5$ Hz), 120.5 (d, $J = 13.3$ Hz), 119.8 (d, $J = 13.3$ Hz), 116.1 (d, $J = 22$ Hz), 54.6, 54.3, 38.4, 38.0, 27.0, 24.2, 24.1

Partie expérimentale

N-[3-(3,4-dihydro-1*H*-isoquinolin-2-yl)propyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**130**)

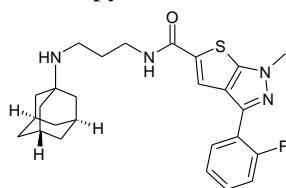


Purified by preparative HPLC
 White solid
 84 mg – 26%
 $t_R = 3.92$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 449$
 Purity (215 nm) 95%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.36 (brs, NH), 7.91 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.42 - 7.35 (m, 1H), 7.28 - 7.14 (m, 2H), 7.0 - 6.99 (m, 4H), 3.92 (s, 3H), 3.79 (s, 2H), 3.03 - 2.99 (m, 2H), 2.94 - 2.89 (m, 2H), 2.84 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.70 (brs, 2H), 1.95 (quint, $J = 5.9$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.3, 159.8 (d, $J = 248.8$ Hz), 146.1, 138.5, 136.8 (d, $J = 3$ Hz), 133.7 (d, $J = 15.4$ Hz), 129.6 (d, $J = 8.8$ Hz), 129.0 (d, $J = 3.3$ Hz), 128.5, 126.4 (d, $J = 6.6$ Hz), 125.7, 124.4 (d, $J = 3.3$ Hz), 120.5 (d, $J = 13.6$ Hz), 119.3 (d, $J = 13.6$ Hz), 116.1 (d, $J = 21.7$ Hz), 57.4, 55.5, 51.0, 40.4, 38.3, 28.6, 24.5

N-[3-(1-adamantylamino)propyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**131**)

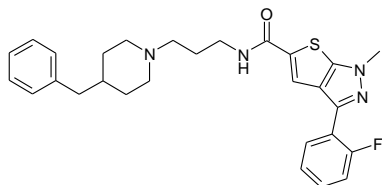


Purified by preparative HPLC
 White solid
 95 mg – 35%
 $t_R = 4.37$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 467$
 Purity (215 nm) 95%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.99 (brs, NH), 7.97 (td, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.42 - 7.34 (m, 1H), 7.29 - 7.14 (m, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.55 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.90 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.09 - 2.094 (m, 3H), 1.80 - 1.60 (m, 14H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.1, 159.7 (d, $J = 248$ Hz), 146.4, 138.5, 138.2 (d, $J = 2.7$ Hz), 129.6 (d, $J = 8.5$ Hz), 129.1 (d, $J = 4.1$ Hz), 128.3, 124.5 (d, $J = 3.6$ Hz), 120.6 (d, $J = 13.7$ Hz), 118.2 (d, $J = 12.6$ Hz), 115.8 (d, $J = 22$ Hz), 51.4, 42.2, 41.1, 40.1, 38.4, 36.5, 29.6, 28.2

N-[3-(4-benzyl-1-piperidyl)propyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**132**)



Purified by preparative HPLC
 Yellow solid
 94 mg – 37%
 $t_R = 6.1$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 491$
 Purity (215 nm) 97%

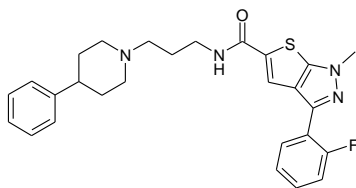
$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.56 (brs, NH), 8.03 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.42 - 7.35 (m, 1H), 7.3 - 7.21 (m, 4H), 7.2 - 7.16 (m, 1H), 7.06 - 7.03 (m, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.54

Partie expérimentale

(brs, 2H), 3.15 (brs, 2H), 2.69 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.43 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.11 - 2.04 (m, 2H), 1.87 (quint, $J = 6.1$ Hz, 2H), 1.73 - 1.66 (m, 2H), 1.64 - 1.51 (m 1H), 1.5 - 1.35 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.6, 159.9 (d, $J = 250$ Hz), 146.4, 140.4, 138.5, 137.9 (d, $J = 3$ Hz), 129.7 (d, $J = 9$ Hz), 129.1 (d, $J = 5$ Hz), 128.9, 128.3, 128.1, 125.8, 124.6 (d, $J = 3$ Hz), 120.7 (d, $J = 15$ Hz), 118.9 (d, $J = 14$ Hz), 116.1 (d, $J = 22$ Hz), 57.5, 53.6, 42.6, 40.0, 38.4, 37.6, 31.2, 24.1

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-*N*-[3-(4-phenyl-1-piperidyl)propyl]thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide
(133)



Purified by preparative HPLC

White solid

98 mg – 42%

$t_R = 4.47$ min (run 10 min)

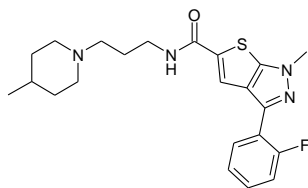
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 477$

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.51 (brs, NH), 8.09 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 8.02 (td, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.42 - 7.17 (m, 8H), 4.04 (s, 3H), 3.60 - 3.56 (m, 4H), 3.10 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.78 - 2.64 (m, 3H), 2.28 - 2.12 (m, 4H), 2.03 - 1.98 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 163.2, 159.8 (d, $J = 247.8$ Hz), 146.5, 143.9, 138.7, 137.3 (d, $J = 3.4$ Hz), 129.6 (d, $J = 9.3$ Hz), 129.0 (d, $J = 5.1$ Hz), 128.6, 128.5, 126.8, 126.7, 124.4 (d, $J = 3.4$ Hz), 120.5 (d, $J = 13.4$ Hz), 120.2 (d, $J = 12.7$ Hz), 116.1 (d, $J = 23.5$ Hz), 54.5, 53.0, 40.7, 38.4, 37.3, 30.2, 23.7

3-(2-Fluorophenyl)-1-methyl-*N*-[3-(4-methyl-1-piperidyl)propyl]thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide
(134)



Purified by precipitation in MeCN

White solid

35 mg – 17%

$t_R = 4.3$ min (run 10 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 415$

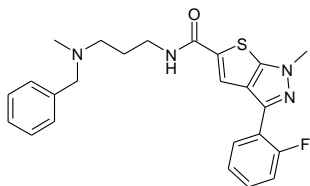
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.58 (brs, NH), 7.99 (td, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.42 - 7.35 (m, 1H), 7.30 - 7.24 (m, 1H), 7.23 - 7.17 (m, 1H), 4.05 (s, 3H), 3.46 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.04 - 3.0 (m, 2H), 2.55 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 1.97 - 1.89 (m, 2H), 1.82 - 1.74 (m, 2H), 1.68 - 1.63 (m, 2H), 1.43 - 1.21 (m, 3H), 0.77 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 162.2, 159.9 (d, $J = 248.2$ Hz), 146.4, 138.5, 138.1 (d, $J = 2.9$ Hz), 129.6 (d, $J = 8.1$ Hz), 129.1 (d, $J = 4.1$ Hz), 128.1, 124.6 (d, $J = 3.5$ Hz), 120.7 (d, $J = 13.4$ Hz), 118.3 (d, $J = 13.4$ Hz), 116.1 (d, $J = 22$ Hz), 59.4, 54.5, 41.6, 38.5, 34.5, 30.9, 24.2, 21.4

Partie expérimentale

N-[3-[benzyl(methyl)amino]propyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**135**)



Purified by preparative HPLC

White solid

156 mg – 49%

t_R = 3.83 min (run 10 min)

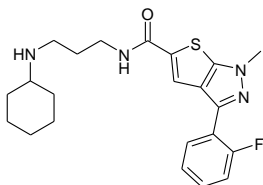
MS [M+H]⁺ m/z = 437

Purity (215 nm) 97%

¹H-NMR (CD₂Cl₂): δ (ppm) 8.29 (brs, NH), 8.00 (td, J = 7.6 Hz, J = 1.8 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.42 - 7.35 (m, 3H), 7.34 - 7.16 (m, 5H), 4.04 (s, 3H), 3.92 (s, 2H), 3.55 - 3.48 (m, 2H), 2.92 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.08 - 1.99 (m, 2H)

¹³C-NMR (CD₂Cl₂): δ (ppm) 162.9, 160.0 (d, J = 249.5 Hz), 146.5, 138.7, 137.1 (d, J = 2.9 Hz), 132.4, 130.5, 129.6 (d, J = 8.5 Hz), 129.0 (d, J = 3.8 Hz), 128.8 (d, J = 3 Hz), 128.7, 128.3, 124.5 (d, J = 3.2 Hz), 120.5 (d, J = 13.2 Hz), 119.7 (d, J = 13.2 Hz), 116.1 (d, J = 21.9 Hz), 60.7, 54.0, 39.8, 38.4, 38.2, 24.3

N-[3-(cyclohexylamino)propyl]-3-(2-fluorophenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**136**)



Purified by preparative HPLC

White solid

70 mg – 23%

t_R = 3.87 min (run 10 min)

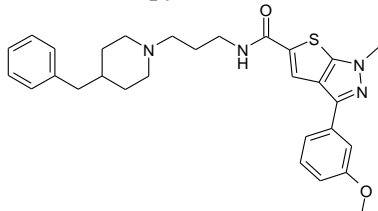
MS [M+H]⁺ m/z = 415

Purity (215 nm) 97%

¹H-NMR (CD₂Cl₂): δ (ppm) 8.81 (brs, NH), 8.67, 8.00 - 7.93 (m, 1H), 7.90 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.42 - 7.29 (m, 1H), 7.27 - 7.11 (m, 2H), 4.37 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.58 - 3.49 (m, 2H), 2.85 - 2.74 (m, 1H), 2.11 - 1.99 (m, 4H), 1.80 - 1.80 74 (m, 2H), 1.63 - 1.58 (m, 1H), 1.45 - 1.09 (5H)

¹³C-NMR (CD₂Cl₂): δ (ppm) 163.3, 158.0 (d, J = 250 Hz), 146.48, 138.2, 136.0, 129.4, 128.9, 128.1, 124.4, 120.4, 118.7, 115.8 (d, J = 22 Hz), 57.0, 42.6, 38.4, 37.6, 30.1, 26.4, 25.2, 24.6

N-[3-(4-benzyl-1-piperidyl)propyl]-3-(3-methoxyphenyl)-1-methyl-thieno[2,3-*c*]pyrazole-5-carboxamide (**137**)



Purified by preparative HPLC

White solid

110 mg – 44%

t_R = 4.93 min (run 10 min)

MS [M+H]⁺ m/z = 503

Purity (215 nm) 99%

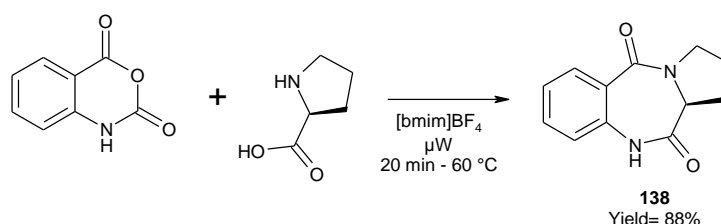
¹H-NMR (CD₂Cl₂): δ (ppm) 8.51 (brs, NH), 8.36 (s, 1H), 7.58 (dt, J = 7.7 Hz, J = 0.8 Hz, 1H), 7.55 - 7.53 (m, 1H), 7.40 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.35 - 7.29 (m, 2H), 7.26 - 7.22 (m, 1H), 7.19 - 7.16 (m, 2H),

6.93 (td, $J = 8.1$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.52 - 3.48 (m, 4H), 3.10 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.63 - 2.56 (m, 4H), 2.17 - 2.09 (m, 2H), 1.85 - 1.69 (m, 5H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 163.3, 160.1, 147.0, 143.5, 139.4, 137.6, 134.2, 129.8, 129.0, 128.4, 127.3, 126.3, 119.3, 118.4, 114.0, 111.1, 55.4, 53.7, 52.6, 41.9, 38.3, 36.9, 36.2, 28.6, 23.5

III. Chapter II: synthesis of compounds 138 to 196

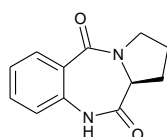
Synthesis of the final products 138 to 142



Synthesis of the (6aS)-6a,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-6,11-dione (**138**)

A solution of isatoic anhydride (1 mmol, 1 eq) and L-proline (1 mmol, 1 eq) in $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ (2 mL) was heated under microwave irradiation for 20 minutes at 60 °C. The reaction mixture was allowed to come back to RT and water was added. The solid formed was filtered off and washed with water to give (6aS)-6a,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-6,11-dione (**138**) as a white solid (190 mg, 88%).

(6aS)-6a,7,8,9-Tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-6,11-dione (**138**)

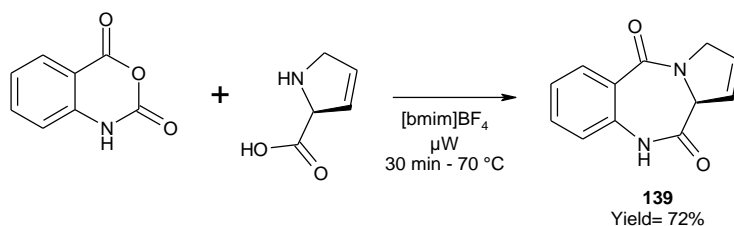


White solid
190 mg – 88%
 $t_R = 2.04$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 217$
Purity (215 nm) 99%

^1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.80 (brs, NH), 7.98 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.52 (ddd, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.29 (ddd, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 4.12 - 4.08 (m, 1H), 3.81 - 3.73 (m, 1H), 3.63 - 3.54 (m, 1H), 2.78 - 2.68 (m, 1H), 2.13 - 1.96 (m, 3H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 171.3, 165.1, 135.5, 132.3, 130.9, 127.2, 124.7, 121.1, 56.6, 47.2, 26.2, 23.5

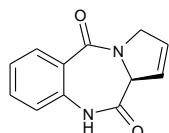
Partie expérimentale



Synthesis of the (6aS)-6a,9-dihydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-6,11-dione (**139**)

A solution of isatoic anhydride (0.5 mmol, 1 eq) and (2S)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (0.5 mmol, 1 eq) in [bmim]BF₄ (1 mL) was heated under microwave irradiation for 30 minutes at 70 °C. The reaction mixture was cooled to RT and water was added. The resulting solution was extracted with EtOAc (3x). The combined organic layers were washed with brine (1x) dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc 5/5) to give (6aS)-6a,9-dihydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-6,11-dione (**139**) as a white solid (77 mg, 72%).

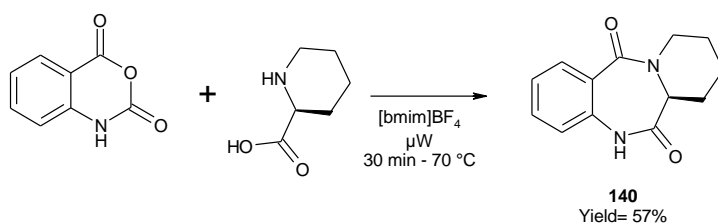
(6aS)-6a,9-Dihydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-6,11-dione (**139**)



White solid
77 mg – 72%
 $t_R = 2.1$ min (run 5 min)
MS [M+H]⁺ $m/z = 214$
Purity (215 nm) 96%

¹H-NMR (CD₂Cl₂): δ (ppm) 8.13 (brs, 1H), 8,01 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.55 (ddd, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.32 (ddd, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.07 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 6.21 - 6.17 (m, 1H), 6.05 - 6.00 (m, 1H), 4.93 - 4.89 (m, 1H), 4.62 - 4.55 (m, 1H), 4.42 - 4.33 (m, 1H)

¹³C-NMR (CD₂Cl₂): δ (ppm) 170.9, 164.7, 135.4, 132.5, 131.1, 128.1, 126.3, 125.0, 124.1, 121.0, 63.5, 54.1

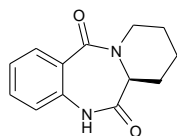


Synthesis of the (6aS)-5,6a,7,8,9,10-hexahydropyrido[2,1-c][1,4]benzodiazepine-6,12-dione (**140**)

A solution of isatoic anhydride (0.2 mmol, 1 eq) and (2S)-piperidine-2-carboxylic acid (0.2 mmol, 1 eq) in [bmim]BF₄ (1 mL) was heated under microwave irradiation for 30 minutes at 70 °C. The reaction mixture was cooled to RT and water was added. The resulting solution was extracted with EtOAc (3x). The combined organic layers were washed with brine (1x) dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (DCM to DCM/EtOAc 7/3) to give (6aS)-5,6a,7,8,9,10-hexahydropyrido[2,1-c][1,4]benzodiazepine-6,12-dione (**140**) as a white solid (46 mg, 57%).

Partie expérimentale

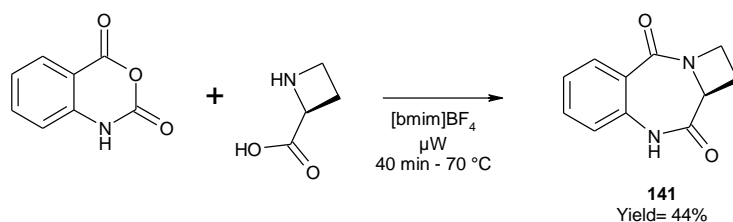
(6a*S*)-5,6a,7,8,9,10-Hexahydropyrido[2,1-*c*][1,4]benzodiazepine-6,12-dione (**140**)



White solid
46 mg – 57%
 $t_R = 3.17$ min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 231$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.43 (brs, NH), 7.89 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.49 (ddd, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.28 (ddd, $J = 7.8$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.02 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1H), 4.54 - 4.47 (m, 1H), 4.20 - 4.17 (m, 1H), 3.04 - 2.93 (m, 1H), 2.29 - 2.20 (m, 1H), 2.04 - 1.53 (m, 5H)

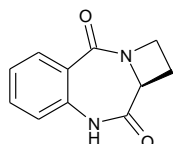
$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 171.7, 168.2, 135.9, 131.9, 131.0, 127.8, 124.8, 120.3, 51.1, 40.1, 23.3, 22.7, 19.2



Synthesis of the (6a*S*)-6a,7,8-azetidin[2,1-*c*][1,4]benzodiazepine-6,10-dione (**141**)

A solution of isatoic anhydride (0.5 mmol, 1 eq) and (2*S*)-2-(ethylamino)propanoic acid (0.5 mmol, 1 eq) in $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ (1 mL) was heated under microwave irradiation for 40 minutes at 70 °C. The reaction mixture was cooled to RT and water was added. The resulting solution was extracted with EtOAc (3x). The combined organic layers were washed with brine (1x) dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (DCM to DCM/EtOAc 6/4) to give (6a*S*)-6a,7,8-azetidin[2,1-*c*][1,4]benzodiazepine-6,10-dione (**141**) as a white solid (44 mg, 44%).

(6a*S*)-6a,7,8-Azetidin[2,1-*c*][1,4]benzodiazepine-6,10-dione (**141**)

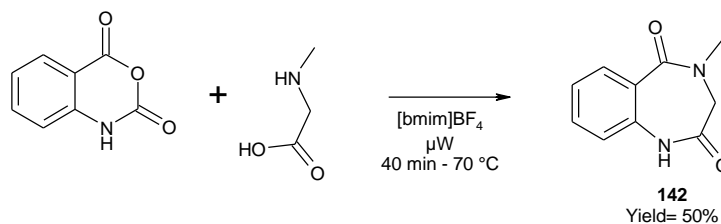


White solid
44 mg – 44%
 $t_R = 2.07$ min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 203$
Purity (215 nm) 96%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.02 (brs, NH), 8.0 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.53 (ddd, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.30 (ddd, $J = 7.8$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.04 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 4.76 - 4.71 (m, 1H), 4.24 - 4.11 (m, 2H), 2.94 - 2.83 (m, 1H), 2.65 - 2.53 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 172.2, 165.3, 135.6, 132.7, 130.7, 124.9, 124.6, 121.5, 59.2, 46.6, 18.5

Partie expérimentale

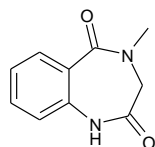


Synthesis of the 4-methyl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepine-2,5-dione (**142**)

A solution of isatoic anhydride (0.5 mmol, 1 eq) and (2S)-2-(ethylamino)propanoic acid (0.5 mmol, 1 eq) in [bmim]BF₄ (1 mL) was heated under microwave irradiation for 40 minutes at 70 °C. The reaction mixture was allowed to come back to RT and water was added. The solid formed was filtered off and washed with water to give 4-methyl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepine-2,5-dione (**142**) as a white solid (48 mg, 50%).

4-Methyl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepine-2,5-dione

(142)

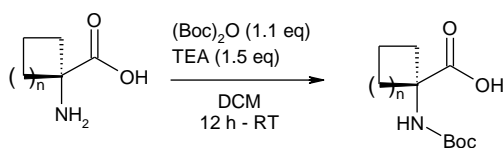


White solid
48 mg – 50%
 $t_R = 2.23$ min (run 5 min)
MS [M+H]⁺ $m/z = 191$
Purity (215 nm) 98%

¹H-NMR (CD₂Cl₂): δ (ppm) 8.13 (brs, NH), 7.93 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.50 (td, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.29 (td, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.89 (s, 2H), 2.36 (s, 3H)

¹³C-NMR (CD₂Cl₂): δ (ppm) 170.3, 167.0, 137.4, 132.4, 131.3, 126.6, 124.4, 121.2, 52.6, 36.3

*Synthesis of intermediates **145** to **150***



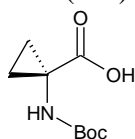
145 - $n = 0$ - Yield= 80%
146 - $n = 2$ - Yield= 76%

General procedure for the synthesis of the intermediates **145** and **146**

TEA (1.5 eq) was added to a solution of the appropriate α -amino acid (1-aminocyclopropanecarboxylic acid or 1-aminocyclopentanecarboxylic acid) (1 eq) in DCM (C = 0.5 M). The reaction mixture was stirred at RT and a solution of tert-butoxycarbonyl tert-butyl carbonate (1.1 eq) in DCM (C = 1 M) was added. The solution was stirred at RT for 12 hours. It was then concentrated *in vacuo* and the residue was dissolved in EtOAc, washed with HCl_{aq} 1N (3x) and brine (1x). The organic phase was then dried over MgSO₄ and concentrated to dryness to give the appropriate compound (**145** and **146**) which was used without further purification in the next step.

Partie expérimentale

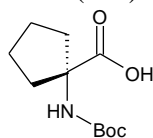
1-(Tert-butoxycarbonylamino)cyclopropane carboxylic acid (**145**)



White solid
202 mg – 80%

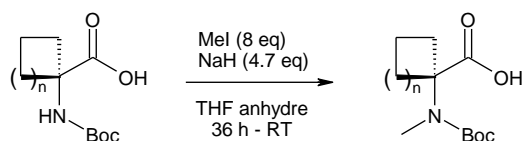
$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 4.7 (brs, NH), 1.35 - 1.27 (m, 2H), 1.28 (s, 9H), 1.25 - 1.19 (m, 2H)

1-(Tert-butoxycarbonylamino)cyclopentane carboxylic acid (**146**)



White solid
445 mg – 76%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 4.92 (brs, NH), 2.23 - 2.13 (m, 2H), 1.93 - 1.74 (m, 6H), 1.43 (s, 9H)



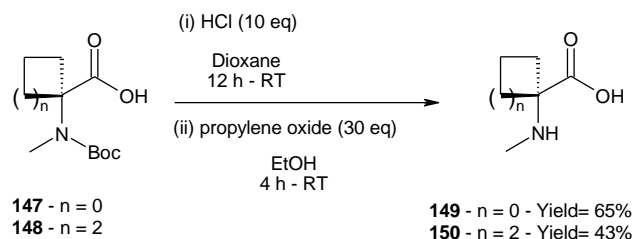
145 - n = 0
146 - n = 2

147 - n = 0 - Yield= 70%
148 - n = 2 - Yield= 67%

General procedure for the synthesis of the intermediates **147** and **148**

A solution of the appropriate protected α -amino acid (1-(tert-butoxycarbonylamino)cyclopropane carboxylic acid (**145**) or 1-(tert-butoxycarbonylamino)cyclopentane carboxylic acid (**146**)) (1 eq) and iodomethane (8 eq) in dry THF ($C = 0.3$ M) was stirred at 0°C . NaH (4.7 eq) was slowly added and the reaction mixture was stirred at RT for 36 hours. The solution was concentrated *in vacuo* and the residue was dissolved in EtOAc, washed with water (3x) and brine (1x). The organic phase was then dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum to give the appropriate compound (**147**, $n = 0$ – yield = 70% and **148**, $n = 2$ – yield = 67%) which was used without further purification in the next step.

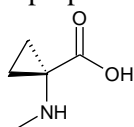
Partie expérimentale



General procedure for the synthesis of the intermediates **149** and **150**

The appropriate *N*-methylated and protected α -amino acid (1-[tert-butoxycarbonyl(methyl)amino]cyclopropane carboxylic acid (**147**) or 1-[tert-butoxycarbonyl(methyl)amino]cyclopentane carboxylic acid (**148**) (1 eq) was dissolved in dioxane (C = 0.5 M). A solution of HCl 4M in dioxane (10 eq) was slowly added at RT. The reaction mixture was stirred at RT overnight. The solids in suspension were filtered off and washed with petroleum ether. They were then dissolved in EtOH (C = 0.4 M) and propylene oxide (30 eq) was added. The mixture was stirred at RT for 4 hours. The elimination of chloride was monitored using the silver nitrate assay. The solution was concentrated under reduced pressure and the residue was washed with purified water to afford the appropriated compound (**149** and **150**).

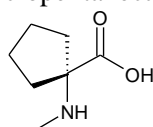
1-(Methylamino)cyclopropanecarboxylic acid (**149**)



White solid
110 mg – 65%

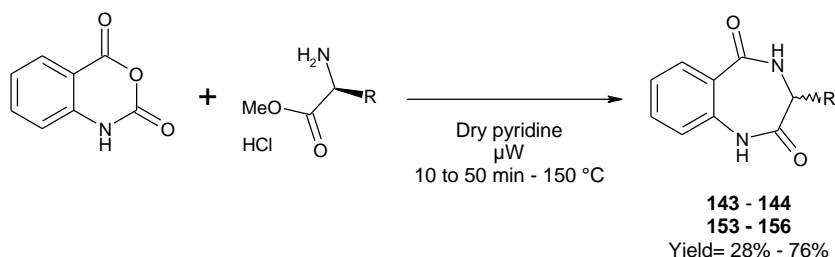
$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ (ppm) 2.66 (s, 3H), 1.29 - 1.23 (m, 2H), 1.19 - 1.13 (m, 2H)

1-(Methylamino)cyclopentanecarboxylic acid (**150**)

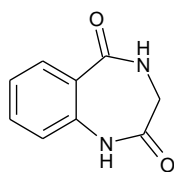


White solid
80 mg – 43%

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ (ppm) 2.59 (s, 3H), 2.25 - 2.15 (m, 2H), 1.92 - 1.70 (m, 6H)

Synthesis of the final products 143, 144, 153 to 156 and 166 to 168**Final products 143, 144 and 153 to 156****General procedure for the synthesis of the final products 143, 144, and 153 to 156**

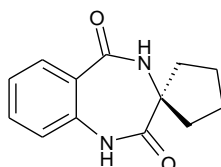
A solution of isatoic anhydride (0.5 mmol, 1 eq) and the appropriate α -aminoester in dry pyridine (C = 1 M) was heated under microwave irradiation for 10 to 50 minutes at 150 °C (230 °C for **144**). The reaction mixture was cooled to RT and then was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography to give the desired compound (**143**, **144** and **153** to **156**).

3,4-Dihydro-1H-1,4-benzodiazepine-2,5-dione (143)

μ W: 10 min – 150 °C
 Flash chromatography: pure DCM to DCM/MeOH 9/1
 Orange solid
 95 mg – 76%
 t_R = 0.83 min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ m/z = 177
 Purity (215 nm) 96%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.35 (brs, NH), 8.54 (t, J = 5.5 Hz, NH), 7.76 (dd, J = 7.8 Hz, J = 1.6 Hz, 1H), 7.51 (ddd, J = 8.1 Hz, J = 7.3 Hz, J = 1.7 Hz, 1H), 7.22 (ddd, J = 7.8 Hz, J = 7.3 Hz, J = 1.2 Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 8.1 Hz, J = 0.8 Hz, 1H), 3.59 (d, 2H, J = 5.8 Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 171.6, 168.5, 137.6, 132.7, 131.3, 126.0, 124.3, 121.4, 44.9

Spiro[1,4-dihydro-1,4-benzodiazepine-3,1'-cyclopentane]-2,5-dione (144)

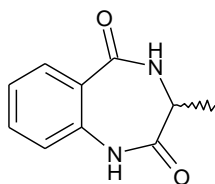
μ W: 30 min – 230 °C
 Flash chromatography: pure DCM to DCM/Actéone 9/1
 White solid
 150 mg – 65%
 t_R = 3.30 min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ m/z = 231
 Purity (215 nm) 98%

Partie expérimentale

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.33 (brs, NH), 8.51 (brs, NH), 7.73 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.50 (ddd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 7.3 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.18 (ddd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 0.7 Hz, 1H), 2.16 - 1.89 (m, 2H), 1.75 - 1.49 (m, 6H)

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 173.8, 168.1, 137.0, 132.9, 130.7, 126.6, 124.0, 120.7, 64.5, 40.4, 35.9, 25.4, 24.0

(3S)-3-Methyl-3,4-dihydro-1H-1,4-benzodiazepine-2,5-dione (**153**)



μW: 10 min – 150 °C

Flash chromatography: pure DCM to DCM/Acetone 7/3

White solid

16 mg – 42%

*t*_R = 1.99 min (run 5 min)

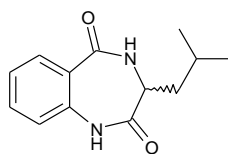
MS [M+H]⁺ *m/z* = 191

Purity (215 nm) 96%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.35 (brs, NH), 8.40 (d, *J* = 5.2 Hz, NH), 7.73 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.50 (ddd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.20 (ddd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 7.3 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 0.8 Hz, 1H), 3.84 - 3.75 (m, 1H), 1.22 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H)

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 172.7, 168.2, 137.2, 132.6, 130.9, 126.7, 124.3, 121.3, 47.7, 14.2

(3S)-3-Isobutyl-3,4-dihydro-1H-1,4-benzodiazepine-2,5-dione (**154**)



μW: 30 min – 150 °C

Flash chromatography: pure DCM to DCM/Acetone 6/4

White solid

49 mg – 43%

*t*_R = 3.59 min (run 10 min)

MS [M+H]⁺ *m/z* = 233

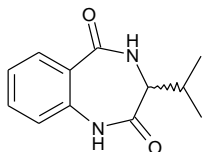
Purity (215 nm) 99%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.8 (brs, NH), 8.46 (d, *J* = 6.4 Hz, NH), 7.74 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.51 (ddd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 7.3 Hz, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H), 3.60 (q, *J* = 7.4 Hz, 1H), 1.88 - 1.64 (m, 1H), 1.56 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 0.85 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.77 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H)

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 172.1, 168.2, 137.2, 132.7, 130.8, 126.7, 124.4, 121.3, 50.6, 36.6, 24.3, 23.3, 22.0

Partie expérimentale

(3S)-3-Isopropyl-3,4-dihydro-1H-1,4-benzodiazepine-2,5-dione (**155**)

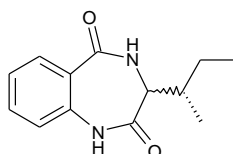


μ W: 50 min – 150 °C
Flash chromatography: pure DCM to DCM/Acetone 6/4
White solid
38 mg – 35%
 t_R = 3.17 min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ m/z = 219
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.34 (brs, NH), 8.53 (d, J = 6.8 Hz, NH), 7.73 (dd, J = 7.8 Hz, J = 1.3 Hz, 1H), 7.49 (td, J = 7.8 Hz, J = 1.6 Hz, 1H), 7.19 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.22 (dd, J = 10.2 Hz, J = 8.0 Hz, 1H), 0.97 - 0.82 (m, 7H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 171.3, 167.9, 137.0, 132.7, 130.8, 126.8, 124.3, 121.2, 26.8, 20.2, 19.3

3-[(1S)-1-Methylpropyl]-3,4-dihydro-1H-1,4-benzodiazepine-2,5-dione (**156** and **156'**)

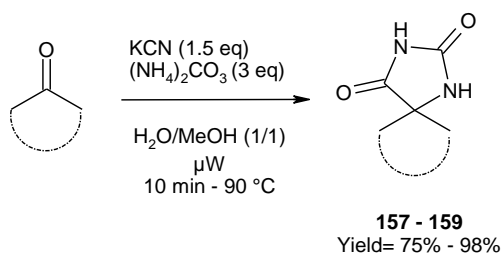


μ W: 30 min – 150 °C
Flash chromatography: pure DCM to DCM/Acetone 9/1
White solid
33 mg – 28%
 t_R = 3.18 min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ m/z = 233
Purity (215 nm) 99%

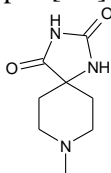
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.35 (brs, NH), 8.53 (d, J = 6.9 Hz, NH), 7.89 (dt, J = 7.9 Hz, J = 1.9 Hz, 1H), 7.49 (ddd, J = 8.1 Hz, J = 7.4 Hz, J = 1.6 Hz, 1H), 7.19 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 3.30 - 3.25 (m, 1H), 1.77 - 1.68 (m, 1H), 1.58 - 1.38 (m, 1H), 1.18 - 1.01 (m, 1H), 0.9 - 0.7 (m, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$ of the mixture of the two diastereoisomers:

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 171.4, 171.3, 168.0, 167.8, 137.0, 136.9, 132.7, 130.8, 130.7, 126.8, 124.3, 121.2, 58.5, 33.0, 32.4, 26.2, 24.8, 16.2, 15.3, 11.4, 10.4

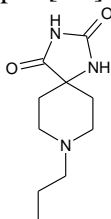
Intermediates **157** to **165**General procedure for the synthesis of the intermediates **157** to **159**

To a stirred solution of corresponding cyclic ketones (1 eq) in a mixture of MeOH/H₂O (1/1, 3 mL) was added sequentially the ammonium carbonate (3 eq) and the potassium cyanide (1.5 eq). The sealed tube was heated under microwave irradiation for 10 minutes at 90 °C. The reaction mixture was cooled at 0 °C and the precipitate was filtered off and washed with ice water to give the desired compound (**157** to **159**).

8-Methyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**157**)

White solid
625 mg – 98%
 $t_R = 0.35$ min (run 5 min)
MS [M+H]⁺ $m/z = 184$
Purity (215 nm) 99%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.32 (brs, NH), 8.24 (s, 1H, NH), 1.63 - 1.43 (m, 9H), 1.30 - 1.17 (m, 1H)

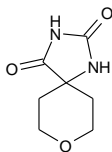
8-Propyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**158**)

White solid
395 mg – 75%
 $t_R = 0.35$ min (run 5 min)
MS [M+H]⁺ $m/z = 212$
Purity (215 nm) 99%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.56 (brs, NH), 8.24 (s, NH), 2.71 - 2.67 (m, 2H), 2.26 - 2.15 (m, 4H), 1.77 (td, $J = 13.2$ Hz, $J = 3.9$ Hz, 2H), 1.48 - 1.35 (m, 4H), 0.83 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)

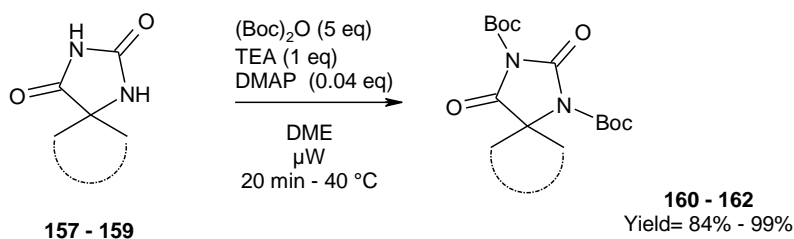
Partie expérimentale

8-Oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**159**)



White solid
 450 mg – 97%
 $t_R = 0.38$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 171$
 Purity (215 nm) 99%

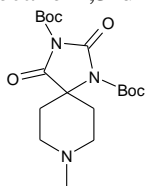
1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.24 (brs, NH), 8.48 (s, NH), 3.79 (td, $J = 11.7$ Hz, $J = 4.2$ Hz, 2H), 3.58 (td, $J = 11.3$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 2H), 1.82 (ddd, $J = 13.7$ Hz, $J = 11.0$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 2 H), 1.46 - 1.41 (m, 2H)



General procedure for the synthesis of the intermediates **160** to **162**

The corresponding hydantoin (**157**, **158** or **159**, 1 eq) was dissolved in DME ($C = 0.2$ M). Tert-butoxycarbonyl tert-butyl carbonate (5 eq), DMAP (0.04 eq) and TEA (1 eq) were added. The reaction mixture was heated under microwave irradiation for 20 minutes at 40 °C. Solvents were evaporated and the residue was dissolved in DCM, washed with 1M HCl (2x) and brine (1x). The organic phase was then dried over $MgSO_4$ and concentrated to dryness to give the appropriate compound (**160** to **162**).

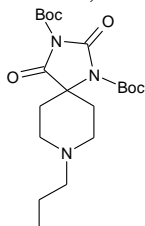
Ditert-butyl 8-methyl-2,4-dioxo-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-1,3-dicarboxylate (**160**)



White solid
 610 mg – 99%
 $t_R = 2.70$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 384$
 Purity (215 nm) 96%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 3.42 - 3.30 (s, 3H), 2.84 - 2.73 (m, 6H), 2.33 - 2.29 (m, 2H), 1.46 (s, 18H)

Ditert-butyl 2,4-dioxo-8-propyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-1,3-dicarboxylate (**161**)

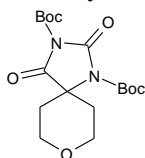


White solid
 330 mg – 85%
 $t_R = 2.35$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 412$
 Purity (215 nm) 96%

Partie expérimentale

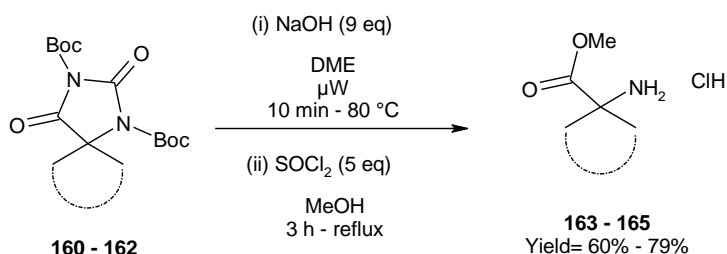
$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 2.88 - 2.75 (m, 4H), 2.73 - 2.60 (m, 2H), 2.41 - 2.36 (m, 2H), 1.79 - 1.72 (m, 2H), 1.58 (s, 9H), 1.57 (s, 9H), 1.55 - 1.48 (m, 2H), 0.92 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H)

Ditert-butyl 2,4-dioxo-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-1,3-dicarboxylate (**162**)



White solid
370 mg – 84%
 $t_R = 2.95$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 371$
Purity (215 nm) 96%

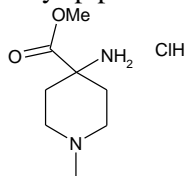
$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 4.06 (td, $J = 12.2$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 2H), 3.92 (dd, $J = 11.6$ Hz, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.80 (td, $J = 13.3$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 2H), 1.73 (d, $J = 14.1$ Hz, 2H), 1.59 (s, 9H), 1.58 (s, 9H)



General procedure for the synthesis of the intermediates **163** to **165**

The corresponding activated hydantoin (**160**, **161** or **162**, 1 eq) was dissolved in DME ($C = 0.4$ M). NaOH (9 eq) was added and the reaction mixture was heated under microwave irradiation for 10 minutes at 80 °C. Water was added and aqueous phase was washed with Et_2O (3x). A solution of 1M HCl was added until pH 7. Water was evaporated under reduced pressure. The residue was suspended in MeOH ($C = 0.8$ M) and thionyl chloride (5 eq) was added. The mixture was refluxed for 3 hours. Solvents were removed *in vacuo* and the residue was dissolved in DCM, washed with saturated NaHCO_3 aq (3x), and brine (1x). Organic phase was then dried over MgSO_4 and concentrated to dryness to give the appropriate compound (**163** to **165**).

Methyl 4-amino-1-methyl-piperidine-4-carboxylate (**163**)

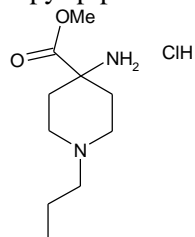


Colorless oil
350 mg – 60%
 $t_R = 0.44$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 173$
Purity (215 nm) 96%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 3.71 (s, 3H), 2.57 - 2.46 (m, 4H), 2.29 (s, 3H), 2.16 - 2.07 (m, 2H), 1.59 - 1.53 (m, 2H)

Partie expérimentale

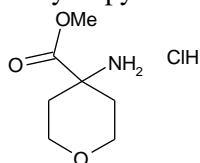
Methyl 4-amino-1-propyl-piperidine-4-carboxylate (**164**)



Colorless oil
 250 mg – 79%
 $t_R = 2.12$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 201$
 Purity (215 nm) 96%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 3.71 (s, 3H), 2.58 - 2.54 (m, 4H), 2.38 - 2.33 (m, 2H), 2.18 - 2.09 (m, 2H), 1.60 - 1.50 (m, 4H), 0.91 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H)

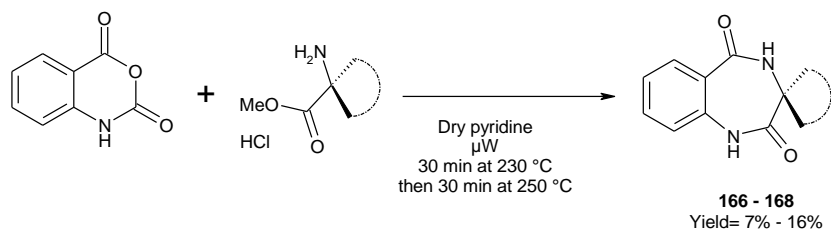
Methyl 4-aminotetrahydropyran-4-carboxylate (**165**)



Colorless oil
 255 mg – 72%
 $t_R = 0.56$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 160$
 Purity (215 nm) 96%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 3.84 (ddd, $J = 11.6$ Hz, $J = 9.2$ Hz, $J = 2.9$ Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.62 (dt, $J = 11.5$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 2H), 2.07 (ddd, $J = 13.6$ Hz, $J = 9.3$ Hz, $J = 4.3$ Hz, 2H), 1.47 (m, 2H)

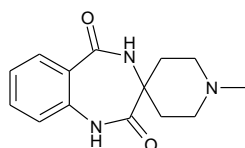
Final products **166** to **168**



General procedure for the synthesis of the final products **166** to **168**

A solution of isatoic anhydride (1 eq) and the appropriate restricted α -aminoester (**163**, **164** or **165**) in dry pyridine ($C = 1$ M) was heated under microwave irradiation for 30 minutes at 230 °C and 30 minutes at 250 °C. The reaction mixture was cooled to RT and was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography and then by preparative HPLC to give the desired compound (**166** to **168**).

1'-Methylspiro[1,4-dihydro-1,4-benzodiazepine-3,4'-piperidine]-2,5-dione (**166**)



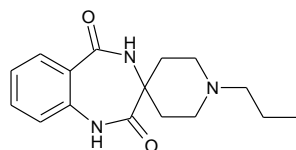
White solid
 10 mg – 12%
 $t_R = 3.63$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 260$
 Purity (215 nm) 100%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD- d_4): δ (ppm) 8.53 (brs, NH), 7.89 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.58 (ddd, $J = 8.13$ Hz, $J = 7.34$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.28 (ddd, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.13 (dd, $J = 8.13$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1H), 2.84 - 2.79 (m, 2H), 2.71 - 2.63 (m, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.15 - 2.07 (m, 2H), 1.92 - 1.85 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD- d_4): δ (ppm) 172.1, 168.7, 136.5, 133.3, 130.3, 125.1, 124.1, 120.0, 54.2, 50.1, 43.8, 30.3

1'-Propylspiro[1,4-dihydro-1,4-benzodiazepine-3,4'-piperidine]-2,5-dione (**167**)

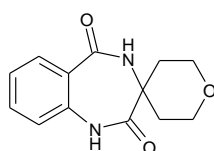


White solid
10 mg – 7%
 $t_R = 4.25$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 288$
Purity (215 nm) 100%

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD- d_4): δ (ppm) 7.88 (ddd, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.6$ Hz, $J = 0.3$ Hz, 1H), 7.57 (ddd, $J = 8.1$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.27 (ddd, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.12 (ddd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.1$ Hz, $J = 0.4$ Hz, 1H), 2.73 - 2.64 (m, 2H), 2.49 - 2.42 (m, 2H), 2.39 - 2.33 (m, 2H), 2.08 - 1.99 (m, 2H), 1.85 - 1.80 (m, 2H), 1.60 - 1.47 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD- d_4): δ (ppm) 172.6, 168.7, 136.6, 133.2, 130.2, 125.2, 124.0, 120.0, 60.1, 55.1, 48.4, 30.7, 19.2, 10.7

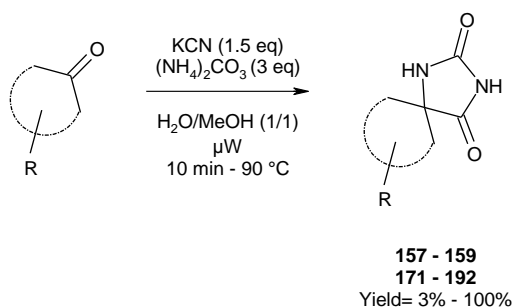
Spiro[1,4-dihydro-1,4-benzodiazepine-3,4'-tetrahydropyran]-2,5-dione (**168**)



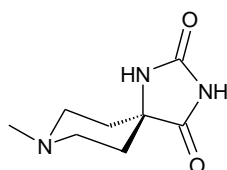
White solid
20 mg – 16%
 $t_R = 3.77$ min (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 247$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (MeOD- d_4): δ (ppm) 7.89 (ddd, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.6$ Hz, $J = 0.4$ Hz, 1H), 7.57 (ddd, $J = 8.14$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.27 (ddd, $J = 7.4$ Hz, $J = 7.36$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.12 (ddd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.1$ Hz, $J = 0.4$ Hz, 1H), 3.74 - 3.71 (m, 4H), 1.21 - 1.98 (m, 2H), 1.76 - 1.69 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD- d_4): δ (ppm) 172.3, 168.7, 136.5, 133.2, 130.2, 125.3, 124.0, 120.0, 62.9, 54.7, 31.9

Synthesis of the final products 157, 158, 159 and 171 to 192**General procedure A for the synthesis of the final products 157 to 159 and 171 to 192**

To a stirred solution of corresponding cyclic ketone (1 eq) in a mixture of MeOH/H₂O (1/1, C = 0.6 M) was added sequentially the ammonium carbonate (3 eq) and the potassium cyanide (1.5 eq). The sealed tube was heated under microwave irradiation for 10 minutes at 90°C. The reaction mixture was cooled to RT and the purification by a suitable method afforded the desired product (**157 to 159** and **171 to 192**).

8-Methyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (157)

The reaction was put into an ice bath and the precipitate was filtered off and washed with water

White solid

625 mg – 98%

$t_R = 0.4$ min (run 5 min)

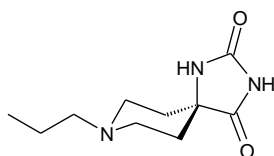
MS [M+H]⁺ $m/z = 184$

Purity (215 nm) 98%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.39 (brs, NH), 8.28 (s, NH), 2.62 (dt, $J = 11.8$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 2H), 2.21 - 2.12 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.79 (td, $J = 13.0$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.46 (d, $J = 13.0$ Hz, 2H)

¹³C-NMR (J-mod) (DMSO-d₆): δ (ppm) 179.4 (C=O), 157.7 (C=O), 60.2 (C), 50.7 (CH₂), 46.4 (CH₃), 33.6 (CH₂)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z [M+H]⁺ calculated for C₈H₁₄N₃O₂ 184.1086, found 184.1082

8-Propyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (158)

The reaction was put into an ice bath and the precipitate was filtered off and washed with water

White solid

396 mg – 75%

$t_R = 0.35$ min (run 5 min)

MS [M+H]⁺ $m/z = 212$

Purity (215 nm) 98%

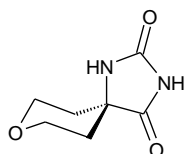
Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.56 (brs, NH), 8.24 (s, NH), 2.71 - 2.67 (m, 2H), 2.26 - 2.15 (m, 4H), 1.77 (td, $J = 13.2$ Hz, $J = 3.9$ Hz, 2H), 1.48 - 1.35 (m, 4H), 0.83 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 179.3 (C=O), 157.7 (C=O), 60.8 (C), 60.1 (CH_2), 48.7 (CH_2), 33.7 (CH_2), 20.1 (CH_2), 12.5 (CH_3)

HRMS (TOF, ES^+) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$ 212.1399, found 212.1393

8-Oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**159**)



The reaction was put into an ice bath and the precipitate was filtered off and washed with water

White solid

403 mg – 95%

$t_R = 0.4$ min (run 5 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 171$

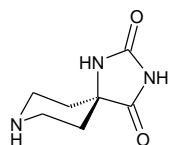
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.24 (brs, NH), 8.48 (s, NH), 3.79 (dt, $J = 11.7$ Hz, $J = 4.2$ Hz, 2H), 3.58 (td, $J = 11.3$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 2H), 1.82 (ddd, $J = 13.7$ Hz, $J = 11.0$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 2H), 1.46 - 1.41 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 178.7, 157.6, 63.0, 59.8, 33.8

HRMS (TOF, ES^+) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ 171.0770, found 171.0766

1,3,8-Triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**170**)



The reaction was put into an ice bath and the precipitate was filtered off and washed with water

White solid

232 mg – 76%

$t_R = 0.5$ min (run 5 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 170$

Purity (215 nm) 98%

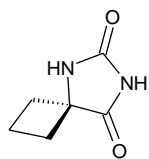
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.42 (s, NH), 2.86 - 2.79 (dt, $J = 12.8$ Hz, $J = 3.7$ Hz, 2H), 2.66 (td, $J = 11.6$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 2H), 1.67 (td, $J = 12.7$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 2H), 1.38 - 1.33 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 178.7, 157.0, 61.2, 41.7, 34.3

HRMS (TOF, ES^+) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$ 170.0930, found 170.0932

Partie expérimentale

1,3-Diazaspiro[4.3]octane-2,4-dione (**171**)



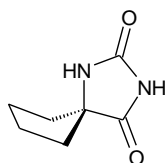
Purified by flash chromatography pure
DCM to DCM/MeOH 97/3
White solid
150 mg – 60%
 $t_R = 1.28$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 141$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.50 (s, NH), 8.28 (s, NH), 2.38 - 2.17 (m, 4H), 1.94 - 1.79 (m, 1H), 1.77 - 1.63 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 179.0, 156.4, 61.4, 32.6, 13.7

HRMS (TOF, ES^+) m/z $[M+H]^+$ calculated for $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$ 141.0664, found 141.0665

1,3-Diazaspiro[4.4]nonane-2,4-dione (**172**)



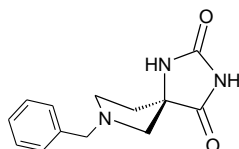
The reaction was put into an ice bath and
the precipitate was filtered off and
washed with water
White solid
232 mg – 91%
 $t_R = 2.0$ min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 155$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.11 (brs, NH), 8.04 (s, NH), 1.94 - 1.83 (m, 2H), 1.73 - 1.59 (m, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 180.6, 157.7, 68.8, 37.6, 25.1

HRMS (TOF, ES^+) m/z $[M+H]^+$ calculated for $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ 155.0821, found 155.0825

7-Benzyl-1,3,7-triazaspiro[4.4]nonane-2,4-dione (**173**)



Purified by flash chromatography pure
DCM to DCM/Acetone/MeOH 80/18/2
White solid
220 mg – 50%
 $t_R = 1.88$ min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 246$
Purity (215 nm) 98%

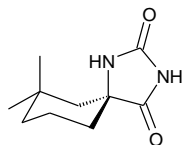
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.6 (s, NH), 8.34 (s, NH), 7.30 - 7.20 (m, 5H), 3.64 - 3.54 (m, 2H), 2.84 - 2.77 (m, 1H), 2.67 (q, $J = 9.8$ Hz, 2H), 2.42 (q, $J = 7.9$ Hz, 1H), 2.21 - 2.13 (m, 1H), 1.85 (dt, $J = 13$ Hz, $J = 7.3$ Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 178.5 (C=O), 156.8 (C=O), 139.0 (C_{aro} quaternary), 129.0 (C_{aro}), 128.6 (C_{aro}), 127.4 (C_{aro}), 67.2 (C), 63.5 (CH_2), 59.1 (CH_2), 53.5 (CH_2), 36.9 (CH_2)

Partie expérimentale

HRMS (TOF, ES⁺) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₃H₁₅N₃O₂ 246.1243, found 246.1238

7,7-Dimethyl-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**174**)



The reaction was put into an ice bath and the precipitate was filtered off and washed with water

White solid

250 mg – 71%

t_R = 3.25 min (run 10 min)

MS [M+H]⁺ m/z = 197

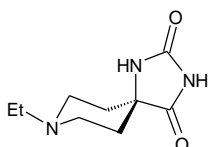
Purity (215 nm) 98%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.4 (brs, NH), 8.04 (s, NH), 1.75 - 1.59 (m, 1H), 1.54 - 1.47 (m, 4H), 1.39 - 1.26 (m, 2H), 1.13 (td, J = 12.8 Hz, J = 3.0 Hz, 1H), 0.96 (s, 3H), 0.88 (s, 3H)

¹³C-NMR (J-mod) (DMSO-d₆): δ (ppm) 180.1 (C=O), 158.2 (C=O), 63.0 (C), 45.6 (CH₂), 38.1 (C), 34.2 (CH₃), 33.7 (CH₂), 30.2 (CH₂), 26.7 (CH₃), 18.2 (CH₂)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₀H₁₆N₂O₂ 197.1290, found 197.1293

8-Ethyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**175**)



The reaction was put into an ice bath and the precipitate was filtered off and washed with water

White solid

689 mg – 100%

t_R = 0.4 min (run 5 min)

MS [M+H]⁺ m/z = 198

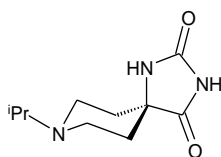
Purity (215 nm) 98%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.51 (brs, NH), 8.29 (s, NH), 2.71 (dt, J = 11.8 Hz, J = 3.8 Hz, 2H), 2.33 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.18 (td, J = 11.7 Hz, J = 2.3 Hz, 2H), 1.77 (td, J = 13.2 Hz, J = 4.1 Hz, 2H), 1.49 - 1.45 (m, 2H), 0.98 (t, J = 7.2 Hz, 3H)

¹³C-NMR (J-mod) (DMSO-d₆): δ (ppm) 179.1 (C=O), 157.4 (C=O), 60.8 (C), 51.9 (CH₂), 48.2 (CH₂), 33.7 (CH₂), 12.9 (CH₃)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z [M+H]⁺ calculated for C₉H₁₅N₃O₂ 198.1243, found 198.1239

8-Isopropyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**176**)



Purified by flash chromatography pure DCM to DCM/MeOH/NH₃ 80/18/2

White solid

286 mg – 75%

t_R = 2.95 min (run 10 min)

MS [M+H]⁺ m/z = 212

Purity (215 nm) 98%

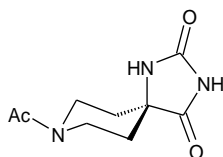
Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.57 (s, NH), 8.41 (s, NH), 2.72 - 2.62 (m, 3H), 2.37 (td, $J = 11.5$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 2H), 1.75 (td, $J = 12.9$ Hz, $J = 4.3$ Hz, 2H), 1.51 - 1.46 (m, 2H), 0.95 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 178.6 (C=O), 156.7 (C=O), 61.1 (C), 54.4 (CH), 43.8 (CH₂), 34.1 (CH₂), 18.6 (CH₃)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₀H₁₇N₃O₂ 212.1399, found 212.1387

8-Acetyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**177**)



Purified by flash chromatography pure
DCM to DCM/MeOH 92/8

White solid

305 mg – 80%

$t_R = 1.6$ min (run 10 min)

MS [M+H]⁺ $m/z = 212$

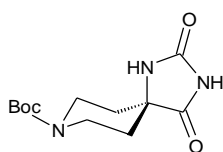
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.7 (brs, NH), 8.56 (s, NH), 4.13 (dt, $J = 13.3$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 1H), 3.75 (dt, $J = 14.3$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 1H), 3.32 (td, $J = 11.3$ Hz, $J = 3.0$ Hz, 1H), 3.0 - 2.94 (m, 1H), 2.0 (s, 3H), 1.84 - 1.75 (m, 1H), 1.68 - 1.48 (m, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 177.9 (C=O), 168.7 (C=O), 156.7 (C=O), 60.7 (C), 42.1 (CH₂), 37.1 (CH₂), 33.8 (CH₂), 33.1 (CH₂), 22.0 (CH₃)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z [M+H]⁺ calculated for C₉H₁₃N₃O₃ 212.1035, found 212.1038

8-Tert-butyloxycarbonyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**178**)



The reaction was put into an ice bath and
the precipitate was filtered off and
washed with water

White solid

480 mg – 100%

$t_R = 3.15$ min (run 10 min)

MS [M+H]⁺ $m/z = 270$

Purity (215 nm) 99%

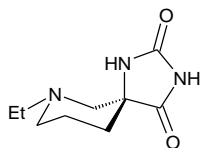
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.23 (s, NH), 3.82 - 3.77 (m, 2H), 3.13 - 2.98 (m, 2H), 1.65 (td, $J = 13.6$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 2H), 1.49 - 1.43 (m, 2H), 1.39 (s, 9H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 180.0 (C=O), 159.2 (C=O), 154.3 (C=O), 79.3 (C), 60.6 (C), 39.7 (CH₂), 33.3 (CH₂), 28.8 (CH₃)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₂H₁₉N₃O₄ 270.1454, found 270.1459

Partie expérimentale

7-Ethyl-1,3,7-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**179**)



The reaction was put into an ice bath and the precipitate was filtered off and washed with water

White solid

592 mg – 58%

$t_R = 0.52$ min (run 5 min)

MS $[M+H]^+$ $m/z = 198$

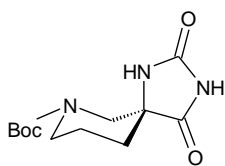
Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.58 (brs, NH), 8.23 (s, 1H), 2.80 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 2.64 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 2.34 (qd, $J = 7.3$ Hz, $J = 2.9$ Hz, 2H), 2.12 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 1.90 (td, $J = 11.0$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H), 1.79 – 1.67 (m, 1H), 1.63 – 1.50 (m, 3H), 0.97 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 177.5 (C=O), 157.0 (C=O), 62.3 (C), 59.4 (CH₂), 52.5 (CH₂), 52.2 (CH₂), 32.1 (CH₂), 21.2 (CH₂), 11.9 (CH₃)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z $[M+H]^+$ calculated for C₉H₁₅N₃O₂ 198.1243, found 198.1239

7-Ethyl-1,3,7-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**180**)



Purified by flash chromatography pure DCM to DCM/MeOH 97/3

White solid

265 mg – 55%

$t_R = 3.03$ min (run 10 min)

MS $[M+H]^+$ $m/z = 270$

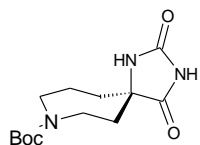
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.68 (s, NH), 8.40 (s, NH), 3.67 – 3.47 (m, 2H), 3.20 – 2.96 (m, 2H), 1.84 – 1.75 (m, 2H), 1.69 – 1.59 (m, 2H), 1.38 (s, 9H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 176.6 (C=O), 156.7 (C=O), 154.1 (C=O), 79.4 (C), 60.6 (C), 32.0 (CH₂), 28.7 (CH₂), 20.6 (CH₃)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z $[M+H]^+$ calculated for C₁₂H₁₉N₃O₄ 270.1454, found 270.1450

7-Ethyl-1,3,7-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**181**)



The reaction was put into an ice bath and the precipitate was filtered off and washed with water

White solid

492 mg – 97%

$t_R = 3.22$ min (run 10 min)

MS $[M+H]^+$ $m/z = 284$

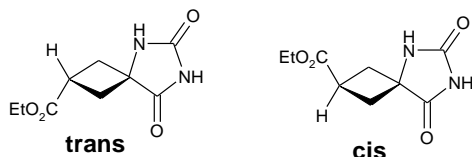
Purity (215 nm) 99%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ ($T = 77\text{ }^\circ\text{C}$, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.87 (s, NH), 3.63 (ddd, $J = 15.1\text{ Hz}$, $J = 5.7\text{ Hz}$, $J = 2.8\text{ Hz}$, 1H), 3.53 - 3.44 (m, 1H), 3.31 - 3.26 (m, 1H), 3.20 (ddd, $J = 14.7\text{ Hz}$, $J = 11.0\text{ Hz}$, $J = 2.1\text{ Hz}$, 1H), 1.97 - 1.74 (m, 3H), 1.72 - 1.61 (m, 3H), 1.43 (s, 9H)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($T = 77\text{ }^\circ\text{C}$, DMSO- d_6): δ (ppm) 180.6, 158.7, 155.1, 79.0, 64.1, 45.8, 41.4, 37.9, 34.8, 28.7, 21.9

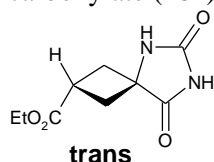
HRMS (TOF, ES^+) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$ 284.3355, found 284.3359



Synthesis of the ethyl 2,4-dioxo-1,3-diazaspiro[3.4]octane-7-carboxylate (trans-**182** and cis-**182'**)

3-oxocyclobutanecarboxylic acid (1.8 mmol, 1 eq) was used as starting material. The reaction was complete after 10 minutes at $90\text{ }^\circ\text{C}$. The reaction mixture was cooled to RT and put into an ice bath. The precipitate was filtered off, washed twice with water and dried under vacuum to afford 2,4-dioxo-1,3-diazaspiro[3.4]octane-2-carboxylic acid **190** (330 mg, quantitative) as a white solid. To a suspension of this compound (1 eq.) in EtOH was added thionyl chloride (5 eq.). The mixture was stirred at reflux for 3 hours. The reaction mixture was cooled to RT and solvent was removed under vacuum. The mixture of cis/trans products was purified by preparative HPLC to afford the trans product **182** (83 mg, 22%) as a white solid and the cis product **182'** (382 mg, 49%) as a white solid.

Trans-ethyl 2,4-dioxo-1,3-diazaspiro[3.4]octane-7-carboxylate (**182**)



White solid
83 mg – 22%
 $t_R = 2.27\text{ min}$ (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 213$
Purity (215 nm) 99%

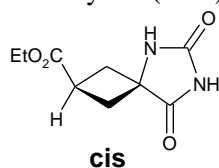
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.59 (s, NH), 8.46 (s, NH), 4.08 (q, $J = 7.2\text{ Hz}$, 2H), 3.19 (quint, $J = 8.2\text{ Hz}$, 1H), 2.70 - 2.64 (m, 2H), 2.40 - 2.32 (m, 2H), 1.18 (t, $J = 7.1\text{ Hz}$, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 177.3 (C=O), 173.6 (C=O), 156.6 (C=O), 60.6 (CH_2), 59.5 (C), 35.0 (CH_2), 30.8 (CH_3), 14.6 (CH)

HRMS (TOF, ES^+) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ 213.0875, found 213.0875

Partie expérimentale

Cis-ethyl 2,4-dioxo-1,3-diazaspiro[3.4]octane-7-carboxylate (**182'**)



White solid
382 mg – 49%
 $t_R = 2.83$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 213$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.65 (s, NH), 8.28 (s, NH), 4.07 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.03 (quint, $J = 9.64$ Hz, 1H), 2.59 - 2.52 (m, 2H), 2.46 - 2.38 (m, 2H), 1.18 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 178.8 (C=O), 173.8 (C=O), 156.4 (C=O), 60.8 (CH₂), 57.6 (C), 35.9 (CH₂), 29.8 (CH₃), 14.6 (CH)

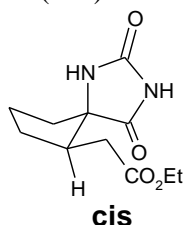
HRMS (TOF, ES⁺) m/z $[M+H]^+$ calculated for C₉H₁₂N₂O₄ 213.0875, found 213.0867

This compound was recrystallized in EtOH for X-Ray studies.

Mp: 187.4 °C

The synthesis of final products **183** and **183'** was performed following the general procedure A. At the end of the reaction, the solution was cooled to RT and put into an ice bath. The precipitate was filtered off, washed twice with water. The diastereoisomers were separated by preparative HPLC to afford compound cis product **183** (216 mg, 50%, white solid) as a racemic mixture (5R, 6R; 5S, 6S) and compound trans product **183'** (69 mg, 16%, colorless oil) as a racemic mixture (5R, 6S; 5S, 6R).

Ethyl 2-[(5R,6R)-2,4-dioxo-1,3-diazaspiro[4.4]nonan-9-yl]acetate (**183**) + enantiomer



White solid
216 mg – 50%
 $t_R = 2.87$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 241$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.52 (s, NH), 8.08 (s, NH), 4.06 - 3.90 (m, 2H), 2.48 - 2.41 (m, 1H), 2.35 - 2.20 (m, 2H), 2.07 - 1.85 (m, 2H), 1.74 - 1.52 (m, 3H), 1.39 - 1.25 (m, 1H), 1.14 (t, $J = 7$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 178.1 (C=O), 172.0 (C=O), 157.0 (C=O), 70.1 (C), 60.3 (CH₂), 43.5 (CH₃), 38.4 (CH₂), 34.9 (CH₂), 31.6 (CH₂), 22.3 (CH₂), 14.6 (CH)

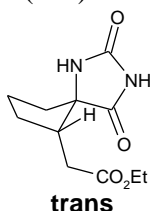
HRMS (TOF, ES⁺) m/z $[M+H]^+$ calculated for C₁₁H₁₆N₂O₄ 241.1188, found 241.1184

This compound was recrystallized in EtOH for X-Ray studies.

Mp: 102.2 °C

Partie expérimentale

Ethyl 2-[(5R,6S)-2,4-dioxo-1,3-diazaspiro[4.4]nonan-9-yl]acetate (**183**) + enantiomer



Colorless oil
69 mg – 16%
 $t_R = 3.45$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 241$
Purity (215 nm) 99%

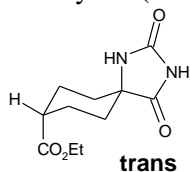
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.54 (s, NH), 7.91 (s, NH), 4.01 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.36 - 2.25 (m, 2H), 2.20 - 2.10 (m, 1H), 2.02 - 1.85 (m, 2H), 1.82 - 1.63 (m, 3H), 1.55 - 1.42 (m, 1H), 1.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 178.2 (C=O), 172.1 (C=O), 156.8 (C=O), 70.3 (C), 60.5 (CH₂), 45.0 (CH₃), 35.8 (CH₂), 34.6 (CH₂), 30.2 (CH₂), 21.8 (CH₂), 14.6 (CH)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z $[M+H]^+$ calculated for C₁₁H₁₆N₂O₄ 241.1188, found 241.1184

The synthesis of final products **184** and **184'** was performed following the general procedure A. At the end of the reaction, the solution was cooled to RT and put into an ice bath. The precipitate was filtered off, washed twice with water. The diastereoisomers were separated by recrystallization in absolute EtOH to afford the cis product **184'** (265 mg, 61%) as a white solid. Filtrate was concentrated and purified by preparative HPLC to afford the trans **184** (40 mg, 10%) as a white solid.

Trans-ethyl 2,4-dioxo-1,3-diazaspiro[4.5]decane-8-carboxylate (**184**)



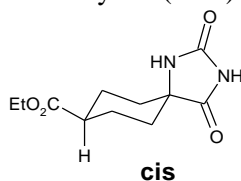
White solid
40 mg – 10%
 $t_R = 4.35$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 241$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.59 (s, NH), 8.43 (s, NH), 4.05 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.40 - 2.32 (m, 1H), 1.89 - 1.82 (m, 2H), 1.74 - 1.54 (m, 6H), 1.17 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 178.9 (C=O), 174.6 (C=O), 156.8 (C=O), 62.0 (C), 60.3 (CH₂), 41.2 (CH), 32.8 (CH₂), 24.0 (CH₂), 14.7 (CH₃)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z $[M+H]^+$ calculated for C₁₁H₁₆N₂O₄ 241.1188, found 241.1194

Cis-ethyl 2,4-dioxo-1,3-diazaspiro[4.5]decane-8-carboxylate (**184'**)



White solid
265 mg – 61%
 $t_R = 3.35$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 241$
Purity (215 nm) 99%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.53 (s, NH), 8.20 (s, NH), 4.08 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.50 - 2.42 (m, 1H), 2.02 - 1.93 (m, 2H), 1.81 - 1.71 (m, 4H), 1.53 - 1.43 (m, 2H), 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 178.6 (C=O), 174.5 (C=O), 156.7 (C=O), 61.1 (CH_2), 60.4 (C), 39.2 (CH_1), 31.7 (CH_2), 23.3 (CH_2), 14.7 (CH_3)

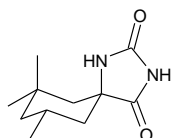
HRMS (TOF, ES^+) m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ 241.1188, found 241.1190

This compound was recrystallized in EtOH/MeOH (3/1) for X-Ray studies.

Mp: 256.4 °C

The synthesis of final products **185** and **192'** was performed following the general procedure **A**.

(5*S*, 9*R*)-7,7,9-Trimethyl-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**185**) + enantiomer



The reaction was put into an ice bath and the precipitate was filtered off and washed with water

White solid

351 mg – 93%

$t_R = 3.68$ min (run 10 min)

MS [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ $m/z = 211$

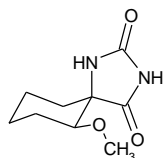
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.29 (brs, NH), 7.97 (s, NH), 1.91 - 1.77 (m, 1H), 1.49 - 1.36 (m, 3H), 1.30 - 1.26 (m, 1H), 1.21 - 1.10 (m, 1H), 0.98 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.90 - 0.76 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 180.3 (C=O), 158.6 (C=O), 63.7 (C), 47.3 (CH_2), 45.3 (CH_2), 41.9 (CH_2), 34.3 (CH_2), 31.0 (C), 26.7 (CH_3), 24.0 (CH), 22.6 (CH_3)

HRMS (TOF, ES^+) m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ 211.1447, found 211.1454

(5*S*, 6*R*)-6-Methoxy-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**186**) + enantiomer



The reaction was put into an ice bath and the precipitate was filtered off and washed with water

White solid

150 mg – 76%

$t_R = 2.09$ min (run 5 min)

MS [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ $m/z = 199$

Purity (215 nm) 98%

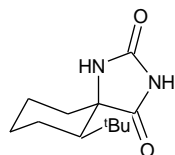
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.23 (brs, NH), 8.07 (s, NH), 3.28 - 3.23 (m, 1H), 3.17 (s, 3H), 1.98 - 1.90 (m, 1H), 1.69 - 1.61 (m, 1H), 1.57 - 1.46 (m, 3H), 1.41 - 1.16 (m, 3H)

Partie expérimentale

^{13}C -NMR (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 178.7 (C=O), 158.6 C(C=O), 80.3 (CH₃), 66.9 (C), 56.7 (CH), 33.8 (CH₂), 25.9 (CH₂), 23.8 (CH₂), 20.7 (CH₂)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z [M+H]⁺ calculated for C₉H₁₄N₂O₃ 199.2298, found 199.2300

(5R, 6R)-6-Tertbutyl-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione
(**187**) + enantiomer



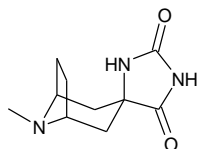
Purified by flash chromatography pure
cHex to cHex/EtOAc 65/35
White solid
12 mg – 3%
 t_R = 3.45 min (run 10 min)
MS [M+H]⁺ m/z = 225
Purity (215 nm) 98%

^1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.55 (s, NH), 8.37 (s, NH), 1.77 - 1.67 (m, 2H), 1.64 - 1.32 (m, 6H), 1.30 - 1.13 (m, 1H)

^{13}C -NMR (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 180.1 (C=O), 157.7 C(C=O), 66.1 (C), 48.9 (CH), 40.1 (CH₂), 34.6 (C), 29.4 (CH₃), 26.3 (CH₂), 24.2 (CH₂), 21.8 (CH₂)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₂H₂₀N₂O₂ 225.1603, found 225.1610

8-Methylspiro[8-azabicyclo[3.2.1]octane-1,3-
imidazolidine]-2,4-dione (**188**)



Purified by flash chromatography pure
DCM to DCM/MeOH/NH₃ 93/6/1
White solid
150 mg – 40%
 t_R = 1.40 min (run 5 min)
MS [M+H]⁺ m/z = 210
Purity (215 nm) 98%

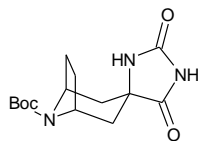
^1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 10.66 (brs, NH), 8.11 (s, NH), 3.08 - 3.02 (m, 2H), 2.19 (s, 3), 2.14 (dd, J = 3.4 Hz, J = 14.0 Hz, 2H), 1.94 - 1.83 (m, 4H), 1.44 - 1.40 (m, 2H)

^{13}C -NMR (J-mod) (DMSO- d_6): δ (ppm) 179.7 (C=O), 157.4 (C=O), 59.8 (C), 59.2 (CH₃), 39.4 (CH₂), 39.1 (CH), 25.4 (CH₂)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₀H₁₅N₃O₂ 210.1243, found 210.1243

Partie expérimentale

8-Tert-butyloxycarbonylspiro[8-azabicyclo[3.2.1]octane-1,3-imidazolidine]-2,4-dione (**189**)



The reaction was put into an ice bath and the precipitate was filtered off and washed with water

White solid

320 mg – 60%

$t_R = 3.35$ min (run 10 min)

MS $[M+H]^+$ $m/z = 296$

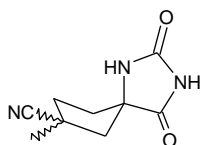
Purity (215 nm) 98%

1H -NMR (T = 77°C, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.53 (brs, NH), 8.08 (s, NH), 4.11 (brs, 2H), 2.20 (dd, $J = 13.9$ Hz, $J = 3.6$ Hz, 2H), 2.07 – 1.99 (m, 2H), 1.97 - 1.85 (m, 2H), 1.59 (d, $J = 13.9$ Hz, 2H), 1.44 (s, 9H)

^{13}C -NMR (T = 77°C, DMSO-d₆): δ (ppm) 178.7, 157.3, 153.1, 79.2, 60.3, 52.4, 39.2, 28.7, 27.1

HRMS (TOF, ES⁺) m/z $[M+H]^+$ calculated for C₁₄H₂₁N₃O₄ 296.1610, found 296.1613

8-Methyl-2,4-dioxo-1,3-diazaspiro[4.4]nonane-8-carbonitrile (**192**)



White solid

82 mg – 28%

$t_R = 3.0$ min (run 5 min)

MS $[M+H]^+$ $m/z = 194$

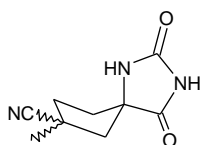
Purity (215 nm) 98%

1H -NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.74 (s, NH), 8.33 (s, NH), 2.54 (s, 1H), 2.24 - 2.07 (m, 2H), 1.96 - 1.84 (m, 3H) 1.44 (s, 3H)

^{13}C -NMR (J-mod) (DMSO-d₆): δ (ppm) 178.8 (C=O), 157.0 (C=O), 126.0 (CN), 68.6 (C), 49.2 (C), 39.1 (CH₂), 37.8 (CH₂), 37.7 (CH₂), 25.7 (CH₃)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z $[M+H]^+$ calculated for C₉H₁₁N₃O₂ 194.0929, found 194.0930

8-Methyl-2,4-dioxo-1,3-diazaspiro[4.4]nonane-8-carbonitrile (**192'**)



White solid

92 mg – 31%

$t_R = 3.42$ min (run 5 min)

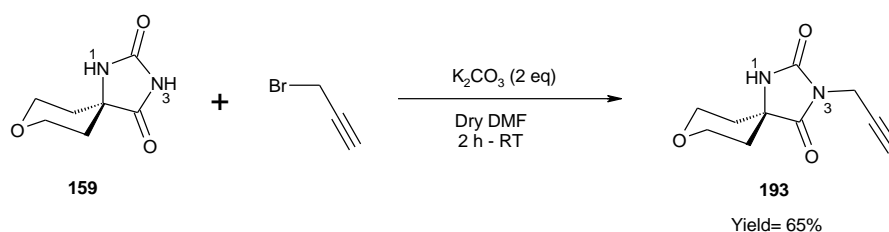
MS $[M+H]^+$ $m/z = 194$

Purity (215 nm) 98%

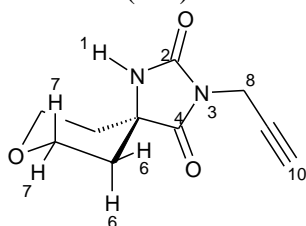
1H -NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.73 (s, NH), 8.31 (s, NH), 2.30 - 2.06 (m, 4H), 1.96 - 1.86 (m, 2H) 1.40 (s, 3H)

^{13}C -NMR (J-mod) (DMSO-d₆): δ (ppm) 178.8 (C=O), 156.6 (C=O), 125.7 (CN), 68.1 (C), 48.6 (C), 38.2 (CH₂), 36.8 (CH₂), 36.6 (CH₂), 25.2 (CH₃)

HRMS (TOF, ES⁺) m/z $[M+H]^+$ calculated for C₉H₁₁N₃O₂ 194.0929, found 194.0931

Synthesis of products 193 to 196**Synthesis of the 3-prop-2-ynyl-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (193)**

To a suspension of **159** (1 eq) and potassium carbonate (3 eq) in dry DMF (C = 0.2 M) was added propargyl bromide (1 eq). The solution was stirred at RT for 2 h. The solvent was removed under vacuum and the residue was partitioned between water and DCM. The organic layer was combined, washed with brine (1x), dried over MgSO₄ and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (ether petroleum to ether petroleum/EtOAc 55/45) to afford 3-prop-2-ynyl-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**193**) as a white solid (200 mg, 65%).

3-Prop-2-ynyl-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione**(193)**

White solid

200 mg – 65%

 $t_R = 1.57$ min (run 5 min)MS [M+H]⁺ $m/z = 209$

Purity (215 nm) 98%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 9.02 (s, NH), 4.13 (d, 2H, ⁴J₈₋₁₀ = 2.3 Hz, H{8}), 3.83 (dt, 2H, ²J_{7eq-7ax} = 11.8 Hz, ³J_{7eq-6ax} = ³J_{7eq-6eq} = 4.2 Hz, H{7eq}), 3.63 (ddd, 2H, ²J_{7ax-7eq} = 11.8 Hz, ³J_{7ax-6ax} = 10.6 Hz, ³J_{7ax-6eq} = 2.7 Hz, H{7ax}), 3.20 (t, 1H, ⁴J₁₀₋₈ = 2.4 Hz, H{10}), 1.87 (ddd, 2H, ²J_{6ax-6eq} = 13.8 Hz, ³J_{6ax-7ax} = 10.5 Hz, ³J_{6ax-7eq} = 4.5 Hz, H{6ax}), 1.50 (d, 2H, ²J_{6eq-6ax} = 13.4 Hz, H{6eq})

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 175.2, 157.4, 78.8, 74.1, 62.8, 59.0, 33.6, 27.6

¹H-NMR 1D-NOESY (DMSO-d₆): δ (ppm)

- 3.83 (dt, 2H, ²J_{7eq-7ax} = 11.8 Hz, ³J_{7eq-6ax} = ³J_{7eq-6eq} = 4.2 Hz, **H{7eq}**) coupled:
 - with 3.63 (ddd, 2H, ²J_{7ax-7eq} = 11.8 Hz, ³J_{7ax-6ax} = 10.6 Hz, ³J_{7ax-6eq} = 2.7 Hz, **H{7ax}**)
 - with 1.87 (ddd, 2H, ²J_{6ax-6eq} = 13.8 Hz, ³J_{6ax-7ax} = 10.5 Hz, ³J_{6ax-7eq} = 4.5 Hz, **H{6ax}**)
 - and with 1.50 (d, 2H, ²J_{6eq-6ax} = 13.4 Hz, **H{6eq}**)
- 3.63 (ddd, 2H, ²J_{7ax-7eq} = 11.8 Hz, ³J_{7ax-6ax} = 10.6 Hz, ³J_{7ax-6eq} = 2.7 Hz, **H{7ax}**) coupled:
 - with 9.02 (s, **NH**)
 - with 3.83 (dt, 2H, ²J_{7eq-7ax} = 11.8 Hz, ³J_{7eq-6ax} = ³J_{7eq-6eq} = 4.2 Hz, **H{7eq}**)
 - and with 1.50 (d, 2H, ²J_{6eq-6ax} = 13.4 Hz, **H{6eq}**)
- 1.50 (d, 2H, ²J_{6eq-6ax} = 13.4 Hz, **H{6eq}**) coupled:
 - with 1.87 (ddd, 2H, ²J_{6ax-6eq} = 13.8 Hz, ³J_{6ax-7ax} = 10.5 Hz, ³J_{6ax-7eq} = 4.5 Hz, **H{6ax}**)

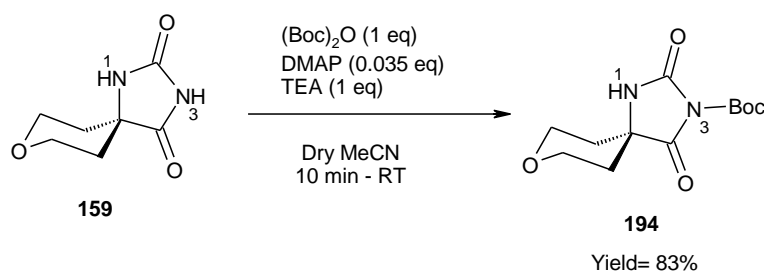
Partie expérimentale

- with 3.63 (ddd, 2H, $^2J_{7ax-7eq} = 11.8$ Hz, $^3J_{7ax-6ax} = 10.6$ Hz, $^3J_{7ax-6eq} = 2.7$ Hz, **H{7ax}**)
- with 3.83 (dt, 2H, $^2J_{7eq-7ax} = 11.8$ Hz, $^3J_{7eq-6ax} = ^3J_{7eq-6eq} = 4.2$ Hz, **H{7eq}**)
- and with 9.02 (s, **NH**)

• 9.02 (s, **NH**) coupled:

- with 3.63 (ddd, 2H, $^2J_{7ax-7eq} = 11.8$ Hz, $^3J_{7ax-6ax} = 10.6$ Hz, $^3J_{7ax-6eq} = 2.7$ Hz, **H{7ax}**)
- and with 1.50 (d, 2H, $^2J_{6eq-6ax} = 13.4$ Hz, **H{6eq}**)

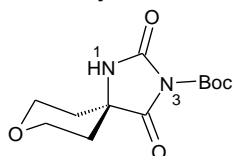
HRMS (TOF, ES⁺) m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₀H₁₃N₂O₃ 209.0926, found 209.0920



Synthesis of the tert-butyl 2,4-dioxo-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-3-carboxylate (**194**)

To a suspension of **159** (1 eq) in MeCN (C = 0.2 M) were added DMAP (0.035 eq) and TEA (1 eq). Then a solution of di-tert-butyl dicarbonate (1 eq) in MeCN was added and the solution was stirred at RT for 10 min. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (ether petroleum to ether petroleum/EtOAc 60/40) to afford tert-butyl 2,4-dioxo-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-3-carboxylate (**194**) as a white solid (580 mg, 83%).

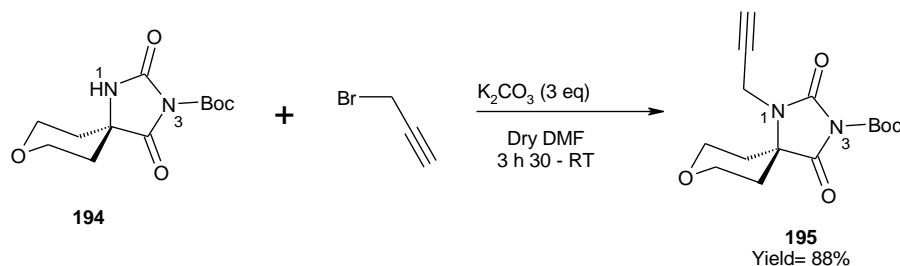
Tert-butyl 2,4-dioxo-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-3-carboxylate (**194**)



White solid
 580 mg – 83%
 $t_R = 2.05$ min (run 5 min)
 MS [M+H]⁺ $m/z = 271$
 Purity (215 nm) 98%

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 9.18 (s, NH), 3.79 (dt, $J = 11.9$ Hz, $J = 4.2$ Hz, 2H), 3.60 (ddd, $J = 11.6$ Hz, $J = 10.6$ Hz, $J = 2.7$ Hz, 2H), 1.87 (ddd, $J = 13.6$ Hz, $J = 10.6$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 2H), 1.58 (d, $J = 13.5$ Hz, 2H), 1.48 (s, 9H)

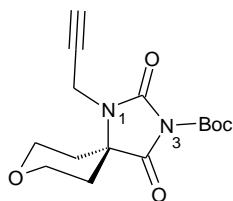
Partie expérimentale



Synthesis of the tert-butyl 2,4-dioxo-1-prop-2-ynyl-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-3-carboxylate (**195**)

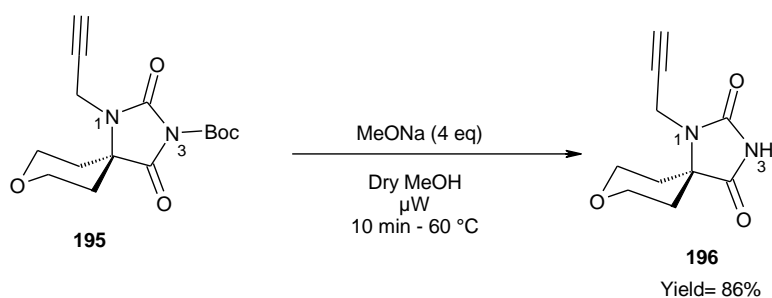
To a suspension of **194** (1 eq) and potassium carbonate (3 eq) in dry DMF was added propargyl bromide (3 eq). The solution was stirred at RT for 3 h 30. The solvent was removed under reduced pressure. DCM was added and the residue was purified by flash chromatography (ether petroleum to ether petroleum/EtOAc 60/40) to afford tert-butyl 2,4-dioxo-1-prop-2-ynyl-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-3-carboxylate (**195**) as a white solid (580 mg, 88%).

Tert-butyl 2,4-dioxo-1-prop-2-ynyl-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-3-carboxylate (**195**)



White solid
580 mg – 88%
 $t_R = 2.42$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 309$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 4.16 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 3.87 - 3.81 (m, 4H), 3.25 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H), 2.11 (ddd, $J = 13.8$ Hz, $J = 10.4$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 1H), 1.79 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 1.49 (s, 9H)

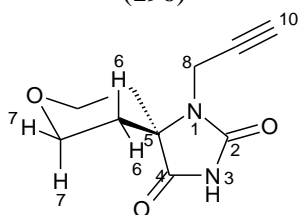


Synthesis of the 1-prop-2-ynyl-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**196**)

To a suspension of **195** (1 eq) in MeOH was added sodium methoxide (4 eq). The solution was heated under microwave irradiation for 10 min at 60 °C. DCM was added and the mixture was acidified by adding solution of HCl 1 M. The aqueous layer was extracted three times with DCM. The organic layer was combined, washed with brine, dried over MgSO_4 and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (ether petroleum to ether petroleum/EtOAc 65/35) to give 1-prop-2-ynyl-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (**196**) as a white solid (270 mg, 86%).

Partie expérimentale

1-Prop-2-ynyl-8-oxa-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (196)



White solid
270 mg – 86%
 $t_R = 1.53$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 209$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 11.02 (s, NH{3}), 4.09 (d, 2H, $^4J_{8-10} = 2.6$ Hz, H{8}), 3.91 (td, 2H, $^2J_{7ax-7eq} = ^3J_{7ax-6ax} = 11.7$ Hz, $^3J_{7ax-6eq} = 2.1$ Hz, H{7ax}), 3.80 (dd, 2H, $^2J_{7eq-7ax} = 10.9$ Hz, $^3J_{7eq-6ax} = 4.7$ Hz, H{7eq}), 3.19 (t, 1H, $^4J_{10-8} = 2.4$ Hz, H{10}), 2.10 (ddd, 2H, $^2J_{6ax-6eq} = 13.6$ Hz, $^3J_{6ax-7ax} = 12.2$ Hz, $^3J_{6ax-7eq} = 5.5$ Hz, H{6ax}), 1.65 (d, 2H, $^2J_{6eq-6ax} = 12.9$ Hz, H{6eq})

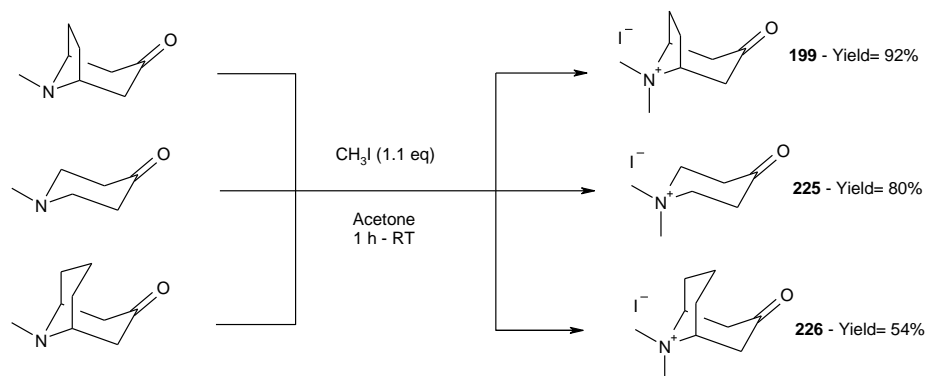
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 177.2, 155.2, 80.9, 74.0, 62.9, 61.1, 31.1, 27.4

$^1\text{H-NMR}$ 1D-NOESY (DMSO- d_6): δ (ppm)

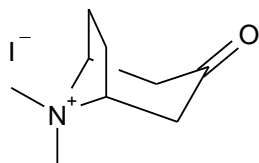
- 11.02 (s, NH{3}) no coupled
- 4.09 (d, 2H, $^4J_{8-10} = 2.6$ Hz, H{8}) coupled:
 - with 2.10 (ddd, 2H, $^2J_{6ax-6eq} = 13.6$ Hz, $^3J_{6ax-7ax} = 12.2$ Hz, $^3J_{6ax-7eq} = 5.5$ Hz, H{6ax})

HRMS (TOF, ES^+) m/z $[M+H]^+$ calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3$ 209.0926, found 209.0920

IV. Chapter III: synthesis of compounds 198 to 249

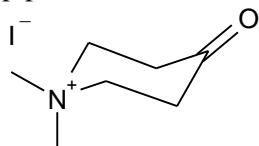
*Synthesis of the final products 198, 200 to 224, and 227 to 231**Intermediates 199, 227 and 228*General procedure for the synthesis of the compounds **199**, **225** and **226**

The corresponding cyclic ketone (1 eq) was dissolved in acetone ($C = 1 \text{ M}$) under stirring. Methyl iodide (1.1 eq) was added dropwise. Reaction mixture was stirred at RT for 1 hour. Precipitate was filtered and washed with acetone and with cyclohexane/ethyl acetate solution (1/1). The resulting solid was dried under reduced pressure to give the desired compound (**199**, **225** and **226**).

8,8-Dimethyl-8-azoniabicyclo[3.2.1]octan-3-one iodide
(**199**)

White solid
5.2 g – 92%
 $t_R = - \text{min}$
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 154$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 4.17 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 2.97 (m, 2H), 2.65 (m, 2H), 2.50 (m, 2H), 1.95 (m, 2H)

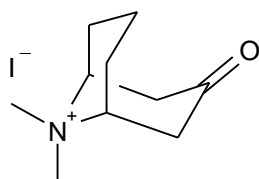
1,1-Dimethylpiperidin-1-ium-4-one iodide (**225**)

White solid
800 mg – 80%
 $t_R = - \text{min}$
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 128$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 3.74 (t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H), 3.36 – 3.33 (m, 1H), 3.32 (s, 3H), 3.26 (s, 3H), 2.72 – 2.68 (m, 2H), 1.89 – 1.84 (m, 3H)

Partie expérimentale

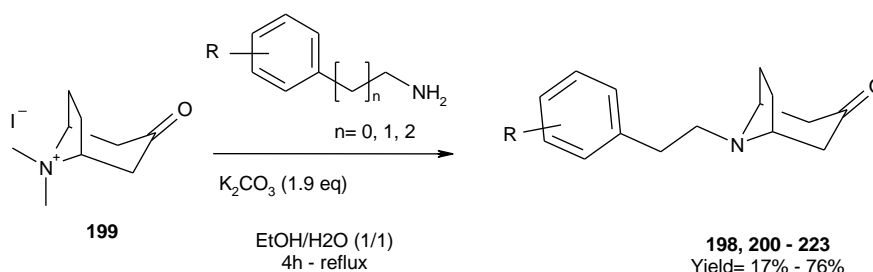
9,9-Dimethyl-9-azoniabicyclo[3.3.1]nonan-3-one iodide (226)



White solid
2.8 g – 54%
 $t_R = -$ min
MS $[M+H]^+$ $m/z = 168$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 3.93 - 3.89 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.32 (s, 3H), 3.26 - 3.24 (m, 1H), 2.60 - 2.54 (m, 2H), 2.42 - 2.28 (m, 2H), 1.80 - 1.74 (m, 2H), 1.64 - 1.56 (m, 1H), 1.39 - 1.22 (m, 2H)

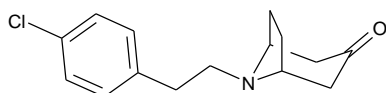
Final products **198**, **200** to **213** and **216** to **224**



General procedure B for the synthesis of the compounds **198**, **200** and **223**

The appropriate amine (1 eq) was dissolved in EtOH ($C = 0.5$ M), potassium carbonate (2.1 eq) dissolved in water ($C = 3$ M) was added. The resulting solution was refluxed. A solution of 8,8-dimethyl-8-azoniabicyclo[3.2.1]octan-3-one iodide (**199**, 1.1 eq) in water ($C = 0.8$ M) was added dropwise. The reaction mixture was refluxed for 4 hours. Heating was then stopped, the solution was reduced under vacuum and the organic layer was extracted with DCM (3x), washed with brine (1x), dried over MgSO_4 and reduced *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography using the appropriate eluent to give the desired product (**198**, **200** to **223**).

8-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**198**)



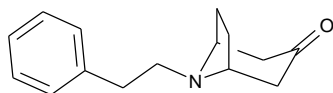
Brown oil
800 mg – 76%
 $t_R = 3.02$ min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 264$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.30 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.58 - 3.53 (m, 2H), 2.88 - 2.79 (m, 4H), 2.63 (dd, $J = 16.0$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 2H), 2.15 (d, $J = 15.8$ Hz, 2H), 2.05 - 2.00 (m, 2H), 1.59 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.4, 139.2, 131.6, 130.2, 128.3, 58.9, 52.1, 47.5, 35.2, 27.8

Partie expérimentale

8-(2-Phenylethyl)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**200**)

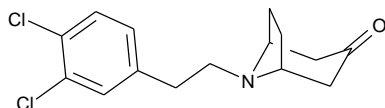


Brown oil
124 mg – 54%
 $t_R = 2.09$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 230$
Purity (215 nm) 96%

1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.34 - 7.19 (m, 5H), 3.61 - 3.55 (m, 2H), 2.91 - 2.80 (m, 4H), 2.66 (dd, $J = 16.0$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 2H), 2.19 - 2.13 (m, 2H), 2.06 - 2.01 (m, 2H), 1.63 - 1.55 (m, 2H)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 204.4, 137.6, 129.3, 129.1, 127.2, 61.0, 52.4, 46.5, 30.8, 25.6

8-[2-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**201**)

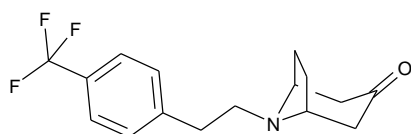


Brown oil
145 mg – 60%
 $t_R = 2.22$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 298$
Purity (215 nm) 97%

1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.41 - 7.39 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.17-7.13 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H), 3.53 (m, 2H), 2.82 (s, 4H), 2.65 - 2.59 (dd, $J = 15.91$ Hz, $J = 4.30$ Hz, 2H), 2.19 - 2.13 (m, 2H), 2.05 - 2.01 (m, 2H), 1.63 - 1.56 (m, 2H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.3, 141.2, 131.8, 130.7, 130.1, 129.7, 128.5, 58.9, 51.9, 47.6, 35.0, 27.8

8-[2-[4-(Trifluoromethyl)phenyl]ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**202**)



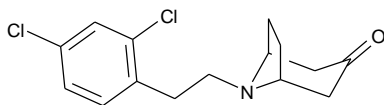
White solid
76 mg – 26%
 $t_R = 3.05$ min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 298$
Purity (215 nm) 98%

1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.59 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 3.58 - 3.54 (m, 2H), 2.97 - 2.91 (m, 2H), 2.88 - 2.83 (m, 2H), 2.64 (dd, $J = 16.0$ Hz, $J = 4.6$ Hz, 2H), 2.17 (d, $J = 16.7$ Hz, 2H), 2.07 - 2.02 (m, 2H), 1.64 - 1.56 (m, 2H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.3, 145.0, 129.2, 128.1 (q, $J = 31.7$ Hz), 125.1 (q, $J = 3.7$ Hz), 124.4 (q, $J = 271.5$ Hz), 58.9, 51.9, 47.5, 35.7, 27.8

Partie expérimentale

8-[2-(2,4-Dichlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**203**)

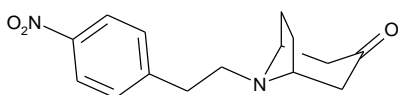


White solid
96 mg – 32%
 $t_R = 3.82$ min (run 10 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 298$
Purity (215 nm) 98%

1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.41 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.23 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.59 - 3.55 (m, 2H), 3.0 - 2.94 (m, 2H), 2.83 - 2.77 (m, 2H), 2.64 (dd, $J = 16.0$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 2H), 2.16 (d, $J = 15.9$ Hz, 2H), 2.06 - 2.01 (m, 2H), 1.58 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.3, 136.8, 134.6, 132.3, 131.9, 129.0, 127.0, 59.0, 50.4, 47.6, 33.1, 27.8

8-[2-(4-Nitrophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**204**)

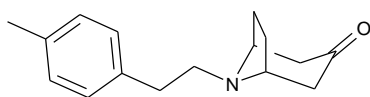


Orange oil
99 mg – 45%
 $t_R = 1.80$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 275$
Purity (215 nm) 98%

1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.17 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.57 - 3.52 (m, 2H), 3.0 - 2.95 (m, 2H), 2.90 - 2.84 (m, 2H), 2.62 (dd, $J = 16.1$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 2H), 2.17 (d, $J = 16.1$ Hz, 2H), 2.06 - 2.00 (m, 2H), 1.58 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.2, 148.7, 129.7, 123.4, 121.1, 59.0, 61.7, 47.6, 35.6, 27.8

8-[2-(p-Tolyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**205**)



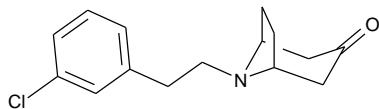
Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 8/2
Brown oil
115 mg – 59%
 $t_R = 1.78$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 244$
Purity (215 nm) 98%

1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.17 - 7.10 (m, 4H), 3.58 - 3.45 (m, 2H), 2.95 - 2.82 (m, 4H), 2.69 (dd, $J = 16$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.18 - 2.12 (m, 2H), 2.06 - 2.00 (m, 2H), 1.62 - 1.55 (m, 2H)

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.5, 137.4, 135.6, 128.9, 128.6, 58.8, 52.4, 47.3, 35.4, 27.9, 20.7

Partie expérimentale

8-[2-(3-Chlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one
(**206**)

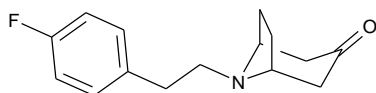


Flash chromatography: cHex to cHex/[EtOAc-EtOH 3-1] 8/2
Yellow oil
40 mg – 17%
 $t_R = 1.97$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 264$
Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.28 - 7.14 (m, 4H), 3.54 - 3.52 (m, 2H), 2.95 - 2.81 (m, 4H), 2.65 - 2.58 (m, 2H), 2.16 - 2.11 (m, 2H), 2.03 - 1.99 (m, 2H), 1.61 - 1.53 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.4, 142.8, 133.8, 129.6, 128.8, 127.1, 126.1, 58.9, 52.1, 47.5, 35.6, 27.8

8-[2-(4-Fluorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one
(**207**)

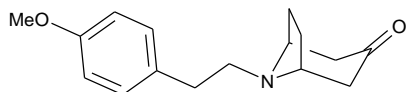


Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 6/4
Brown oil
125 mg – 51%
 $t_R = 2.15$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 248$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.25 (dd, $J = 5.6$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.0 (t, $J = 9$ Hz, 2H), 3.57 - 3.54 (m, 2H), 2.88 - 2.77 (m, 4H), 2.63 (dd, $J = 16.0$ Hz, $J = 4.6$ Hz, 2H), 2.16 (d, $J = 15.7$ Hz, 2H), 2.06 - 2.00 (m, 2H), 1.63 - 1.55 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 206.4, 165.8 (d, $J = 245.5$ Hz), 133.8 (d, $J = 20$ Hz), 129.4, 127.8, 58.7, 52.9, 44.6, 32.8, 25.6

8-[2-(4-Methoxyphenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one
(**208**)



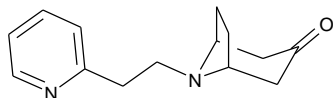
Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 8/2
Brown oil
153 mg – 59%
 $t_R = 1.53$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 260$
Purity (215 nm) 97%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.20 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.61 - 3.56 (m, 2H), 2.81 (s, 4H), 2.66 (dd, $J = 15.8$ Hz, $J = 4.3$ Hz, 2H), 2.17 (d, $J = 15.6$ Hz, 2H), 2.08 - 2.0 (m, 2H), 1.60 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.6, 158.0, 132.5, 129.6, 113.6, 58.8, 55.1, 52.5, 47.4, 35.0, 27.9

8-[2-(2-Pyridyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (209)



Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 3/7

Brown oil

125 mg – 54%

$t_R = 1.27$ min (run 5 min)

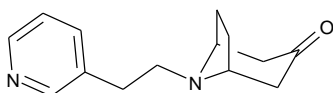
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 231$

Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.51 (ddd, $J = 4.8$ Hz, $J = 1.8$ Hz, $J = 0.9$ Hz, 1H), 7.63 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.25 (td, $J = 7.8$ Hz, $J = 0.9$ Hz, 1H), 7.15 (ddd, $J = 7.5$ Hz, $J = 4.9$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 3.57 - 3.54 (m, 2H), 3.07 - 2.96 (m, 4H), 2.65 (dd, $J = 16$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 2H), 2.17 - 2.01 (m, 4H), 1.62 - 1.54 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.7, 160.4, 149.1, 136.2, 123.4, 121.2, 58.8, 50.3, 47.4, 38.1, 27.8

8-[2-(3-Pyridyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (210)



Flash chromatography: cHex to cHex/[EtOAc-EtOH 3-1] 6/4

Brown oil

151 mg – 66%

$t_R = 2.20$ min (run 5 min)

MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 231$

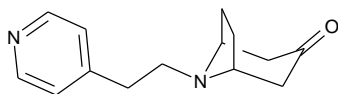
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.51 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.45 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.61 (dt, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.24 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.62 - 3.56 (m, 2H), 2.85 (s, 4H), 2.64 (dd, $J = 15.4$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 2H), 2.2 - 2.14 (m, 2H), 2.06 - 2.02 (m, 2H), 1.64 - 1.56 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 208.9, 150.1, 147.5, 136.2, 135.7, 123.2, 59.0, 51.9, 47.5, 32.7, 27.7

Partie expérimentale

8-[2-(4-Pyridyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one
(**211**)



Flash chromatography: cHex to cHex/[EtOAc-EtOH 3-1] 75/25

Brown solid

148 mg – 64%

$t_R = 1.07$ min (run 5 min)

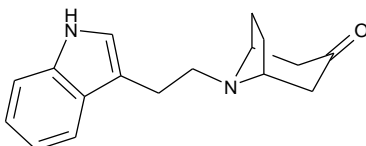
MS $[M+H]^+$ $m/z = 231$

Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.49 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H), 3.57 - 3.52 (m, 2H), 2.86 (s, 4H), 2.66 - 2.59 (dd, $J = 15.9$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 2H), 2.19 - 2.13 (m, 2H), 2.06 - 2.01 (m, 2H), 1.63 - 1.56 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.3, 149.5, 133.3, 124.2, 58.9, 51.2, 47.6, 35.1, 27.8

8-[2-(1H-Indol-3-yl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one
(**212**)



Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 6/4

White solid

152 mg – 57%

$t_R = 2.70$ min (run 10 min)

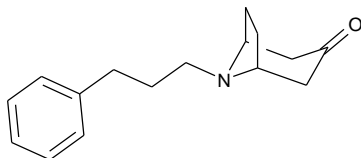
MS $[M+H]^+$ $m/z = 269$

Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.20 (brs, NH), 7.64 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.40 (dt, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.19 (td, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.14 - 7.09 (m, 2H), 3.38 - 3.34 (m, 2H), 3.07 - 3.0 (m, 2H), 2.94 (td, $J = 6.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 2H), 2.70 (dd, $J = 16.1$ Hz, $J = 4.3$ Hz, 2H), 2.18 (d, $J = 16.1$ Hz, 2H), 2.09 - 2.04 (m, 2H), 1.61 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.9, 144.6, 136.4, 127.6, 121.9, 119.3, 118.8, 114.4, 111.2, 58.9, 51.2, 47.5, 28.1, 25.4

8-(3-Phenylpropyl)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**213**)



Flash chromatography: cHex to cHex/[EtOAc-EtOH 4-1] 9/1

Brown oil

142 mg – 58%

$t_R = 2.47$ min (run 10 min)

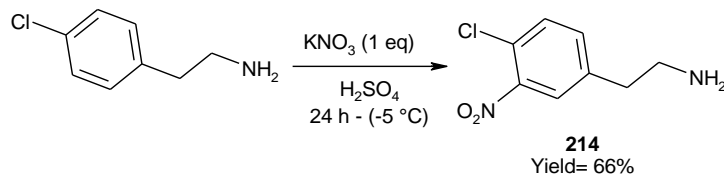
MS $[M+H]^+$ $m/z = 244$

Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.33 - 7.17 (m, 5H), 3.56 - 3.50 (m, 2H), 2.77 - 2.72 (m, 2H), 2.63 - 2.58 (m, 2H), 2.62 (dd, $J = 16.0$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 2H), 2.14 (d, $J = 16.1$ Hz, 2H), 2.04 - 1.99 (m, 2H), 1.87 (quint, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.57 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H)

Partie expérimentale

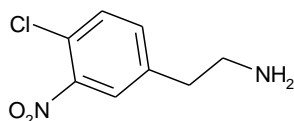
^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.7, 142.5, 128.4, 128.2, 125.7, 58.6, 49.4, 47.4, 33.4, 30.8, 27.9



Synthesis of the 2-(4-chloro-3-nitro-phenyl)ethyl amine (**214**)

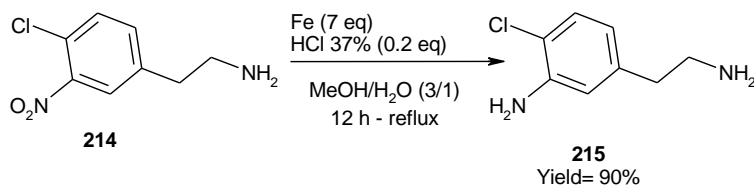
2-(4-chlorophenyl)ethyl amine (1 eq) was stirred in sulfuric acid ($C = 0.1 \text{ M}$) at RT until all the solid dissolved. The resulting solution was cooled between -10 and $-5 \text{ }^\circ\text{C}$ (ice with EtOH). Potassium nitrate (1 eq) was added portion wise, making sure that temperature did not go above -5°C . The reaction mixture was stirred at this temperature for 24 hours. It was then poured into ice, basified with a solution of NaOH 3 M and extracted with DCM. The organic layers were washed with brine (1x), dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (DCM to 97/3 DCM/MeOH 0.5% NH_3) to give 2-(4-chloro-3-nitro-phenyl)ethanamine (**214**) as a brown oil (237 mg, 66%).

2-(4-Chloro-3-nitro-phenyl)ethyl amine (**214**)



Brown oil
237 mg – 66%
 $t_R = 2.50 \text{ min}$ (run 10 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 201$
Purity (215 nm) 98%

^1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.76 (d, $J = 2.1 \text{ Hz}$, 1H), 7.51 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H), 7.42 (dd, $J = 8.4 \text{ Hz}$, $J = 2.1 \text{ Hz}$, 1H), 2.98 (t, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 2H), 2.80 (t, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 2H)

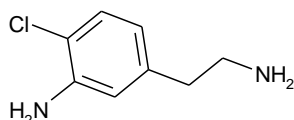


Synthesis of the 5-(2-aminoethyl)-2-chloro-aniline (**215**)

To a solution of 2-(4-chloro-3-nitrophenyl)ethyl amine (**214**, 1 eq) in a mixture of MeOH and H_2O (3/1, $C = 0.4 \text{ M}$), HCl 37% (0.2 eq) and iron (7 eq) were added. The solution was refluxed overnight. The reaction was monitored by TLC. At the end of the reaction, the solution was cooled to RT and filtered through Celite, washed with MeOH. The filtrate was then concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in water and basified with 3 M NaOH solution. The aqueous solution was extracted with EtOAc. The combined organic fractions were dried over MgSO_4 and concentrated under reduce pressure to give 5-(2-aminoethyl)-2-chloro-aniline as a brown oil (180 mg, 90%) which was used for the next step without further purification.

Partie expérimentale

5-(2-Aminoethyl)-2-chloro-aniline (**215**)

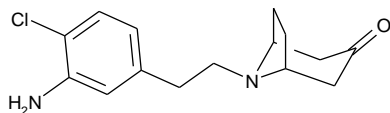


Brown oil
 180 mg – 90%
 $t_R = 1.37$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 171$
 Purity (215 nm) 85%

No NMR was carried out due to the purity < 85%.

The synthesis of the final compound **216** was performed following the general procedure **B** with 5-(2-aminoethyl)-2-chloro-aniline (**215**) and 8,8-dimethyl-8-azoniabicyclo[3.2.1]octan-3-one iodide (**199**) as starting materials. The residue was purified by flash preparative HPLC to afford 8-[2-(3-amino-4-chloro-phenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**216**) as a white solid (107 mg, 65%).

8-[2-(3-amino-4-chloro-phenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**216**)

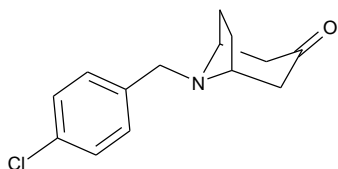


White solid
 107 mg – 65%
 $t_R = 2.42$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 279$
 Purity (215 nm) 96%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.16 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.60 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H), 4.07 (brs, NH_2), 3.58 - 3.53 (m, 2H), 2.83 - 2.71 (m, 4H), 2.64 (dd, $J = 16.2$ Hz, $J = 4.6$ Hz, 2H), 2.15 (dd, $J = 17.1$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 2H), 2.06 - 2.0 (m, 2H), 1.58 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.5, 142.9, 140.4, 129.0, 119.3, 116.6, 116.1, 58.8, 52.1, 47.4, 35.4, 27.8

8-[(4-Chlorophenyl)methyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**217**)



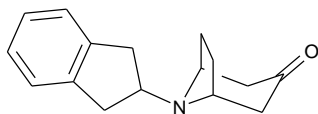
Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 85/15
 Brown oil
 120 mg – 48%
 $t_R = 1.83$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 250$
 Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.50 - 3.46 (m, 2H), 2.68 (dd, $J = 15.7$ Hz, $J = 4.6$ Hz, 2H), 2.22 - 2.10 (m, 4H), 1.64 - 1.61 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.4, 138.4, 132.4, 129.8, 128.3, 58.7, 54.4, 48.2, 27.7

Partie expérimentale

8-Indan-2-yl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**218**)

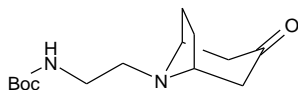


Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 8/2
 White solid
 90 mg – 37%
 $t_R = 1.72$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 242$
 Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.25 - 7.21 (m, 2H), 7.20 - 7.16 (m, 2H), 3.76 - 3.71 (m, 2H), 3.64 (tt, $J = 9.1$ Hz, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.18 (dd, $J = 14.6$ Hz, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.96 (dd, $J = 15$ Hz, $J = 9.2$ Hz, 2H), 2.74 (dd, $J = 16.1$ Hz, $J = 4.2$ Hz, 2H), 2.23 - 1.69 (m, 2H), 2.12 - 2.06 (m, 2H), 1.65 - 1.62 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.3, 141.8, 126.4, 124.4, 58.5, 57.5, 46.5, 39.1, 28.3

Tert-butyl N-[2-(3-oxo-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-yl)ethyl]carbamate (**219**)

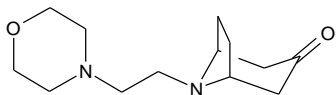


Flash chromatography: cHex to cHex/[EtOAc-EtOH 3-1] 8/2
 Brown oil
 96 mg – 36%
 $t_R = 1.53$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 269$
 Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 3.53 - 3.50 (m, 2H), 3.25 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.68 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.63 (dd, $J = 15.9$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 2H), 2.17 (d, $J = 16.0$ Hz, 2H), 2.05 - 2 (m, 2H), 1.60 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 1.46 (s, 9H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.2, 155.8, 78.7, 58.8, 50.1, 47.8, 39.2, 28.1, 27.7

8-(2-Morpholinoethyl)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**220**)



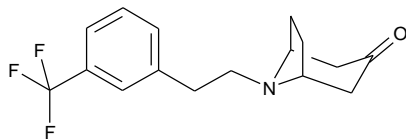
Flash chromatography: cHex to cHex/[EtOAc-EtOH 3-1] 8/2
 Brown oil
 82 mg – 34%
 $t_R = 0.37$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 239$
 Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 3.67 (t, $J = 4.65$, 4H), 3.58 - 3.54 (m, 2H), 2.75 - 2.48 (m, 10H), 2.17 - 2.11 (m, 2H), 2.05 - 2.00 (m, 2H), 1.61 - 1.54 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.4, 66.9, 59.2, 58.5, 54.2, 47.7, 47.4, 27.8

Partie expérimentale

8-[2-[3-(Trifluoromethyl)phenyl]ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**221**)



Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 75/25

Brown oil

100 mg – 25%

$t_R = 3.40$ min (run 10 min)

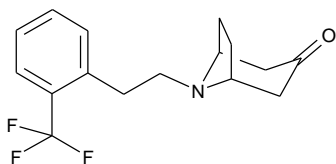
MS $[M+H]^+$ $m/z = 298$

Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.56 (s, 1H), 1.53 - 7.43 (m, 3H), 3.58 - 3.54 (m, 2H), 3.0 - 2.91 (m, 2H), 2.88 - 2.83 (m, 2H), 2.64 (dd, $J = 16.1$ Hz, $J = 4.1$ Hz, 2H), 2.16 (d, $J = 16.1$ Hz, 2H), 2.07 - 2.01 (m, 2H), 1.58 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.2, 141.6, 132.4, 130.2 (q, $J = 31.6$ Hz), 128.7, 125.5 (q, $J = 3.7$ Hz), 124.4 (q, $J = 272$ Hz), 122.8 (q, $J = 3.8$ Hz), 58.9, 52.0, 47.5, 35.6, 27.8

8-[2-[2-(Trifluoromethyl)phenyl]ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**222**)



Flash chromatography: cHex to cHex/[EtOAc-EtOH 3-1] 9/1

Orange oil

100 mg – 25%

$t_R = 2.15$ min (run 5 min)

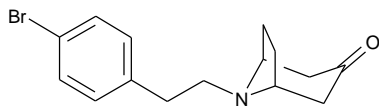
MS $[M+H]^+$ $m/z = 298$

Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.67 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.54 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.36 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 3.63 – 3.57 (m, 2H), 3.08 – 3.03 (m, 2H), 2.85 – 2.79 (m, 2H), 2.65 (dd, $J = 16.1$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 2H), 2.18 (dd, $J = 17.1$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 2H), 2.07 – 2.00 (m, 2H), 1.6 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.4, 138.9, 131.8, 131.7, 128.3 (q, $J = 29.9$ Hz), 126.3, 125.9 (q, $J = 4.7$ Hz), 124.6 (q, $J = 274.0$ Hz), 59.0, 52.4, 47.6, 32.7, 27.8

8-[2-(4-Bromophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**223**)



Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 8/2

Brown solid

197 mg – 64%

$t_R = 2.03$ min (run 5 min)

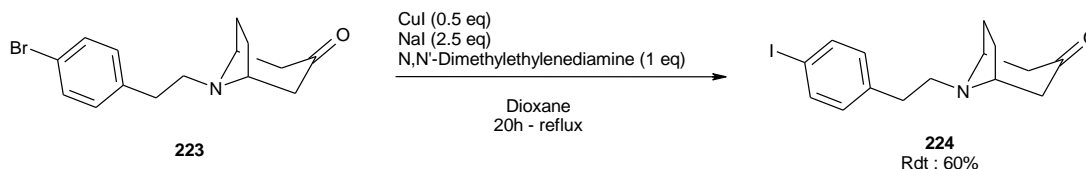
MS $[M+H]^+$ $m/z = 308$

Purity (215 nm) 98%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.44 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.18 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.56 - 3.53 (m, 2H), 2.86 - 2.82 (m, 4H), 2.63 (dd, $J = 15.9$ Hz, $J = 4.3$ Hz, 2H), 2.19 - 2.12 (m, 2H), 2.05 - 2.01 (m, 2H), 1.62 - 1.55 (m, 2H)

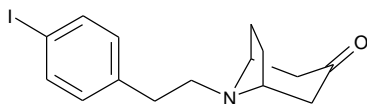
$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 208.5, 139.8, 131.7, 130.9, 119.7, 59.0, 52.2, 47.4, 35.3, 27.8



Synthesis of the 8-[2-(4-iodophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**224**)

8-[2-(4-bromophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**223**, 1 eq), copper iodide (0.5 eq), sodium iodide (2.5 eq) were added to a schlenk tube, evacuated and backfilled with argon. Under argon atmosphere, *N,N'*-dimethylethylenediamine (1 eq) in dry 1,4-dioxane ($C = 0.2$ M) was added using a syringe. The reaction heated to 110°C under argon atmosphere for 4 hours. The mixture was cooled to RT and poured into water. The resulting solution was extracted with DCM (3x) and the combined organic layers were dried over MgSO_4 and concentrated under reduce pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (cHex to cHex/EtOAc 6/4) to afford 8-[2-(4-iodophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**224**) as an orange oil (104 mg, 60%).

8-[2-(4-Iodophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one
(**224**)



Orange oil
 104 mg – 60%
 $t_R = 2.15$ min (run 5 min)
 MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 356$
 Purity (215 nm) 98%

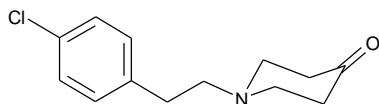
$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.66 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.06 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 3.58 – 3.53 (m, 2H), 2.64 (dd, $J = 15.9$ Hz, $J = 4.1$ Hz, 2H), 2.17 (d, $J = 15.5$ Hz, 2H), 2.06 – 2.01 (m, 2H), 1.60 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.4, 140.4, 137.2, 131.0, 90.9, 58.9, 52.0, 47.5, 35.4, 27.8

Partie expérimentale

The synthesis of the final product **227** was carried out following the general procedure **B** with the 1,1-dimethylpiperidin-1-ium-4-one iodide (**225**) as starting material.

1-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]piperidin-4-one (**227**)



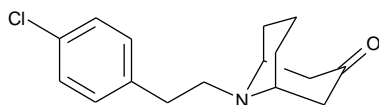
Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 7/3
Yellow solid
132 mg – 57%
 $t_R = 1.77$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 238$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 2.85 - 2.68 (m, 8H), 2.43 (t, $J = 6.3$ Hz, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 208.5, 139.1, 131.6, 130.1, 128.3, 58.7, 53.1, 41.2, 33.2

The synthesis of the final products **228** to **231** was performed following the general procedure **B** with the 9,9-dimethyl-9-azoniabicyclo[3.3.1]nonan-3-one iodide (**226**) as starting material.

9-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-one (**228**)

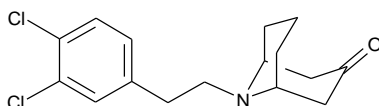


Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 8/2
Brown oil
190 mg – 69%
 $t_R = 1.95$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 278$
Purity (215 nm) 97%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.40 - 3.35 (m, 2H), 2.95 - 2.90 (m, 2H), 2.80 - 2.75 (m, 2H), 2.66 (dd, $J = 16.4$ Hz, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.20 (d, $J = 16.6$ Hz, 2H), 1.94 - 1.82 (m, 2H), 1.57 - 1.41 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 210.7, 139.4, 131.5, 130.3, 128.2, 54.5, 54.2, 42.6, 34.7, 29.7, 16.6

9-[2-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-one (**229**)



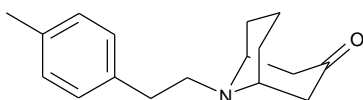
Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 8/2
Brown oil
36 mg – 12%
 $t_R = 2.70$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 312$
Purity (215 nm) 97%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.41 (s, 1H), 7.4 (d, $J=9.4$ Hz, 1H), 7.14 (dd, $J=2$ Hz, $J=8.3$ Hz, 1H), 3.33 - 3.31 (m, 2H), 2.93 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J=7.34$ Hz, 2H), 2.65 (dd, $J=6.7$ Hz, $J=16.6$ Hz, 2H), 2.20 (d, $J=16.7$ Hz, 2H), 1.93 - 1.82 (m, 2H), 1.58 - 1.42 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 210.5, 141.3, 131.7, 130.8, 131.0, 129.6, 128.6, 54.3, 54.1, 42.6, 34.4, 29.6, 16.5

9-[2-(p-Tolyl)ethyl]-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-one
(**230**)



Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 85/15

Brown oil

172 mg – 67%

$t_R = 2.34$ min (run 5 min)

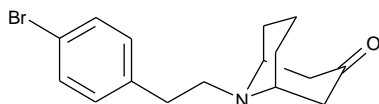
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 258$

Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.18 - 7.11 (m, 4H), 3.30 - 3.38 (m, 2H), 2.93 (dd, $J = 9.0$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H), 2.90 (dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 1H), 2.79 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 2.77 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 2.69 (dd, $J = 16.5$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.20 (d, $J = 16.6$ Hz, 2H), 1.99 - 1.86 (m, 2H), 1.60 - 1.45 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 210.8, 137.5, 135.5, 128.9, 128.6, 55.0, 54.2, 42.5, 34.9, 29.8, 20.7, 16.6

9-[2-(4-Bromophenyl)ethyl]-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-one
(**231**)



Flash chromatography: cHex to cHex/EtOAc 82/18

Brown oil

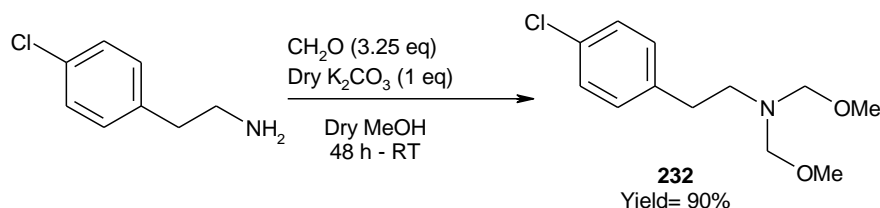
8 mg – 2%

$t_R = 2.55$ min (run 5 min)

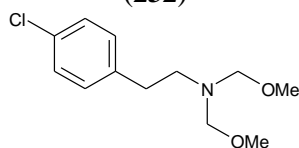
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 322$

Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.50 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 3.70 (s, 2H), 3.23 - 3.10 (m, 5H), 2.44 - 2.39 (m, 2H), 2.14 (s, 2H), 1.72 - 1.67 (m, 5H)

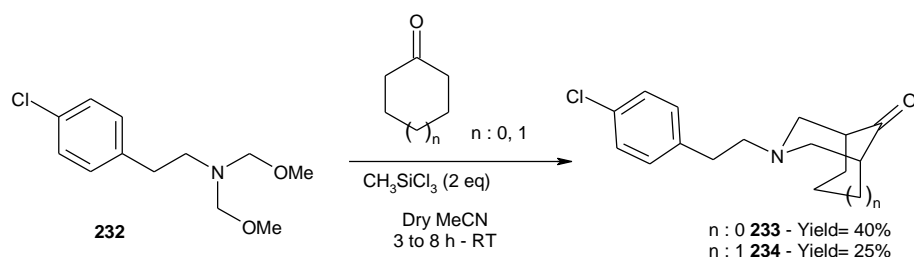
Synthesis of the final products 233 and 234**Intermediate 232****Synthesis of the 2-(4-chlorophenyl)-*N,N*-bis(methoxymethyl)ethanamine (232)**

Anhydrous K_2CO_3 (1 eq) was added to a mixture of anhydrous MeOH ($C = 2$ M) and paraformaldehyde (3.25 eq). Then, 2-(4-chlorophenyl)ethanamine (1 eq) was added over a period of 30 minutes and the resulting mixture was stirred for 48 hours at RT. The crude reaction was filtered to remove all solids and the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was suspended in anhydrous DCM and filtered. The filtrate was evaporated under vacuum to afford the desired compound 2-(4-chlorophenyl)-*N,N*-bis(methoxymethyl)ethanamine (**232**) as a colorless oil (2.2 g, 90%).

2-(4-Chlorophenyl)-*N,N*-bis(methoxymethyl)ethanamine (232)

Colorless oil
2.2 g – 90%

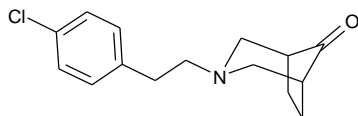
1H -NMR (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.27 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.19 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 4.24 (s, 4H), 3.20 (s, 6H), 3.11 – 3.06 (m, 2H), 2.83 – 2.78 (m, 2H)

Final products 233 and 234**General procedure for the synthesis of the final products 233 and 234**

To a mixture of the appropriate cyclic ketone (cyclopentanone or cyclohexanone, 1 eq) and 2-(4-chlorophenyl)-*N,N*-bis(methoxymethyl)ethanamine (**232**, 2 eq) in anhydrous MeCN ($C = 1$ M) was added trichloromethylsilane (2 eq). The mixture was stirred at RT for 3 to 8 hours and then was quenched with $NaHCO_{3aq}$ and extracted with EtOAc (3x). The combined organic layers were washed with brine (1x), dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography to give the desired final product (**233** and **234**).

Partie expérimentale

3-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-3-azabicyclo[3.2.1]octan-8-one (**233**)

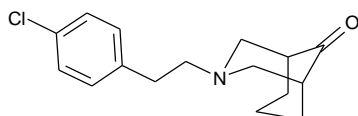


Flash chromatography: cHex to cHex/DCM/EtOAc 8/1/1
 Yellow oil
 40 mg – 40%
 $t_R = 1.75$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 264$
 Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.29 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.06 - 3.01 (m, 2H), 2.81 - 2.75 (m, 2H), 2.72 - 2.67 (m, 2H), 2.56 (d, $J = 10.4$ Hz, 2H), 2.15 - 2.10 (m, 2H), 1.92 - 1.86 (m, 2H), 1.84 - 1.78 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 220.0, 139.7, 132.0, 130.1, 128.2, 61.8, 56.7, 45.4, 33.1, 22.6

3-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-3-azabicyclo[3.2.1]octan-8-one (**234**)

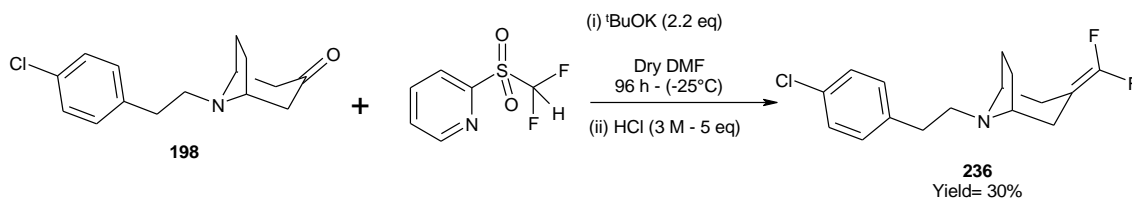


Flash chromatography: petroleum ether to petroleum ether/[DCM-EtOH 3-1] 9/1
 Yellow oil
 45 mg – 25%
 $t_R = 3.47$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 278$
 Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.30 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 3.23 (dd, $J = 12.6$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 2H), 2.81 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.65 - 2.51 (m, 5H), 2.33 - 2.29 (m, 2H), 2.14 - 2.06 (m, 2H), 2.04 - 1.91 (m, 2H), 1.41 - 1.33 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 217.9, 139.6, 131.9, 130.1, 128.2, 60.3, 58.4, 48.0, 34.8, 33.1, 20.9

Synthesis of the final products 236 to 241



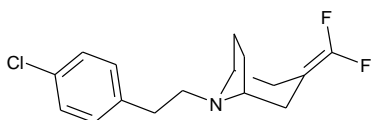
Synthesis of the 8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-3-(difluoromethylene)-8-azabicyclo[3.2.1]octane (**236**)

Under argon atmosphere, potassium tert-butanolate (2.2 eq) dissolved in dry DMF ($C = 0.9$ M) was added to a solution of 8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**198**, 1.2 eq) and 2-(difluoromethylsulfonyl)pyridine (1 eq) in dry DMF ($C = 0.25$ M) at -50 °C. The reaction mixture was allowed to warm up to -25 °C. The mixture was stirred for 4 days at -25 °C. Then, the reaction mixture was quenched with aqueous saturated ammonium chloride ($C = 0.5$ M), followed by HCl 3 M ($C = 0.5$ M). The reaction mixture was allowed to warm up to RT. A solution of NaOH 3 M ($C = 0.5$ M) was

Partie expérimentale

added and the product was extracted with DCM (3x). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc 9/1) to give 8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-3-(difluoromethylene)-8-azabicyclo[3.2.1]octane (**236**) as an orange solid (60 mg, 30%).

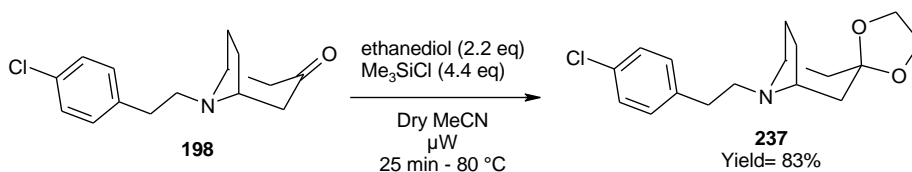
8-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-3-(difluoromethylene)-8-azabicyclo[3.2.1]octane (**236**)



Orange solid
60 mg – 30%
 $t_R = 2.45$ min (run 5 min)
MS [M+H]⁺ $m/z = 298$
Purity (215 nm) 95%

¹H-NMR (CD₂Cl₂): δ (ppm) 7.31 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.54 - 3.46 (m, 2H), 2.97 - 2.92 (m, 2H), 2.79 - 2.74 (m, 2H), 2.53 - 2.49 (m, 2H), 2.16 (dd, $J = 15.2$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 2H), 2.04 - 1.99 (m, 2H), 1.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H)

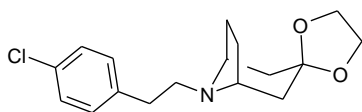
¹³C-NMR (CD₂Cl₂): δ (ppm) 153.3 (t, $J = 288.3$ Hz), 138.3, 131.8, 130.2, 128.4, 81.4 (t, $J = 18.9$ Hz), 59.2, 50.0, 33.8, 29.2, 26.3



Synthesis of the 8'-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]spiro[1,3-dioxolane-2,3'-8-azabicyclo[3.2.1]octane] (**237**)

To a solution of 8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**198**, 1 eq) in dry MeCN (C = 0.15 M) under an argon stream was added ethanediol (2.2 eq) followed by chlorotrimethylsilane (4.4 eq). The reaction mixture was heated under microwave irradiation for 25 minutes at 80 °C. Then a saturated solution of NaHCO₃ was added and the resulting solution was extracted with DCM (3x). The combined organic layer were washed with brine (1x), dried over MgSO₄ and concentrated to dryness to give 8'-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]spiro[1,3-dioxolane-2,3'-8-azabicyclo[3.2.1]octane] (**237**) as a white solid (26 mg, 83%).

8'-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]spiro[1,3-dioxolane-2,3'-8-azabicyclo[3.2.1]octane] (**237**)

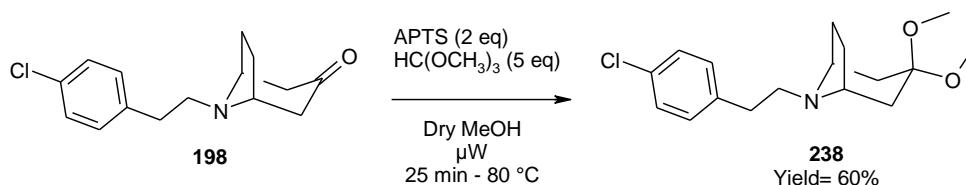


White solid
26 mg – 83%
 $t_R = 2.23$ min (run 5 min)
MS [M+H]⁺ $m/z = 308$
Purity (215 nm) 98%

Partie expérimentale

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.28 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.95 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.79 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.33 - 3.28 (m, 2H), 2.83 - 2.75 (m, 2H), 2.70 - 2.64 (m, 2H), 2.0 - 1.94 (m, 4H), 1.92 - 1.83 (m, 2H), 1.67 (d, $J = 13.6$ Hz, 2H)

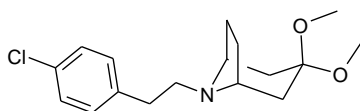
$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 139.4, 131.5, 130.2, 128.2, 107.2, 64.2, 62.9, 58.5, 39.8, 34.9, 29.7, 25.7



Synthesis of the 8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-3,3-dimethoxy-8-azabicyclo[3.2.1]octane (**238**)

Under argon atmosphere, trimethylorthoformate (5 eq) was added to a solution of 8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**198**, 1 eq) and APTS (2 eq) in dry MeOH ($C = 0.5$ M). The reaction mixture was heated under microwave irradiation for 25 minutes at 80°C . Then a saturated solution of NaHCO_3 was added and the resulting solution was extracted with DCM (3x). The combined organic layers were dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (cHex from cHex/[EtOAc-EtOH 3-1] 9/1) to give 8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-3,3-dimethoxy-8-azabicyclo[3.2.1]octane (**238**) as a white solid (83 mg, 60%).

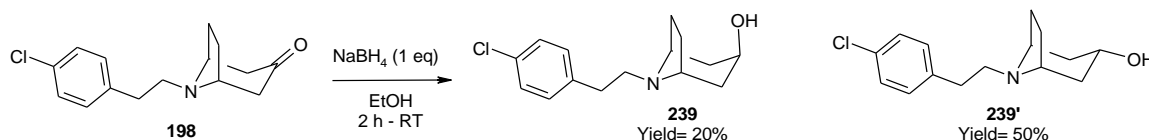
8-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-3,3-dimethoxy-8-azabicyclo[3.2.1]octane (**238**)



White solid
83 mg – 60%
 $t_R = 2.17$ min (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 278$
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.29 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 3.27 - 3.21 (m, 2H), 3.16 (s, 3H), 3.11 (s, 3H), 2.78 - 2.73 (m, 2H), 2.66 - 2.60 (m, 2H), 1.92 - 1.86 (m, 2H), 1.81 - 1.73 (m, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 139.7, 131.3, 130.2, 128.2, 98.9, 57.9, 52.7, 47.9, 46.8, 37.1, 35.2, 25.8



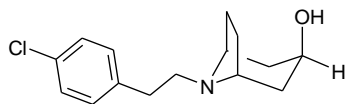
Synthesis of the 8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol (**239** and **239'**)

NaBH_4 (1 eq) was added to a solution of 8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**198**, 1 eq) in EtOH ($C = 0.25$ M). The reaction mixture was stirred at RT for 2 hours. Then, EtOH was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by preparative HPLC (from 10%

Partie expérimentale

MeCN to 35% MeCN for 30 min) to give cis-8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol (**239**) as a white solid (27 mg, 20%) and trans-8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol (**239'**) as a white solid (66 mg, 50%).

Cis-8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol (**239**)

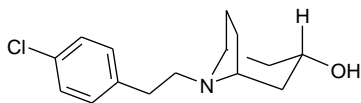


White solid
27 mg – 20%
 $t_R = 2.83$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 266$
Purity (215 nm) 98%

1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 7.33 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.75 (quint, $J = 5.9$ Hz, 1H), 3.43 (s, 2H), 2.81 - 2.69 (m, 4H), 1.92 - 1.88 (m, 2H), 1.73 - 1.66 (m, 2H), 1.59 - 1.52 (m, 4H)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 139.2, 131.5, 131.3, 128.6, 62.1, 59.2, 51.7, 39.0, 33.3, 26.4

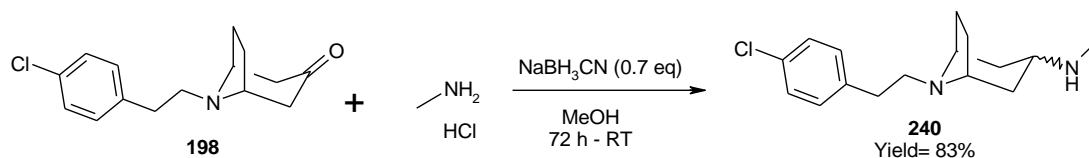
Trans-8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol (**239'**)



White solid
66 mg – 50%
 $t_R = 3.27$ min (run 5 min)
MS $[M+H]^+$ $m/z = 266$
Purity (215 nm) 98%

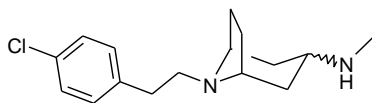
1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 7.33 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.75 (tt, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H), 3.67 - 3.32 (m, 2H), 2.79 - 2.63 (m, 4H), 2.11 - 2.07 (m, 2H), 2.02 - 1.94 (m, 2H), 1.88 - 1.83 (m, 2H), 1.63 - 1.58 (m, 2H)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 139.3, 131.5, 131.2, 128.7, 62.7, 58.8, 53.1, 39.5, 33.4, 25.9



Synthesis of the 8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-N-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-amine (**240**)

A mixture of 8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**198**, 1 eq), methylamine hydrochloride (5 eq) and $NaBH_3CN$ (0.7 eq) in MeOH (C = 0.25 M) was stirred for 72 hours at RT. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in DCM, washed with brine (1x), dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (DCM from DCM/MeOH 96/4) to give 8-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-N-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-amine (**240**) as an orange oil (115 mg, 83%)

8-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-*N*-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-amine (**240**)

Orange oil

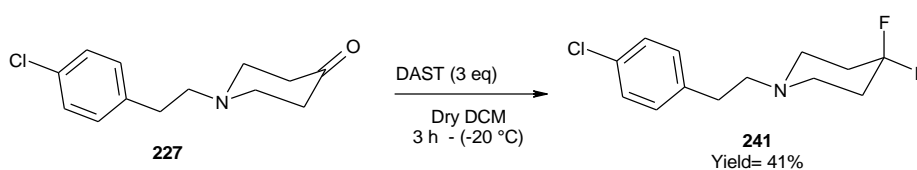
115 mg – 83%

 $t_R = 1.95$ min (run 10 min)MS $[M+H]^+$ $m/z = 279$

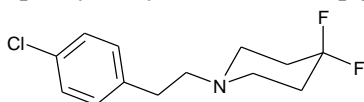
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.29 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 3.18 - 3.13 (m, 2H), 2.75 - 2.68 (m, 3H), 2.58 - 2.52 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.0 - 1.83 (m, 6H), 1.54 - 1.49 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 139.8, 131.3, 130.2, 128.1, 58.6, 54.1, 53.1, 52.7, 35.7, 35.1, 26.5

Synthesis of the 1-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-4,4-difluoro-piperidine (**241**)

To a solution of 1-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]piperidin-4-one (**227**, 1 eq) in dry DCM ($C = 0.8$ M) at -78°C , DAST (3 eq) was added. The reaction mixture was stirred for 3 hours at -20°C . The solution was allowed to come back to RT and then poured in saturated NaHCO_3aq . The resulting solution was extracted with DCM (3x). The combined organic layers were washed with brine (1x), dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether to petroleum ether/EtOAc 96/4) to afford 1-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-4,4-difluoro-piperidine (**241**) as a colorless oil (146 mg, 41%).

1-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-4,4-difluoro-piperidine (**241**)

Colorless oil

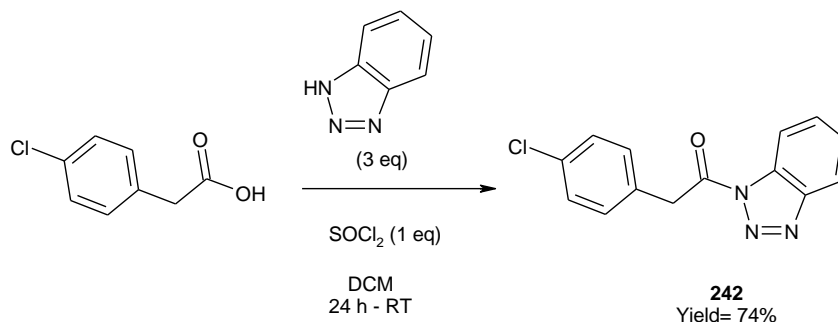
146 mg – 41%

 $t_R = 2.22$ min (run 5 min)MS $[M+H]^+$ $m/z = 260$

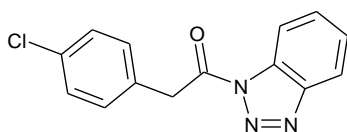
Purity (215 nm) 98%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 2.81 - 2.76 (m, 2H), 2.68 - 2.60 (m, 6H), 2.08 - 1.95 (m, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 139.1, 131.5, 130.1, 128.3, 122.3 (t, $J = 239.4$ Hz), 58.9, 49.9 (t, $J = 5.4$ Hz), 34.0 (t, $J = 22.8$ Hz), 33.0

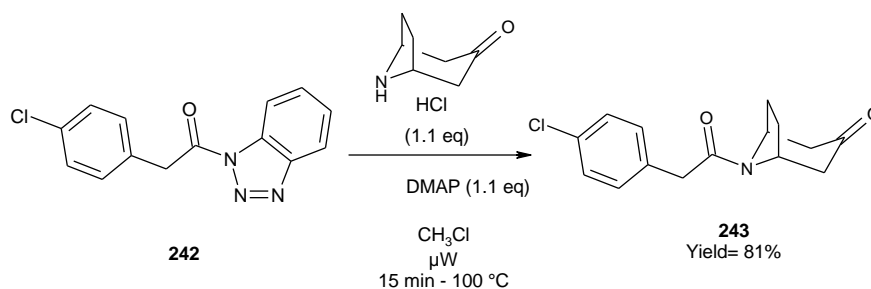
Synthesis of the final products 243, 246 and the intermediate 249**Final product 243****Synthesis of the 1-(benzotriazol-1-yl)-2-(4-chlorophenyl)ethanone (**242**)**

1H-benzotriazole (3 eq) and SOCl₂ (1 eq) in dichloromethane (C = 1 M) were added dropwise to a solution of 2-(4-chlorophenyl)acetic acid (1 eq) in dichloromethane (C = 1 M). The reaction mixture was stirred for 24 hours at RT. The precipitate was filtered off and the filtrate was concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (cHex to cHex/DCM 8/2) to give 1-(benzotriazol-1-yl)-2-(4-chlorophenyl)ethanone (**242**) as a white solid (600 mg, 74%).

1-(Benzotriazol-1-yl)-2-(4-chlorophenyl)ethanone (242**)**

White solid
 600 mg – 74%
 $t_R = 3.67$ min (run 5 min)
 MS [M+H]⁺ $m/z = 271$
 Purity (215 nm) 98%

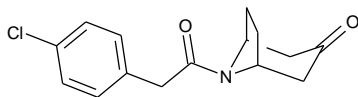
¹H-NMR (CD₂Cl₂): δ (ppm) 8.28 (dt, $J = 8.2$ Hz, $J = 0.9$ Hz, 1H), 8.16 (dt, $J = 8.3$ Hz, $J = 0.9$ Hz, 1H), 7.70 (ddd, $J = 8.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.56 (ddd, $J = 8.3$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.74 (s, 2H)

**Synthesis of the 8-[2-(4-chlorophenyl)acetyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**243**)**

Nortropinone hydrochloride (1.1 eq) and 4-dimethylaminopyridine (1.1 eq) were stirred in chloroform (C = 0.3 M) for 5 minutes at RT. Then, 1-(benzotriazol-1-yl)-2-(4-chlorophenyl)ethanone (**242**, 1 eq) was added and the solution was heated under microwave irradiation for 15 minutes at 100 °C. The resulting solution was washed with saturated Na₂CO_{3(aq)} (3x), HCl_{aq} 1N (3x) and brine (1x). The organic phase was dried over MgSO₄ and concentrated to dryness to afford 8-[2-(4-chlorophenyl)acetyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**243**) as a white solid (226 mg, 81%).

Partie expérimentale

8-[2-(4-Chlorophenyl)acetyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**243**)

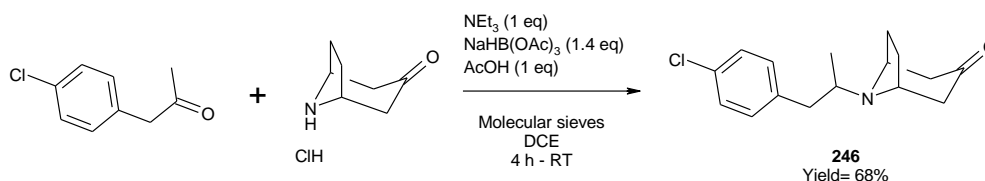


White solid
 226 mg – 81%
 $t_R = 3.78$ min (run 10 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 278$
 Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.36 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 4.95 - 4.91 (m, 1H), 4.52 - 4.48 (m, 1H), 3.80 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H), 3.70 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H), 2.69 (dd, $J = 16.0$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 1H), 2.37 (dd, $J = 16.9$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 1H), 2.17 - 2.0 (m, 2H), 1.82 - 1.67 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 206.7, 166.7, 133.7, 132.7, 130.4, 128.7, 54.2, 51.1, 49.4, 48.7, 40.5, 29.9, 27.8

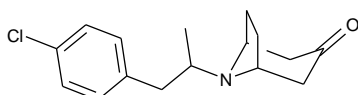
Final product **246**



Synthesis of the 8-[2-(4-chlorophenyl)-1-methyl-ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**246**)

To a solution of 4-chlorophenylacetone (1 eq) in DCE ($C = 1.6$ M) with molecular sieves was added a mixture of 8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one hydrochloride (1.1 eq) and triethylamine (1.1 eq) in DCE ($C = 0.8$ M). Acetic acid (1 eq) and sodium triacetoxyborohydride (1.4 eq) were then added and the solution was stirred at RT for 4 hours. The solution was then basified with aqueous 1N NaOH solution. The resulting solution was extracted with DCM (3x). The combined organic layers were washed with brine (1x), dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (cHex to cHex/EtOAc 4/6) to give 8-[2-(4-chlorophenyl)-1-methyl-ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**246**) as a colorless oil (150 mg, 68%).

8-[2-(4-Chlorophenyl)-1-methyl-ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**246**)



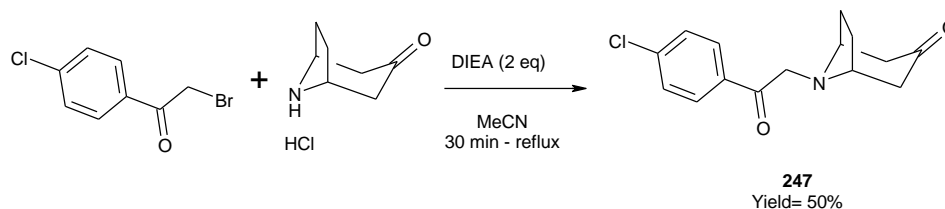
Colorless oil
 150 mg – 68%
 $t_R = 2.0$ min (run 5 min)
 MS $[M+H]^+$ $m/z = 298$
 Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 7.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.18 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.93 - 3.89 (m, 1H), 3.82 - 3.77 (m, 1H), 3.08 - 2.97 (m, 2H), 2.75 - 2.52 (m, 3H), 2.20 - 2.09 (m, 2H), 2.03 - 1.97 (m, 2H), 1.65 - 1.59 (m, 3H), 1.04 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H)

Partie expérimentale

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 209.4, 138.3, 131.7, 131.0, 128.2, 56.2, 55.1, 52.4, 45.8, 45.6, 41.4, 28.9, 28.4, 17.9

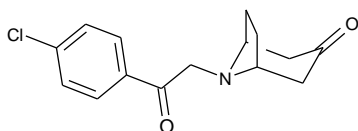
Intermediate **249**



Synthesis of the 8-[2-(4-chlorophenyl)-2-oxo-ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**249**)

DIEA (2 eq) was added to a solution of 2-bromo-1-(4-chlorophenyl)ethanone (1 eq) and nortropinone hydrochloride (1 eq) in acetonitrile ($C = 0.5 \text{ M}$). The reaction mixture was refluxed for 30 minutes. The solution was allowed to come back to RT and the solvent was removed under vacuum. The residue was dissolved in DCM and washed with brine (1x). The organic phase was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether to petroleum ether/EtOAc/ NH_3 (3%) 7/3) to give 8-[2-(4-chlorophenyl)-2-oxo-ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**249**) as an orange oil (405 mg, 50%).

8-[2-(4-Chlorophenyl)-2-oxo-ethyl]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (**249**)



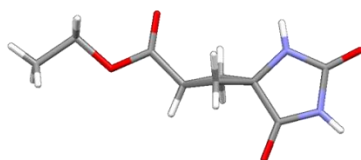
Orange oil
405 mg – 50%
 $t_R = 1.87 \text{ min}$ (run 5 min)
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 278$
Purity (215 nm) 99%

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 8.04 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H), 7.49 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H), 4.0 (s, 2H), 3.64 - 3.60 (m, 2H), 2.71 (dd, $J = 16.1 \text{ Hz}$, $J = 4.3 \text{ Hz}$, 2H), 2.21 (d, $J = 14.8 \text{ Hz}$, 2H), 2.15 - 2.09 (m, 2H), 1.66 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): δ (ppm) 208.7, 195.5, 139.4, 134.4, 129.8, 128.8, 59.6, 57.8, 48.0, 27.7

V. Compound characterization

Crystallographic structures



182'

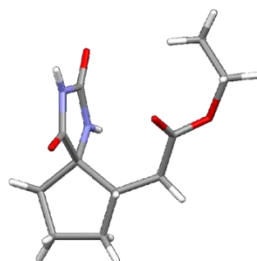
Experimental

Single crystals of $C_{72}H_{96}N_{16}O_{32}$ **182'**: a suitable crystal was selected on a '**Bruker APEX-II CCD**' diffractometer. The crystal was kept at 100 K during data collection. Using Olex2 [1], the structure was solved with the Superflip [2] structure solution program using Charge Flipping and refined with the XL [3] refinement package using Least Squares minimisation.

1. Dolomanov, O.V., Bourhis, L.J., Gildea, R.J., Howard, J.A.K. & Puschmann, H. (2009), *J. Appl. Cryst.* 42, 339-341.
2. Palatinus, L. & Chapuis, G. (2007). *J. Appl. Cryst.*, 40, 786-790; Palatinus, L. & van der Lee, A. (2008). *J. Appl. Cryst.* 41, 975-984; Palatinus, L., Prathapa, S. J. & van Smaalen, S. (2012). *J. Appl. Cryst.* 45, 575-580.
3. Sheldrick, G.M. (2008). *Acta Cryst.* A64, 112-122.

Crystal structure determination of **182'**

Crystal Data for $C_{72}H_{96}N_{16}O_{32}$ ($M = 1697.64$ g/mol): monoclinic, space group $P2_1/c$ (no. 14), $a = 15.1720(18)$ Å, $b = 13.303(2)$ Å, $c = 10.1296(16)$ Å, $\beta = 93.853(13)^\circ$, $V = 2039.8(5)$ Å³, $Z = 1$, $T = 100$ K, $\mu(\text{CuK}\alpha) = 0.933$ mm⁻¹, $D_{\text{calc}} = 1.382$ g/cm³, 12867 reflections measured ($8.85^\circ \leq 2\theta \leq 101.598^\circ$), 2162 unique ($R_{\text{int}} = 0.1068$, $R_{\text{sigma}} = 0.0768$) which were used in all calculations. The final R_1 was 0.1119 ($I > 2\sigma(I)$) and wR_2 was 0.2855 (all data).



183

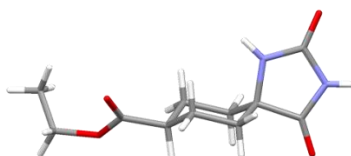
Experimental

Single crystals of $C_{11}H_{16}N_2O_4$ **183**: a suitable crystal was selected on a 'Bruker APEX-II CCD' diffractometer. The crystal was kept at 100 K during data collection. Using Olex2 [1], the structure was solved with the XT [2] structure solution program using Direct Methods and refined with the XL [3] refinement package using Least Squares minimisation.

1. Dolomanov, O.V., Bourhis, L.J., Gildea, R.J, Howard, J.A.K. & Puschmann, H. (2009), J. Appl. Cryst. 42, 339-341.
2. Sheldrick, G.M. (2015). Acta Cryst. A71, 3-8.
3. Sheldrick, G.M. (2008). Acta Cryst. A64, 112-122.

Crystal structure determination of 183

Crystal Data for $C_{11}H_{16}N_2O_4$ ($M=240.26$ g/mol): triclinic, space group P-1 (no. 2), $a = 7.5555(7)$ Å, $b = 8.2301(7)$ Å, $c = 10.6309(10)$ Å, $\alpha = 111.335(3)^\circ$, $\beta = 103.713(4)^\circ$, $\gamma = 97.739(4)^\circ$, $V = 580.10(9)$ Å³, $Z = 2$, $T = 100$ K, $\mu(\text{MoK}\alpha) = 0.105$ mm⁻¹, $D_{\text{calc}} = 1.375$ g/cm³, 10946 reflections measured ($4.326^\circ \leq 2\Theta \leq 52.672^\circ$), 2339 unique ($R_{\text{int}} = 0.0299$, $R_{\text{sigma}} = 0.0274$) which were used in all calculations. The final R_1 was 0.0358 ($I > 2\sigma(I)$) and wR_2 was 0.0866 (all data).

**184'****Experimental**

Single crystals of $C_{44}H_{64}N_8O_{16}$ **184'**: a suitable crystal was selected on a 'Bruker APEX-II CCD' diffractometer. The crystal was kept at 100.02 K during data collection. Using Olex2 [1], the structure was solved with the XT [2] structure solution program using Direct Methods and refined with the XL [3] refinement package using Least Squares minimisation.

1. Dolomanov, O.V., Bourhis, L.J., Gildea, R.J, Howard, J.A.K. & Puschmann, H. (2009), J. Appl. Cryst. 42, 339-341.
2. Sheldrick, G.M. (2015). Acta Cryst. A71, 3-8.
3. Sheldrick, G.M. (2008). Acta Cryst. A64, 112-122.

Crystal structure determination of 184'

Crystal Data for $C_{44}H_{64}N_8O_{16}$ ($M=961.03$ g/mol): monoclinic, space group $P2_1/n$ (no. 14), $a = 11.6094(7)$ Å, $b = 6.3344(3)$ Å, $c = 15.4358(7)$ Å, $\beta = 92.708(2)^\circ$, $V = 1133.86(10)$ Å³, $Z = 1$, $T = 100.02$ K, $\mu(\text{MoK}\alpha) = 0.108$ mm⁻¹, $D_{\text{calc}} = 1.407$ g/cm³, 19243 reflections measured ($4.294^\circ \leq 2\Theta \leq 52.744^\circ$), 2317 unique ($R_{\text{int}} = 0.0327$, $R_{\text{sigma}} = 0.0224$) which were used in all calculations. The final R_1 was 0.0356 ($I > 2\sigma(I)$) and wR_2 was 0.0832 (all data).

In silico molecular shape analysis

Firstly, the 2D-structure of synthesized fragments was sketched by using MDL ISIS/Draw software. Hydrogen atoms were then added and these structures were converted to 3D by MOE 2012.10 software (Chemical computing group). Based on these 3D-structures, MOE 2012.10 was then used to calculate NPR1 and NPR2 parameters. Finally, PipelinePilot® was used to generate the triangular plot to analyze the molecular shape of our fragment library.

Solubility measurement

5 µL of a solution in DMSO (100 mM) of the synthesized fragments were added to 495 µL of MeOH or PBS at pH 7.4. The samples were gently shaken for 24 hours at RT, then centrifuged for 5 minutes, and filtered over 0.45 µm filters. Each filtrate solution was analyzed by HPLC-MS and the solubility was determined by the ratio of mass or UV signal areas PBS/MeOH.

VI. Biological testing

BRET assay

CHO cells were transfected with expression vectors encoding (i) the protein CLDN-1 fused to the *renilla* luciferase (ii) the protein CD81 fused to the green fluorescent protein. To identify ligands that modulate the complex CD81/CLDN-1, these CHO cells were treated with one or eight different concentrations of each ligand with the Coelenterazine h used as substrate of the *renilla* luciferase.

HCV assays

Production of HCVcc: *in vitro* synthesis of HCV RNA was performed using the plasmid pJFH-1 containing the full-length cDNA of JFH-1 isolate. *In vitro* transcribed full-length JFH-1 RNA was transfected to Huh-7 cells by electroporation. Viral stocks were obtained by harvesting cell culture supernatants at 1 week post-transfection. Secondary viral stocks were obtained by additional infections of naïve Huh-7 cells. These cell culture-produced HCV particles were engineering to express *firefly* luciferase.

Production of HCVpp and RD114pp: pseudotype particles were generated as followed: 293T cells were transfected with expression vectors encoding (i) the viral components, HCV E1/E2, (ii) the

Partie expérimentale

cytomegalovirus (CMV)-Gag-Pol murine leukemia virus (MVL) as retroviral core/packaging-component containing the MVL *gag* and *pol* gene and (iii) *firefly* luciferase as integration signal. The medium was replaced 16 h after transfection. Supernatants containing the pp were harvested 24 h later, filtered through 0.45- μ m-pore membranes. Specificity evaluation was performed by using pp bearing glycoproteins derived from the feline endogenous retrovirus RD114 and which are different compare to HCV E1/E2. The RD114pp were generated using the same protocol described previously.

Infection assays: to identify ligands that inhibit HCV infection and HCV entry, Huh-7 cells were seeded in 96-well plates and treated the day after with one or eight different concentrations of each ligand diluted in DMSO in duplicate using a Zephyr automated liquid handling workstation (Caliper BioSciences, Hopkinton, MA). Infected Huh-7 cells were modified to express *gaussia* luciferase to follow the cellular viability. The final concentration of DMSO (1%) was adjusted to be the same for all ligand concentrations. Cells treated with different concentrations of anti-CD81 antibody (JS-81 from BD Pharmingen, San Jose, CA) 1 h before infection, were also used as positive controls. The third day, HCVcc, HCVpp or RD114pp were inoculated and incubated for 30 h at 37 °C. *Firefly* and *gaussia* luciferase assays were performed as indicated by the manufacturer (Promega, San Luis Obispo, CA).

Thermal Shift Assay (TSA)

The recombinant *M. tuberculosis* protein EthR₂ was used at a concentration of 10 μ M. The fluorescent dye SYPRO® Orange (SigmaAldrich) was used to monitor EthR₂ unfolding. This dye is environmentally sensitive and leads to an increase in fluorescence following exposure of hydrophobic regions during protein unfolding. The thermal shift assay was conducted in a Lightcycler 480 (Roche). The system contained a heating/cooling device for temperature control and a charge-coupled device (CCD) detector for real-time imaging of the fluorescence changes in the wells of the microplate. The final sample concentrations were 10 μ M EthR₂, 2.5x SYPRO® Orange, 1% DMSO, and 20 μ M ligand in the EthR₂ buffer (20 mM HEPES, pH7.5, 300 mM NaCl, 5% glycerol, 100 mM imidazole). The samples were heated from 37 to 85 °C with a heating rate of 0.04 °C/s. The fluorescence intensity was measured at Ex/Em = 465/510 nm. The data were processed using the algorithmic program Wavemetrics Igor by applying the following designed procedure: The fluorescence intensity of each well/sample is plotted as a function of the temperature. Then the 1D numerical derivative of these curves is calculated. At last, the maximum data values, corresponding to the inflection points (T_m), are extracted. Subtraction between the values of the respective T_m obtained with and without addition of ligand is defined as Δ T_m.

Reporter gene assay

The quantification of the inhibition of EthR₂-binding to its DNA was performed using a synthetic mammalian gene circuit that reports on the binding of EthR₂ to its DNA operator region displaced in eukaryotic cells. Briefly, a chimeric protein consisting of EthR₂ fused to the VP16

transactivation domain of Herpes simplex was designed to bind to a chimeric promoter containing the *ethA₂-ethR₂* intergenic region and the *Drosophila hsp70* minimal promoter region. Binding of the chimeric protein to the chimeric promoter is quantitatively measured by the expression in HEK-293 embryonic kidney cells of a secreted alkaline phosphatase SEAP reporter gene. Results indicates that expression of the EthR₂-VP16 chimera induced the expression of the SEAP reporter gene, and that addition of ligand able to prevent the EthR₂/DNA interaction inhibit, in a dose dependent manner, this transactivation.

Bacteria assay

A recombinant strain of *M. tuberculosis* H37Rv expressing the green fluorescent protein (H37Rv-GFP) was obtained by transformation of an integrative plasmid. In this plasmid, which derives from the Ms6 mycobacteriophage, the *gfp* gene is cloned under the strong mycobacterial promoter *pBlaF* and the GFP is constitutively expressed. Electrocompetent cells for *M. tuberculosis* H37Rv were prepared from 400 ml of a 15 day old Middlebrook 7H9 culture (Difco, Sparks MD, USA) supplemented with albumin-dextrose-catalase (ADC, Difco, Sparks MD, USA), glycerol and 0.05% Tween 80. Bacilli were harvested by centrifugation at 3000 g for 20 min, washed twice with H₂O at room temperature, and resuspended in 1-2 ml of 10% glycerol at room temperature after recentrifugation. 250 µl of bacilli were mixed with green fluorescent encoding plasmid and electroporated using a Biorad Gene Pulser (Biorad). After electroporation bacilli were resuspended in medium and left one day at 37°C. Transformants were selected on Middlebrook 7H11 medium (Difco, Sparks MD, USA) supplemented with oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC, Difco, Sparks MD, USA) and 50 µg ml⁻¹ hygromycin (Invitrogen, Carlsbad, CA USA). The selected hygromycin-resistant colonies appearing after 3 weeks exhibited green fluorescence. 100 ml culture of H37Rv-GFP strain was grown in Middlebrook 7H9 supplemented with oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC, Difco, Sparks MD, USA) and 50 µg ml⁻¹ hygromycin (Invitrogen, Carlsbad, CA USA). Bacteria were harvested, washed twice and resuspended in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). The bacteria were then sonicated and allowed to stand for 1 hour to allow residual aggregates to settle. The bacterial suspensions were then aliquoted and frozen at -80 °C. A single defrosted aliquot was used to quantify the CFUs prior to inoculation and typical stock concentration is about 0.2 to 1 10⁹ CFU/ml.

Ethionamide (Sigma E6005-5G) is diluted into DMSO to 10 mg/mL and aliquots are stored frozen at -20 °C. Test compounds are suspended in pure DMSO at a concentration of 10 mM. Stock solutions are transferred in the 384-well source plates. Ten 3-fold serial dilutions of compounds are performed in DMSO in the 384-well test plates using the echo 555 liquid handler. Concentrations for the dose response curve (DRC) of compounds usually ranges from 30 to 0.0045 µM. ETH is added to all points of the DRC at a final concentration of 0.1 µg/ml. The final amount of DMSO in the assay plate is <1% v/v for each well. 50µL of bacteria are dispensed per well for each assay plates. Plates are then incubated for 5 days at 37°C, %CO₂. Plates are then read with a microplate fluorescence reader Victor 3, with emission and excitation filters at 488 and 520 nM, respectively.